

Elżbieta Starzycka-Korbas¹, Michał Starzycki¹, Mirosława Dabert²

¹ Instytut Hodowli i Aklimatyzacji Roślin – Państwowy Instytut Badawczy, Oddział w Poznaniu

² Uniwersytet Adama Mickiewicza UAM, Wydział Biologii

Autor korespondencyjny – M. Starzycki, e-mail: m.starzycki@ihar.edu.pl

Metody stosowane w hodowli odpornościowej i ochronie rzepaku ozimego oraz lnu przed chorobami w IHAR–PIB w Poznaniu

Resistance breeding methods and protection of oilseed rape and flax against diseases applied in IHAR–PIB in Poznań

Słowa kluczowe: biotechnologia ProBioEm, mieszańce międzygatunkowe, *Candida ethanolica*, sekwencjonowanie DNA patogenów

Streszczenie

W wielu krajach podejmowane są prace oparte na szeroko pojętej biotechnologii, zmierzające do ograniczenia lub całkowitego wycofania najbardziej szkodliwych substancji znajdujących się w środkach ochrony roślin. Biotechnologia ProBioEm (Sanko Sangyo 2005) przyczynia się do odtworzenia równowagi biologicznej, stwarzając dobre warunki do rozwoju lokalnej mikroflory pożytecznej dla roślin. W Pracowni Metod Hodowli Odpornościowej Oddziału IHAR–PIB w Poznaniu po raz pierwszy w 2003 roku namnożono i zastosowano EM (kompleks efektywnych mikroorganizmów) na polstkach doświadczalnych. Sprawdzono także efektywność *Candida ethanolica*, gatunku wyizolowanego z kompleksu EM, i potwierdzono jego właściwości ochronne dla rzepaku. W zaprezentowanych badaniach wykorzystywano także inne metody biotechnologiczne dla *B. napus*, najważniejszej rośliny oleistej w Polsce. Prowadzono badania nad odpornością mieszańców międzygatunkowych oraz form transgenicznych, badania populacji grzybów patogenicznych dla rzepaku przy użyciu sekwencjonowania DNA ITS. W podsumowaniu badań stwierdzono, że wprowadzanie biopreparatów do produkcji może przyczynić się do ograniczenia stosowania pestycydów, co ochroni środowisko naturalne przed chemizacją oraz będzie sprzyjać produkcji żywności i paszy najwyższej jakości.

Key words: biotechnology ProBioEm, interspecific hybrids, *Candida ethanolica*, DNA sequencing of pathogens

Abstract

In many countries, works based on the use of biotechnology are undertaken to reduce or totally withdraw the most toxic substances contained in plant protection products. Biotechnology ProBioEm (Sanko Sangyo 2005) helps to restore the biological balance, creating good conditions for the development of local beneficial microflora for plants. In The Laboratory of Resistance Breeding Methods (IHAR–PIB, Poznan) in 2003, for the first time, EM was reproduced and used in experimental plots. Additionally, the effectiveness of *Candida ethanolica*, isolated from EM complex, was examined and its properties, protective for rape, have been proved. In the reported research studies other biotechnological methods used for *B. napus* were applied as well. The studies were carried out on the resistance of interspecific hybrids and transgenic forms, on populations of

pathogenic fungi for rape. The studies were performed with DNA ITS sequencing. It has been observed that the introduction of bioprobes put into production may contribute to the limitation of the use of pesticides, which may protect the environment against the overuse of chemicals and will create favourable conditions for the production of food and feed of the highest quality.

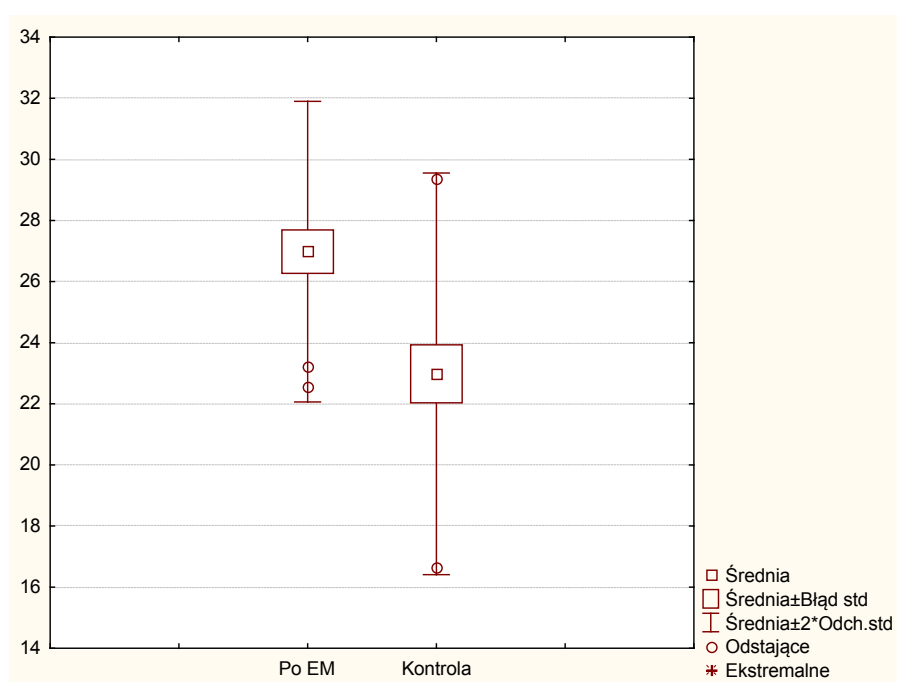
Wstęp

Historycznie, od początku lat czterdziestych do lat sześćdziesiątych XX wieku (Cohn i in. 2007), to jest od momentu kiedy z kontynentów, na których intensywnie uprawiano rośliny, zaczęły docierać informacje o nasilonej szkodliwości substancji zawartych w środkach ochrony roślin, zaczęto poszukiwać metod, które mogłyby być alternatywne i równocześnie skuteczne w walce z pojawiającymi się chorobami roślin. W wielu krajach podejmowano działania proekologiczne dla uzdrowienia gleby i wód (Morgan i Watkinson 1989, Leahy i Cowell 1990, Margesin i in. 2000, Vörösmarty i in. 2000, Ceccanti i in. 2006, Zakaria i in. 2010, Verdugo i in. 2011). Prace te wyznaczyły kierunek ograniczania lub całkowitego wycofania najbardziej trujących substancji na rzecz preparatów biologicznych o działaniu fungistatycznym i insektobójczym.

Możliwości stosowania różnych mikroorganizmów dla ochrony rzepaku przed patogenami

Dużą rolę w proekologicznej ochronie roślin mogą odgrywać antagonistyczne w stosunku do patogenów mikroorganizmy, do których można zaliczyć kompleks EM, nazwany tak przez twórcę prof. Teruo Higa z Uniwersytetu na Okinawie (Sanko Sangyo 2005). Stwierdził on, że kompleks efektywnych mikroorganizmów (EM) jest przyjazny dla roślin i zwierząt. Efektywne mikroorganizmy mogą współżyć z roślinami pozyskując dla nich mikroelementy, azot i dwutlenek węgla z atmosfery oraz wypierać ze środowiska patogeny roślin, a także degradować odpady organiczne. Kompleks ten przyczynia się także do odtworzenia równowagi biologicznej stwarzając korzystne warunki do rozwoju pożytecznej mikroflory w danym środowisku. W Pracowni Metod Hodowli Odpornościowej IHAR-PIB w Poznaniu w 2003 roku po raz pierwszy roku namnożono i użyto EM na poletkach doświadczalnych w Małyszynie. Do badań wykorzystano preparat EmFarma firmy ProBiotics Polska, składający się kultur mączek SCD (ang. Soil Conservation District), jako mieszaniny specjalnie dobranych zespołów pożytecznych mikroorganizmów (skład utajniony), naturalnie występujących w środowisku. Rośliny opryskano w fazie po kwitnieniu. Zgodnie z zaleceniami producenta użyto preparatu w stężeniu 1 l EmFarma na 10 l wody. Podczas zbioru oceniono porażenie roślin inokulowanych grzybem *S. sclerotiorum* oraz plon wybranych odmian i rodów

hodowlanych rzepaku ozimego opryskanych EM w stosunku do kontrolnych nie opryskanych: były to odmiany: Gara, Kana, Marita, Lisek, Lirajet, Wotan, Bermuda, Romana oraz rody: MAH 3498, MAH 4599, MAH 4899 i MAH 5000. Po przeprowadzonej analizie wyników stwierdzono istotne różnice w plonie nasion, który był wyższy u roślin poddanych zabiegowi ochrony EM (rys. 1, wartość testu t-Studenta dla plonu 0,0027**, liczba stopni swobody = 22). Ponadto otrzymany wynik przedstawiono jako „wykres ramkowy – wąsy 2W”.



Rys. 1. Wykres ramkowy – wąsy 2W (łącznie) dla plonowania rzepaku ozimego po zastosowaniu EM — *Box-whisker plot (total) for the yield of oilseed rape after treatment by EM*

Podobnie porażenia powodowane przez *S. sclerotiorum* były niższe na poletkach chronionych kompleksem mikroorganizmów (Starzycki i in. 2013). W następnym roku (2004) na poletkach RZD IUNG w Zielęcinie powtórzono doświadczenie z użyciem EM. Do badań wybrano dwadzieścia rodów hodowlanych rzepaku z cytoplazmą kapusty. Podobnie jak w poprzednim cyklu stwierdzono wyższy plon nasion z poletek, na których stosowano zabieg zraszania roślin EM, co również potwierdzono statystycznie. Ponadto na roślinach badanych rodów nie stwierdzono symptomów innych chorób pochodzenia grzybowego (Starzycki i in. 2013).

Doświadczenia z wybranymi genotypami powtarzano corocznie, jednak z różnym skutkiem. Początkowe wyniki były zachęcające, lecz po pewnym czasie zaobserwowano brak różnic statystycznych dla plonu nasion genotypów czarno-

nasiennych, które opryskiwano preparatami z EM w stosunku do tych samych, których nie opryskano. Na zaistniałą sytuację mógł mieć wpływ czynnik genotypowo środowiskowy lecz tej zależności nie badano. Różnice statystycznie istotne dotyczyły jedynie wyników porażenia czarnonasiennego rzepaku. W większości przypadków wyższa zdrowotność była obserwowana tylko w kombinacjach opryskanych roślin *B. napus* (Starzycki i in. 2013).

Użyte w badaniach formy żółtonasienne rzepaku, otrzymane z mieszańców międzygatunkowych techniką *in vitro*, wykazywały oprócz wyższego plonowania, każdorazowo podwyższoną odporność na patogeny.

Możliwości uzyskania genotypów rzepaku o większej odporności na choroby poprzez krzyżowania międzygatunkowe

Genotypy rzepaku o większej odporności na choroby pochodzenia grzybowego próbowano otrzymywać poprzez tworzenie mieszańców międzygatunkowych. Podstawowym celem tego programu było uzyskanie alloplazmatycznych genotypów rzepaku (*Brassica napus* L.) z cytoplazmą kapust (*Brassica oleracea* L.).

Opanowano technikę otrzymywania roślin mieszańcowych *in vitro*, która jest zadaniem stosunkowo prostym, niewymagającym dużych nakładów finansowych (Starzycki i in. 2007). Korzyści płynące z zastosowania tej techniki mogą przyczynić się do wytworzenia nowych, cennych kombinacji cech. Przez wiele lat w Pracowni Metod Hodowli Odpornościowej IHAR-PIB w Poznaniu prowadzono badania nad mieszańcami międzygatunkowymi w celu otrzymania syntetycznego rzepaku. W późniejszych pracach (Starzycki i in. 2007) dla otrzymania odpornego na wybrane patogeny grzybowe rzepaku krzyżowano określone formy *Brassica oleracea* L. oraz *Brassica napus* L., z których po wielu (6–7) krzyżowaniach wstecznych – wypierających otrzymano rzepak z cytoplazmą kapusty znacznie odporniejszy na porażenie powodowane przez patogeny *Leptosphaeria* sp. oraz *Alternaria* sp.

Podstawowe gatunki *Brassica*, które były użyte w badaniach:

<i>Brassica</i> – ancestral genom	x = 6 chromosomów a b c d e f
<i>Brassica campestris</i> L., genom – A;	10 chromosomów a a b c d d e f f f
<i>Brassica nigra</i> L., genom – B;	8 chromosomów a b c d d e f f
<i>Brassica oleracea</i> L., genom – C;	9 chromosomów a b b c c d e e f
<i>Brassica napus</i> L.	2n = 38 chromosomów (AACC)
<i>Brassica carinata</i> L.	2n = 34 chromosomy (BBCC)
<i>Brassica juncea</i> L.	2n = 36 chromosomów (AABB)

A, B, C – podstawowe genomy w *Brassica*

a, b, c, d, e, f – podstawowe chromosomy

Tabela 1.
Wyniki oceny odporności mieszańców międzygatunkowych wyrażone Indeksami Porażenia dla *Leptosphaeria* sp. (po analizie wariancji i testu Duncan'a), Małyszyn 2014 — *Evaluation of interspecific hybrids resistance to Leptosphaeria sp. (after analysis of variance and Duncan test), Małyszyn 2014*

Nr obiektu No.	Pochodzenie roślin <i>Origin of plants</i>	Indeks porażenia IP <i>Pathogenity Indeks IP</i>	Grupy jednorodne <i>Ranking</i>
21	Monolit	0,160	A
11	405/08 53 Bru × B.n./1	0,051	AB
5	420/08 38 B.t. × B.n. (304 TP) B.n./4	0,041	AB
10	420/08 38 B.t. × B.n./3	0,032	AB
8	297/06 p. (Jar × B.n.) × Californium	0,029	AB
17	420/08 38 B.t. × B.n./1	0,028	AB
3	405/08 53 Bru B.n./2	0,028	AB
1	413/08 10 Tau × B.n.	0,025	AB
22	<i>B. campestris</i>	0,025	AB
2	420/08 38 B.t. × B.n. (304 TP)/6	0,023	AB
4	420/08 38 B.t. × B.n. (304 TP)/4	0,020	AB
18	301 × Digger/06 (Choryń × Bn) × Calif	0,019	AB
16	405/08 53 Bru Bn	0,019	AB
20	405/08 53 Bru	0,019	AB
7	420/08 38 B.t. × B.n./4	0,013	B
15	413/08 10 Tau × B.n./10	0,013	B
14	301 × Digger (Choryńska × B.n.)	<u>0,010</u>	<u>B</u>
12	301 × 303 TP/06 p. (Choryńska × B.n.) × (Californium × B.n.)	<u>0,010</u>	<u>B</u>
13	295 × 645 TP/06 p. (Br. × Bn) × Lisek	<u>0,010</u>	<u>B</u>
9	301 × 303 TP/06 p. Choryńska	<u>0,007</u>	<u>B</u>
19	297/06 p. (Jar × Bn) × B.n.	<u>0,004</u>	<u>B</u>
6	420/08 38 B.t. × B.n./2	<u>0,004</u>	<u>B</u>

Oznaczenia do tabeli 1. i 2.

Tau i B.t. – *B. taurica*, B.n. – *B. napus* (Lisek–Californium–Castille), Choryńska – kapusta pastewna, Br – kapusta brukselska, Jar – kapusta jarmuż.

Designation for Table 1. and Table 2.

Tau i B.t. – *B. taurica*, B.n. – *B. napus* (Lisek – Californium – Castille), Choryńska – fodder cabbage, Br – brussel, Jar – kale.

Różnice istotne statystycznie na poziomie $\alpha=0,05$, NIR = 0,04473

Results statistically significant at $\alpha = 0.050$, LSD = 0.04473

Tabela 2.

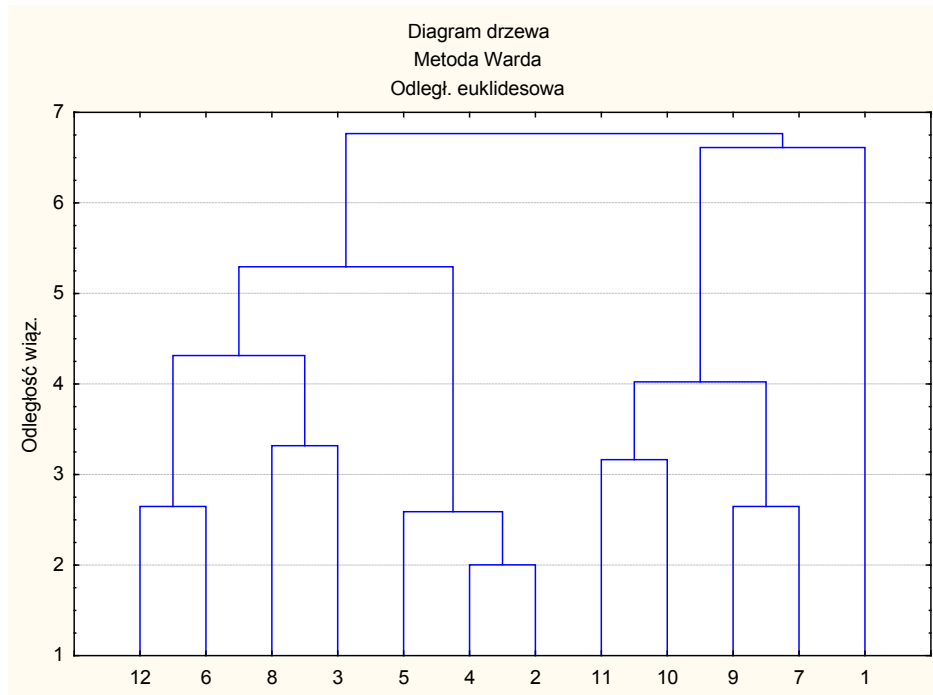
Wyniki oceny odporności mieszańców międzygatunkowych wyrażone Indeksami Porażenia dla *Alternaria* sp. (po analizie wariancji i testu Duncan'a), Małyszyn 2014 — *Evaluation of interspecific hybrids resistance to Alternaria sp. (after analysis of variance and Duncan test), Małyszyn 2014*

Nr obiektu No.	Pochodzenie roślin <i>Origin of plants</i>	Indeks porażenia IP <i>Pathogenity Indeks IP</i>	Grupy jednorodne <i>Ranking</i>
21	Monolit	0,094	A
4	420/08 38 B.t. × B.n. (304 TP)/4	0,013	B
3	405/08 53 Bru B.n./2	0,013	B
11	405/08 53 Bru × B.n./1	0,013	B
13	295 × 645 TP/06 p.(Br. × Bn) × Lisek	0,013	B
5	420/08 38 B.t. × B.n. (304 TP) B.n./4	0,010	B
19	297/06 p. (Jar × Bn) × B.n.	0,010	B
16	405/08 53 Bru Bn	0,010	B
15	413/08 10 Tau × B.n./10	0,007	B
1	413/08 10 Tau × B.n.	0,007	B
12	301 × 303 TP/06 (Choryńska × B.n.) × (Californium × B.n.)	0,004	B
2	420/08 38 B.t. × B.n. (304 TP)/6	0,004	B
6	420/08 38 B.t. × B.n./2	0,004	B
14	301 × Digger (Choryńska × B.n.)	0,004	B
8	297/06 p. (Jar × B.n.) × Californium	0,001	B
7	420/08 38 B.t. × B.n./4	0,001	B
10	420/08 38 B.t. × B.n./3	0,001	B
18	301 × Digger/06 p.(Choryńska × Bn)×Calif	0,001	B
17	420/08 38 B.t. × B.n./1	0,001	B
20	405/08 53 Bru	0,001	B
9	301 × 303 TP/06 p. Choryńska	0,001	B

Różnice istotne statystycznie na poziomie $\alpha = 0,05$, NIR = 0,01732,
Results statistically significant at $\alpha = 0.050$, LSD = 0.01732

W obrębie genotypów, które wykazywały podwyższony poziom odporności wykonano analizy porównawcze DNA RAPD i na ich podstawie dokonano analizy skupień.

Analiza ta pozwoliła na wstępną informację dotyczącą podobieństwa genetycznego poszczególnych mieszańców międzygatunkowych oraz form wyjściowych. Najbardziej odległe genetycznie były genotypy *B. campestris* oraz mieszańiec rzepaku i *B. carinata* (poz. 1 i 12). Podobne były genotypy *B. napus* i mieszańiec rzepaku z *B. campestris* (poz. 4 i 2) Po analizie odporności badanych siewek, najbardziej odporne na patogeny z rodzaju *Leptosphaeria* sp. i *Alternaria* sp.



- | | |
|---|--|
| 1. <i>B. campestris</i> (A), | 2. <i>B. napus</i> CMS (AC), |
| 3. <i>B. napus</i> restorer (AC), | 4. <i>B. napus</i> CMS × <i>B. campestris</i> (ACA), |
| 5. (<i>B.n.</i> CMS ogu × <i>B. juncea</i>) × <i>B.n.</i> restorer (PN 1162) (ACAB) | 6. <i>B.n.</i> CMS ogu × <i>B. juncea</i> (ACAB), |
| 7. Jarmuż × <i>B. campestris</i> (CA), | 8. [(<i>B.o.</i> pastewna × <i>B. taurica</i>) × 33TP] × 34TP/04 (CAC), |
| 9. Brukselka × <i>B.n.</i> (CAC), | 10. [(<i>B.</i> pastewna × <i>B. taurica</i>) × 35TP] × Liclasic/04 (CAC), |
| 11. (Kap. biała × brukselka) × (<i>B. cretica</i> × <i>B.n.</i>) (CAC), | 12. <i>B. cretica</i> × <i>B.n.</i> (CAC). |

Rys. 2. Analiza skupień po analizach DNA RAPD wybranych genotypów mieszańców międzygatunkowych i gatunków podstawowych w *Brassica* — *Cluster analysis after the DNA RAPD analysis of selected genotypes of interspecific hybrids and Brassica basic species*

okazały się genotypy posiadające DNA z gatunku *Brassica taurica*. Poszukiwane są motywy DNA kojarzone z podwyższoną odpornością mieszańców międzygatunkowych na najgroźniejsze patogeny: *Leptosphaeria* sp., *Alternaria* sp. oraz *S. sclerotiorum*. Celem tych prac jest nagromadzenie genów odporności u roślin poprzez wielokrotne krzyżowania wsteczne mieszańców międzygatunkowych z rzepakiem, a także identyfikacja markerów SCAR do selekcji genotypów *B. napus* o podwyższonej odporności.

Wykorzystując technikę otrzymywania mieszańców międzygatunkowych uzyskano rzepak żółtonasienny tzw. trójzerowy („000”). Pomimo dobrej jakości nowe rody plonowały niżej od rodów czarnonasiennych, a obserwacje prowadzone

w ciągu wielu lat hodowli wykazały, że cechę tę udało się tylko nieznacznie ulepszyć (Starzycki i in. 2007). Dopiero zastosowanie preparatów z EM przyczyniło się do 10% wzrostu plonów z równoczesnym zachowaniem znacznie podwyższonej zdrowotności w stosunku do form kontrolnych dla patogenów *Leptosphaeria* sp. i *Alternaria* sp.

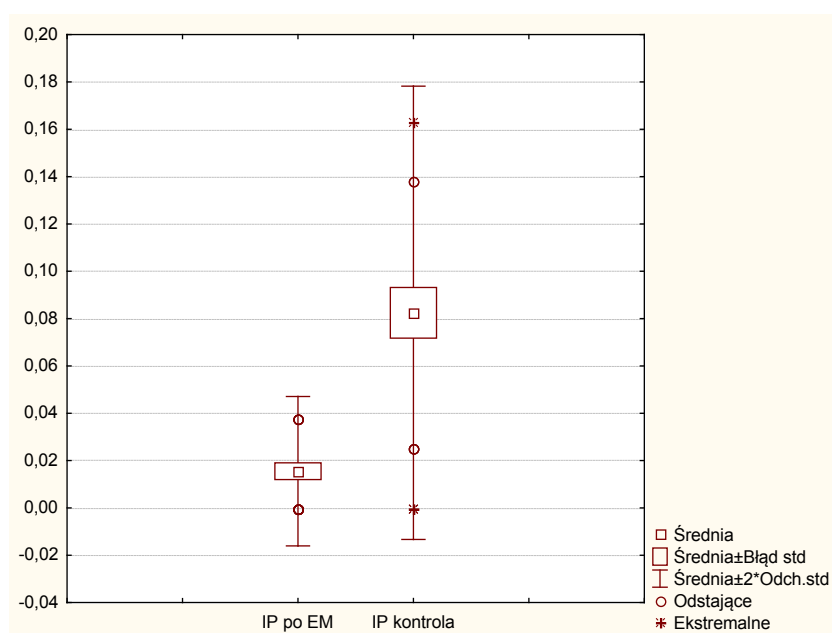
Indeks porażenia każdorazowo dla obu patogenów: *Leptosphaeria* sp. i *Alternaria* sp. wypadł korzystnie na rzecz roślin poddanych działaniu biopreparatu.

Tabela 3.

Wyniki porażenia powodowane przez *Leptosphaeria* sp. i *Alternaria* sp. form kontrolnych oraz po aplikacji EM dla form żółtonasiennych (Małyszyn 2014) — *Results of plants infection (IP) caused by Leptosphaeria sp. and Alternaria sp. after application of EM and without applications of EM (Małyszyn 2014)*

Nr No.	Żółtonasienne mieszkańce międzygatunkowe <i>Yellow seed interspecific hybrids</i>	<i>Alternaria</i> sp.		<i>Leptosphaeria</i> sp.	
		IP po zastosowaniu EM <i>IP after spraying EM</i>	IP kontrola <i>IP control</i>	IP po zastosowaniu EM <i>IP after spraying EM</i>	IP kontrola <i>IP control</i>
1	701	0,000	0,0500	0,000	0,138
2	702	0,000	0,0375	0,000	0,113
3	703	0,000	0,0375	0,038	0,113
4	704	0,000	0,0375	0,000	0,050
5	705	0,000	0,0250	0,013	0,100
6	706	0,000	0,0625	0,025	0,113
7	707	0,000	0,0375	0,000	0,088
8	713	0,000	0,0375	0,000	0,100
9	721	0,000	0,0000	0,025	0,075
10	722	0,000	0,0125	0,025	0,075
11	723	0,000	0,0500	0,000	0,125
12	724	0,000	0,0375	0,000	0,113
13	727	0,000	0,0500	0,038	0,075
14	728	0,000	0,0250	0,025	0,138
15	729	0,000	0,0500	0,000	0,163
16	732	0,000	0,0000	0,038	0,025
17	733	0,000	0,0000	0,025	0,025
18	735	0,000	0,0000	0,038	0,000
19	736	0,000	0,0000	0,000	0,000
20	740	0,000	0,025	0,025	0,025
				Test t – Student 0,00001**	

Aby porównać poziom plonowania nasion form żółtonasiennych użyto test t-Studenta z dwiema próbami zakładający równe wariancje dla testu jednostronnego, otrzymano wartość statystycznie istotną (0,0266*, liczba stopni swobody = 22) na korzyść form opryskanych biopreparatem.



Rys. 3. Wykres ramkowy – wąsy 2W (łącznie) dla porażenia (IP) powodowanego przez *Leptosphaeria* sp. — Box-whisker plot (total) for the Pathogenity Indeks IP (*Leptosphaeria* sp.) after using EM.

Badania mikroorganizmów wchodzących w skład biopreparatu z EM

W związku z otrzymanymi pozytywnymi wynikami dotyczącymi aplikacji EM na rzepak żółtonasienny, prace poszerzono o badania mikroorganizmów wchodzących w skład biopreparatu. Najczęściej izolowanym mikroorganizmem okazał się gatunek *Candida ethanolica*.

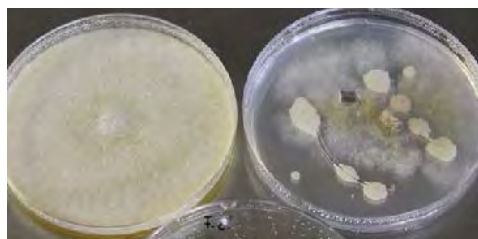
Aby stwierdzić jego ochronne działanie, obok *C. ethanolica* zaszczepiano w warunkach *in vitro* na pożywkach PDA następujące patogeny: *Leptosphaeria maculans*, *Leptosphaeria biglobosa*, *Sclerotinia sclerotiorum*, *Fusarium culmorum*, *Fusarium oxysporum*. Czystość gatunkową patogenów sprawdzono każdorazowo przy użyciu sekwencjonowania DNA ITS1.

Antagonizm grzyba *Candida ethanolica* do patogenów został stwierdzony w każdej próbie analiz mikologicznych. Podobne zależności dla grzybów drożdżowych opisał prof. Higa (Sanko Sangyo 2005).



```
CAAAACTTTCAACAACGGATCTCTTGGTTCTCGCATC
GATGAAGAGCGCAGCGAAATGCGATACCTAGTGTGA
ATTGCAGCCATCGTGAATCATCGAGTTCTTGAACGCA
CATTGCGCCCGTCGGCATTCCGGCGGGCATGCCTGTC
TGAGCGTCGTTTCTTCTTGCAAGACGAGAGTTGCGC
AGAGCTGGCCCGCCACGGCCCCGCCGAAAAGAAAC
GAGGCCACGAGCGAACTAGAACAGGCCGCTTGGGGT
CTCCGAGCACTATGAGCTCGACCTCAGATCAGGNAG
GAAT
```

Fot. 1. Wyizolowane z biopreparatu mikroorganizmy (2013) oraz wynik sekwencjonowania ITS 1 dla *Candida ethanolica* (zapis Finch TV, MS-lis13_142.ITS1_C05_2013-11-12, NCBI/BLAST, 99% zgodności po sekwencjonowaniu) — *Isolated microorganisms from biopreparate and the result of the sequencing of the ITS 1 for Candida ethanolica* (Finch TV, MS-lis13_142.ITS1_C05_2013-11-12, NCBI/BLAST, 99% compatibility after sequencing)

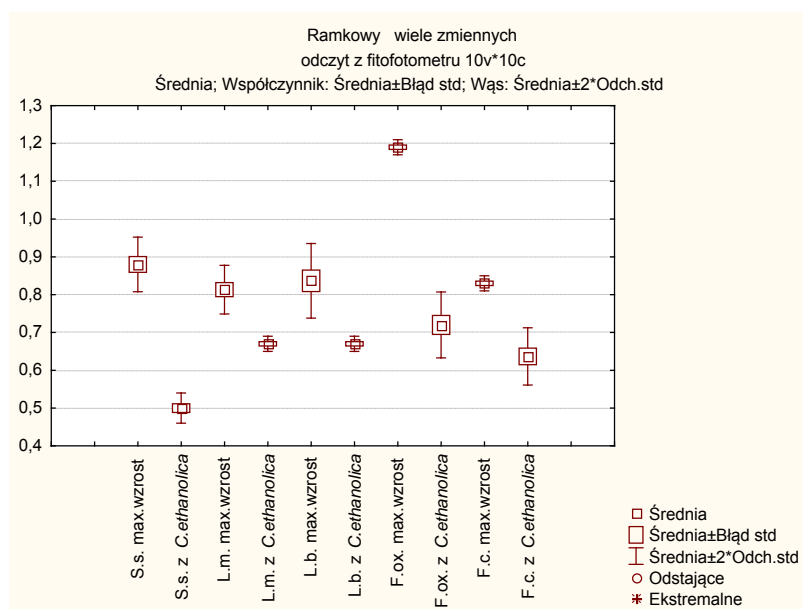


Fot. 2. Powstrzymanie wzrostu grzybni *Fusarium culmorum* spowodowane antagonistycznym działaniem *C. ethanolica*
Limitation of mycelium growth of Fusarium culmorum caused by an antagonistic effect of C. ethanolica



Fot. 3. Powstrzymanie wzrostu grzybni i form przetrwalnikowych (sklerocjów) *S. sclerotiorum* spowodowane antagonistycznym działaniem *C. ethanolica*
Limitation of mycelium growth and sclerotia of S. sclerotiorum caused by an antagonistic effect of C. ethanolica

W każdym przypadku odnotowano pozytywne działanie antagonistycznego grzyba *Candida ethanolica* w stosunku do badanych patogenów w warunkach *in vitro*. Sporządzono także wykres ramkowy – wąsy 2W dla wykazania pozytywnego oddziaływania *C. ethanolica* na najbardziej patogennicne grzyby wobec rzepaku.



Oznaczenia — Designation:

S.s — *Sclerotinia sclerotiorum*

L.m. — *Leptosphaeria maculans*

L.b. — *Leptosphaeria biglobosa*

F.ox. — *Fusarium oxysporum*

F.c. — *Fusarium culmorum*

Rys. 4. Wykres ramkowy – wąsy 2W dotyczący ograniczenia wzrostu najgroźniejszych patogenów rzepaku przez antagonistę *Candida ethanolica* — Graph of statistical block of limiting the growth of the most dangerous oilseed rape pathogens by *Candida ethanolica*

Dane dotyczące wykresu ramkowego – wąsy 2W (rys. 4.) otrzymano na podstawie pomiaru ekstynkcji natężenia pochłanianego promieniowania światła z sondą (LP 471 PAR Probe) działającą w zakresie długości fali 400–700 nm. Oznaczenia wykonano przy pomocy fotoradiometru (Photo/Radiometer, Delta OHM HD 2102,2). Otrzymane wyniki z trzech powtórzeń wykazały skuteczność i równocześnie ochronne właściwości jednego z gatunków (*C. ethanolica*) wchodzącego w skład biopreparatu powodującego ograniczenie wzrostu i rozwoju najgroźniejszych patogenów rzepaku.

Monitorowanie występowania patogenów rzepaku wspomagające ochronę plantacji rzepaku

Poza badaniami nad odpornością roślin rzepaku, corocznie określany jest skład patogennych gatunków w stosunku do *B. napus* przy wykorzystaniu sekwencjonowania DNA ITS (zapis: Finch TV, NCBI/BLAST, GenBank). Analizy te w sposób

precyzyjny i jednoznaczny dają informację o składzie populacji chorobotwórczych grzybów występujących w warunkach polowych (Starzycki i in. 2014). Po odszczepieniu patogenów, a następnie izolacji i analizie DNA, już w okresie wczesnej wiosny zainteresowani rolnicy oraz hodowcy otrzymują informację o zagrożeniach ze strony najważniejszych patogenów rzepaku.



Fot. 4. Szyjka korzeniowa rzepaku, z której wyizolowano chorobotwórcze mikroorganizmy — *Primery root of oilseed rape, from which pathogenic microorganisms were isolated*

Tabela 4. Wczesnowiosenna ocena występowania patogenów na roślinach rzepaku na podstawie sekwencjonowania DNA (Małyszyn 2013) — *Early spring assessment of pathogens on oilseed rape plants based on DNA sequencing (Małyszyn 2013)*

Próba <i>Sample</i>	Gatunek patogena <i>Species of pathogen</i>	Próba <i>Sample</i>	Gatunek patogena <i>Species of pathogen</i>	Próba <i>Sample</i>	Gatunek patogena <i>Species of pathogen</i>
MS1	<i>L. maculans</i>	MS43	<i>L. biglobosa</i>	MS85	<i>L. maculans</i>
MS2	<i>L. biglobosa</i>	MS44	<i>L. biglobosa</i>	MS86	<i>A. alternata</i>
MS3	<i>L. biglobosa</i>	MS45	<i>L. maculans</i>	MS87	<i>L. maculans</i>
MS4	<i>A. alternata</i>	MS46	<i>A. alternata</i>	MS88	<i>L. maculans</i>
MS5	<i>A. alternata</i>	MS47	<i>L. maculans</i>	MS89	<i>A. alternata</i>
MS6	<i>L. biglobosa</i>	MS48	<i>A. alternata</i>	MS90	<i>L. maculans</i>
MS7	<i>L. biglobosa</i>	MS49	<i>A. alternata</i>	MS91	<i>A. alternata</i>
MS8	<i>A. alternata</i>	MS50	<i>L. biglobosa</i>	MS92	<i>L. biglobosa</i>
MS9	<i>L. maculans</i>	MS51	<i>A. alternata</i>	MS93	<i>L. biglobosa</i>
MS10	<i>A. alternata</i>	MS52	<i>A. alternata</i>	MS94	<i>L. biglobosa</i>
MS11	<i>L. maculans</i>	MS53	<i>L. biglobosa</i>	MS95	<i>L. biglobosa</i>
MS12	<i>L. maculans</i>	MS54	<i>A. alternata</i>	MS96	<i>L. biglobosa</i>
MS13	<i>A. alternata</i>	MS55	<i>A. alternata</i>	MS97	<i>L. biglobosa</i>
MS14	<i>L. maculans</i>	MS56	<i>A. alternata</i>	MS98	<i>A. alternata</i>
MS15	<i>L. maculans</i>	MS57	<i>L. biglobosa</i>	MS99	<i>L. biglobosa</i>
MS16	<i>L. maculans</i>	MS58	<i>L. biglobosa</i>	MS100	<i>A. alternata</i>

ciąg dalszy tabeli 4

MS17	<i>A. alternata</i>	MS59	<i>heterogeny</i>	MS101	<i>L. biglobosa</i>
MS18	<i>A. alternata</i>	MS60	<i>L. biglobosa</i>	MS102	<i>A. alternata</i>
MS19	<i>A. alternata</i>	MS61	<i>A. alternata</i>	MS103	<i>A. alternata</i>
MS20	<i>L. biglobosa</i>	MS62	<i>L. biglobosa</i>	MS104	<i>A. alternata</i>
MS21	<i>A. alternata</i>	MS63	<i>A. alternata</i>	MS105	<i>heterogeny</i>
MS22	<i>L. maculans</i>	MS64	<i>L. biglobosa</i>	MS106	<i>Ulocladium sp.</i>
MS23	<i>A. alternata</i>	MS65	<i>A. alternata</i>	MS107	<i>L. biglobosa</i>
MS24	<i>A. alternata</i>	MS66	<i>L. biglobosa</i>	MS108	<i>L. biglobosa</i>
MS25	<i>Alternaria sp.1</i>	MS67	<i>heterogeny</i>	MS109	<i>A. alternata</i>
MS26	<i>L. biglobosa</i>	MS68	<i>L. biglobosa</i>	MS110	<i>L. biglobosa</i>
MS27	<i>L. biglobosa</i>	MS69	<i>L. biglobosa</i>	MS111	<i>L. biglobosa</i>
MS28	<i>Ulocladium sp.</i>	MS70	<i>heterogeny</i>	MS112	<i>L. maculans</i>
MS29	<i>Epicoccum nigrum</i>	MS71	<i>A. alternata</i>	MS113	<i>L. maculans</i>
MS30	<i>Alternaria sp.1</i>	MS72	<i>A. alternata</i>	MS114	<i>L. maculans</i>
MS31	<i>A. alternata</i>	MS73	<i>L. maculans</i>	MS115	<i>L. biglobosa</i>
MS32	<i>A. alternata</i>	MS74	<i>L. biglobosa</i>	MS116	<i>L. maculans</i>
MS33	<i>A. alternata</i>	MS75	<i>L. biglobosa</i>	MS117	<i>A. alternata</i>
MS34	<i>L. maculans</i>	MS76	<i>A. alternata</i>	MS118	<i>Ulocladium sp.</i>
MS35	<i>L. maculans</i>	MS77	<i>heterogeny</i>	MS119	<i>A. alternata</i>
MS36	<i>A. alternata</i>	MS78	<i>heterogeny</i>	MS120	<i>L. biglobosa</i>
MS37	<i>L. maculans</i>	MS79	<i>L. biglobosa</i>	MS121	<i>brak PCR</i>
MS38	<i>L. maculans</i>	MS80	<i>L. biglobosa</i>	MS122	<i>brak PCR</i>
MS39	<i>Alternaria sp.1</i>	MS81	<i>L. maculans</i>	MS123	<i>brak PCR</i>
MS40	<i>L. biglobosa</i>	MS82	<i>L. maculans</i>	MS124	<i>brak PCR</i>
MS41	<i>L. biglobosa</i>	MS83	<i>L. maculans</i>	MS125	<i>brak PCR</i>
MS42	<i>Epicoccum nigrum</i>	MS84	<i>L. maculans</i>	MS126	<i>L. biglobosa</i>

Na 126 badanych obiektów sekwencjonowanych patogenów 22,22% stanowiła *Leptosphaeria maculans* (wyróżniono **kolorem**).

Wyprzedzające analizy występowania patogenów rzepaku są pomocne w sytuacjach epidemicznych z uwagi na możliwość podjęcia szybkiej decyzji o jego ochronie (także z użyciem preparatów z EM). Analizy, wykonane z wielolecia, wykazują sinusoidalny charakter występowania najgroźniejszych patogenów rzepaku. W przyszłości po dalszych wieloletnich badaniach z użyciem sztucznych sieci neuronowych (SSN) będzie można z dużą dozą prawdopodobieństwa przewidywać zmiany dotyczące patogenezy *B. napus*, zwłaszcza dla tak groźnego gatunku, jakim jest *Leptosphaeria maculans*.

Badania zmian metabolomu u zmutowanych form *B. napus* po pierwotnym porażeniu organizmami fitoplazmatycznymi oraz możliwości ograniczenia występowania patogenu

W warunkach polowych w Borowie i Małyszynie (HR Strzelce Spółka z o.o. Grupa IHAR) oraz w Bąkowie (HR Smolice Spółka z o.o. Grupa IHAR) prowadzono obserwacje zniekształceń roślin rzepaku spowodowanych przez fitoplazmy (Starzycki i Starzycka 2007). W warunkach pól produkcyjnych odnotowano niewielki procent roślin porażonych oraz mutantów. Obserwacje występowania patogenu prowadzono na powierzchni ok. 1000 m². Odnotowano 1–2 roślin z typowymi oznakami choroby fitoplazmatycznej (fot. 5). Wyniki te świadczą o niskim zagrożeniu ze strony chorobotwórczych bakterii.

Aby wyjaśnić charakter zniekształceń roślin po raz pierwszy w 2014 r. wykonano badania metabolomu zniekształconych form zmutowanych *B. napus* po pierwotnym porażeniu fitoplazmami. Do analiz wykorzystano staśmione egzemplarze roślin, na których można było wyróżnić dwa rodzaje łodyg: silnie staśmione oraz normalne (fot. 6). Każda z tych roślin wykształciła prawidłowo rozwinięte kwiaty.

Badania przeprowadzono stosując spektroskop FTIR (w dalekiej podczerwieni z transformatą fourierowską) w zakresie fal między 4000 – 400 cm⁻¹ (badania wykonano w ramach współpracy z Uniwersytetem Rzeszowskim, prof. dr hab. Jacek Żebrowski). Po badaniach odnotowano znaczne różnice w metabolomie regionów charakterystycznych dla białek, polisacharydów i lipidów (rys. 5).

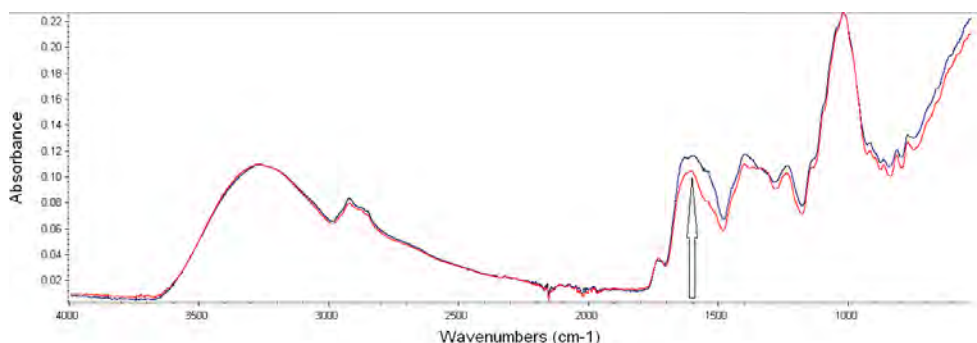
Choroba fitoplazmatyczna rzepaku jest dla hodowców i plantatorów bardzo uciążliwa, szczególnie podczas zbioru kombajnowego, z uwagi na nierównomierne dojrzewanie roślin. Podczas wcześniejszych badań na niektórych porażonych roślinach *B. napus* stwierdzono niewielką liczbę wykształconych nasion, z których w 30% wyrastały rośliny zmutowane — staśmione.



Fot. 5. Choroba fitoplazmatyczna rzepaku
Phytoplasma on oilseed rape



Fot. 6. Łodygi rzepaku, z których pobrano materiał do badań metabolomicznych
Stems of oilseed rape, from which samples were taken for testing metabolome



Rys. 5. Metabolom formy staśmionej (różnice zaznaczono strzałką) – znaczne zmiany w regionie białek (próba nr 12, M. Starzycki, J. Żebrowski, badania własne) — *Metabolome of mutant plants (the differences are marked with an arrow) – significant changes in the region of the protein (sample number 12, M. Starzycki, J. Żebrowski)*

Kontynuując badania nad staśmieniami odnotowano niepokojący efekt powstania trwałych mutacji, dziedziczonych w następnych pokoleniach *B. napus*. Także pyłek pochodzący z tych roślin użyty do krzyżowania z genotypami normalnymi każdorazowo wpływał na powstanie w pokoleniu F₁ form staśmionych. Z podanych powodów zarówno, rośliny porażone przez fitoplazmy, jak i staśmione mutanty stanowią zagrożenie dla hodowli i uprawy *B. napus*.

Należy podkreślić, że w warunkach polowych po aplikacji ProBioEmów liczba porażonych roślin rzepaku z charakterystycznymi objawami choroby fitoplazmatycznej jest zdecydowanie niższa na określonej jednostce powierzchni niż na polach bez tej ochrony (obserwacje własne na plantacjach wielkoobszarowych). Począwszy od 2003 r., kiedy po raz pierwszy w IHAR–PIB użyto w doświadczeniach preparatów z EM na rzepaku, nigdy nie odnotowano występowania choroby fitoplazmatycznej.

Badania form transgenicznych wybranych gatunków roślin oleistych z dołączonym genem odporności (rezystencji)

Alternatywą dla naturalnie występujących w przyrodzie odpornych na patogeny form są rośliny transgeniczne otrzymane na drodze biotechnologicznej. W PMHO IHAR–PIB prowadzono badania nad odpornością rzepaku na porażenie powodowane przez najgroźniejsze patogeny. W badaniach wykorzystywano metodę próżniową wprowadzania w przestwory międzykomórkowe roślin *Agrobacterium tumefaciens* z plazmidem zawierającym gen β -glukanazy i inne. Ten sam gen (β -glukanazy) został wyizolowany i dołączony do lnu oleistego. Transformacja została wykonana na Uniwersytecie Wrocławskim przez prof. dr hab. Jana Szopę, a ocenę odporności wykonano w PMHO IHAR w Poznaniu. Otrzymane wyniki

zostały opublikowane w literaturze fachowej związanej z transgenezą i dotyczą następujących prac badawczych autorstwa: Wróbel-Kwiatkowska i in. 2007a i 2007b, Lorenc-Kukuła i in. 2007, Czuj i in. 2009, Boba i in. 2011, Preisner i in. 2014, Zeitoun i in. 2014.



Fot. 7. Badanie metabolitów transgenicznego lnu w stosunku do patogenów *F. culmorum* i *F. oxysporum*, osłabienie wzrostu patogenów w stosunku do kontroli (wspólne badania IHAR–PIB i Uniwersytetu Wrocławskiego 2009) — *Investigations of transgenic flax metabolites in relation to the pathogen *F. culmorum* and *F. oxysporum*, slowdown in growth pathogens compared to the control (research in cooperation IHAR–PIB and the University of Wrocław 2009)*



Fot. 8. Odnotowany brak porażenia na roślinach transgenicznych lnu w stosunku do kontrolnych inokulowanych patogenem *F. oxysporum* — *Transgenic flax not infected compared to controls inoculated with the pathogen *F. oxysporum**

Zarówno w warunkach *in vitro* badając metabolity pochodzące z form transgenicznych oraz *in vivo* badając inokulowane rośliny transgeniczne można zaobserwować powstrzymanie rozwoju patogenów fuzaryjnych. W podobnym układzie przeprowadzono badania z użyciem technologii z aplikacją ProBioEmów w warunkach kontrolowanych *in vitro* i stwierdzono, że otrzymane wyniki były zbliżone do uzyskanych dla form transgenicznych (dane nie publikowane).

Podsumowanie i wnioski

1. Biotechnologiczne metody stosowane w rolnictwie z użyciem technologii ProBioEmów mogą przyczynić się do ograniczenia substancji toksycznych występujących w środowisku naturalnym, co w konsekwencji będzie sprzyjać produkcji żywności i paszy o najwyższej jakości. Podany kierunek w dalszym ciągu będzie rozwijany w Pracowni Metod Hodowli Odpornościowej IHAR PIB w Poznaniu i poszerzony o badania biologiczne, fizjologiczne i genetyczne mikroorganizmów sprzyjających odporności na stresy biotyczne roślin, głównie rzepaku.

2. Aby wspomóc działania ochronne dla najważniejszej rośliny oleistej w Polsce, tj. rzepaku, będzie można stosować biopreparaty, które mogą pomóc w ograniczeniu patogenezы i stopniowo konkurować z dotychczas znanymi środkami ochrony roślin. Przeprowadzone badania w warunkach polowych oraz *in vitro* potwierdziły efektywność ochronną biopreparatów.
3. W wyniku wprowadzania do produkcji nowych genotypów rzepaku pojawiają się nowe patotypy o zmienionej wirulencji, a proces adaptacji patogenów w ekosystemie przebiega z reguły szybciej niż hodowla nowych, odpornych odmian *B. napus*. Z tego powodu dochodzi najczęściej do przełamania bariery ochronnej genów odporności u rzepaku. Dlatego prace prowadzone w tym zakresie mają charakter ciągły. Otrzymane mieszańce międzygatunkowe z cytoplazmą kapust – *B. oleracea* wykazywały zdecydowanie wyższy poziom odporności na najgroźniejsze patogeny. Poszukiwane są motywy DNA kojarzone z podwyższoną odpornością mieszańców międzygatunkowych na najgroźniejsze patogeny: *Leptosphaeria* sp., *Alternaria* sp. oraz *S. sclerotiorum*. Celem tych prac jest nagromadzenie genów odporności u roślin poprzez wielokrotne krzyżowania wsteczne mieszańców międzygatunkowych z rzepakiem, a także identyfikacja markerów SCAR do selekcji genotypów *B. napus* o podwyższonej odporności.
4. Po przeprowadzonych badaniach z użyciem antagonistycznego grzyba *Candida ethanolica* (gatunek został wyizolowany z EM) stwierdzono proces powstrzymywania rozwoju najgroźniejszych patogenów rzepaku, związany z zanikiem lub osłabieniem wzrostu grzybni. W każdym przypadku odnotowano pozytywne działanie antagonistyczne *C. ethanolica* w stosunku do badanych patogenów (*Sclerotinia sclerotiorum*, *Leptosphaeria maculans*, *Leptosphaeria biglobosa*, *Fusarium oxysporum*, *Fusarium culmorum*). Prace nad tym zagadnieniem są poszerzone i będą dotyczyć antagonistycznego działania oryginalnych kultur starterowych (pojedynczych gatunków bakterii i grzybów) na najgroźniejsze patogeny roślin rzepaku.

Literatura

- Boba A., Kulma A., Kostyn K., Starzycki M., Starzycka E., Szopa J. 2011. The influence of carotenoid biosynthesis modification on the *Fusarium culmorum* and *Fusarium oxysporum* resistance in flax. *Physiol. Mol. Plant*, 76: 39-47.
- Ceccanti B., Masciandaro G., Garcia C., Macci C., Doni S. 2006. Soil Bioremediation: Combination of Earthworms and Compost for the Ecological Remediation of a Hydrocarbon Polluted Soil. *Water Air Soil Pollut*, 177: 383-397.
- Cohn B.A., Wolff M.S., Cirillo P.M., Schultz R.I. 2007. DDT and breast cancer in young women: new data on the significance of age at exposure. *Environ Health Perspect*, 115 (10): 1406-1414.

- Czuj T., Żuk M., Starzycki M., Amir R., Szopa J. 2009. Engineering increases in sulfur amino acid contents in flax by over expressing the yeast Met25 gene. *Plant Science*, 177: 584-592.
- Leahy J.G., Cowell R.R. 1990. Microbial degradation of hydrocarbons in the environment. *Microbiol. Rev.*, 54 (3): 305-315.
- Lorenc-Kukuła K., Wróbel-Kwiatkowska M., Starzycki M., Szopa J. 2007. Engineering flax increased flavonoid content and thus *Fusarium* resistance. *Physiological and Molecular Plant Pathology*, ELSEVIER, 70, 1-3: 38-48.
- Margesin R., Zimmerbauer A., Schinner F. 2000. Monitoring of bioremediation by soil biological activities. *Chemosphere*, 40: 339-346.
- Morgan P., Watkinson R.J. 1989. Hydrocarbon degradation in soil and methods for soil biotreatment. *CRC Critical Reviews in Biotechnology*, 8: 305-333.
- Preisner M., Kulma A., Dymińska L., Hanuza J., Arendt M., Starzycki M. 2014. Manipulating cinnamyl alcohol dehydrogenase (CAD) expression in flax affects fibre composition and properties. *BMC Plant Biology*, 14: 50 (<http://www.biomedcentral.com/1471-2229/14/50>).
- Sanko Sangyo Co., Ltd. 2005. Prospects of EM technology in agriculture. http://world.saion-em.co.jp/file_6/file_6-9.pdf.
- Starzycki M., Starzycka E., Szembowski B. 2013. Zastosowanie najnowszych biotechnologii w ochronie roślin przeciw patogenom. W: *Biotechnologia dla rolnictwa i obszarów wiejskich*. Monografia red. W. Denisiuk, Olsztyn: 38-45.
- Starzycki M., Starzycka E. 2007. Fitoplazmy straszą w rzepaku. *TopAgrar Polska*: 92-95.
- Starzycki M., Starzycka E., Pszczoła J. 2007. Development of alloplasmic rape: Advances in Botanical Research. Elsevier Ltd., 45: 313-335.
- Starzycki M., Starzycka E., Dabert M. 2014. Śledzenie zmian w patogeniczności najgroźniejszych chorobotwórczych grzybów rzepaku przy wykorzystaniu technik in vitro i markerów molekularnych. *Monografie i Rozprawy Naukowe*, 48: 296-302.
- Wróbel-Kwiatkowska M., Żebrowski J., Starzycki M., Oszmiański J., Szopa J. 2007a. Engineering of PHB synthesis caused improved elastic properties of flax fibres. *Biotech. Progress*, 230: 269.
- Wróbel-Kwiatkowska M., Starzycki M., Żebrowski J., Oszmiański J., Szopa, J. 2007b. Lignin deficiency in transgenic flax resulted in plants with improved mechanical properties. *J. Biotech.*, 128: 919.
- Verdugo C., Acosta M., Fonllem T., Sing F. 2011. Happiness as Correlate of Sustainable Behavior: A Study of Pro-Ecological, Frugal, Equitable and Altruistic Actions That Promote Subjective Wellbeing. *Human Ecology Review*, 18 (2): 95.
- Vörösmarty C.J., Green P., Salisbury J., Lammers R.B. 2000. Global water resources: vulnerability from climate change and population growth. *Science*, 289: 284-288.
- Zeitoun A.M., Preisner M., Kulma A., Dymińska L., Hanuza J., Starzycki M., Szopa J. 2014. Does biopolymers composition in seeds contribute to the flax resistance against the *Fusarium* infection? *Biotechnology Progress*, 30, 5: 992-1004.
- Zakaria Z., Gairola S, Shariff N.M. 2010. Effective Microorganisms (EM) Technology for Water Quality Restoration and Potential for Sustainable Water Resources and Management. International Environmental Modelling and Software Society (iEMSS). International Congress on Environmental Modelling and Software, Modelling for Environment's Sake, Fifth Biennial Meeting, Ottawa, Canada. <http://www.iemss.org/iemss2010/papers/S0/S.0.04>.