

ELŻBIETA MALUSZYŃSKA ¹
TOMASZ GÓRAL ²
DOROTA WALENTYN-GÓRAL ²

¹ Zakład Nasiennictwa i Nasionoznawstwa

² Zakład Fitopatologii

Instytut Hodowli i Aklimatyzacji Roślin — Państwowy Instytut Badawczy, Radzików

Wpływ wstępnego chłodzenia na zdolność kiełkowania porażonych przez *Fusarium* spp. ziarniaków pszenicy ozimej. Komunikat

Effect of pre-chilling on germination of infected by *Fusarium* spp. winter wheat kernels. Short communication

Badano wpływ długości czasu wstępnego chłodzenia na zdolność kiełkowania nasion pszenicy ozimej (*Triticum aestivum* L.). Materiałem do badań były ziarniaki 5 odmian o różnym stopniu porażenia przez *Fusarium* spp. Analizowano zdolność kiełkowania po 3, 5 i 7 dniach wstępnego chłodzenia oraz bez chłodzenia. Analizy przeprowadzono zgodnie z metodyką zawartą w Przepisach ISTA. Najwyższą zdolność kiełkowania uzyskano po 3 dniach chłodzenia, a najniższą bez chłodzenia. Najmniej siewek nienormalnych i nasion martwych stwierdzono po chłodzeniu przez 3 dni, a najwięcej bez chłodzenia.

Słowa kluczowe: *Fusarium*, porażenie ziarniaków, pszenica ozima, wstępne chłodzenie zdolność kiełkowania

The effect of pre-chilling on germination capacity of winter wheat (*Triticum aestivum* L.) was investigated. The kernels of five varieties with various *Fusarium* infection were tested. Germination capacity after 3, 5 and 7 days of pre-chilling and without pre-chilling were examined. The analyses were conducted according to procedures in ISTA Rules. The highest germination capacity was obtained after 3 days of pre-chilling, and the lowest in variant without pre-chilling. The share of abnormal seedling and dead seeds was the highest in the variant with 3 days of pre-chilling and the lowest in the variant without pre-chilling.

Key words: *Fusarium*, germination capacity, kernels infection, pre-chilling, winter wheat

WSTĘP

Kiełkowanie nasion jest to ukazanie się kielka i rozwój siewki do stadium, w którym wygląd jej podstawowych elementów budowy wskazuje, czy jest lub nie jest możliwy dalszy rozwój w pełną roślinę w korzystnych warunkach w polu (Przepisy ISTA 2016–2018).

Nasiona niektórych gatunków nie kiełkują w odpowiednich dla procesu kiełkowania warunkach wilgotności i temperatury. Takie nasiona określa się jako nasiona w spoczynku (Kozłowski, 1972). W końcowym okresie dojrzewania ziarniaki zbóż wchodzi w spoczynek, co objawia się zahamowaniem zdolności kiełkowania. Zebrane ziarniaki przechodzą dojrzewanie późniwe w czasie przechowywania i uzyskują pełną dojrzałość fizjologiczną (Grzesiuk, Kulka, 1988). U zbóż ozimych czas od zbioru do siewu jest krótki i nieraz w celu oceny zdolności kiełkowania potrzebne jest przerwanie spoczynku ziarniaków. W corocznym wydaniu Międzynarodowych Przepisów Oceny Nasion (2016–2018) jest zapis dotyczący metod przełamania spoczynku nasion. Dla nasion roślin rolniczych polecane jest wstępne chłodzenie do 7 dni w temperaturze od 5 do 10°C. Wstępne chłodzenie oznacza, że nasiona umieszczone są na wilgotnym podłożu i przetrzymywane w niskiej temperaturze przez początkowy okres, przed przeniesieniem do temperatury zalecanej w Przepisach ISTA dla danego gatunku. W próbie nasion obok nasion zdrowych są także nasiona porażone, które wizualnie czasem nie są odróżnialne od nasion zdrowych, jednak spełniają definicję nasion czystych i są poddawane kiełkowaniu.

W badaniach wykorzystano ziarniaki pszenicy uzyskane z kłosów z objawami fuzariozy kłosów. Fuzarioza jest chorobą zbóż powodowana przez grzyby z rodzaju *Fusarium* (Bottalico i Perrone, 2002). Kłosa zbóż infekowane są przede wszystkim w okresie kwitnienia, wtedy, kiedy zboża są najbardziej podatne na infekcję zarodnikami grzybów *Fusarium*. Po infekcji grzyb rozwija się w zakażonym kwiatku przerastając do innych kwiatków w kłosie. Następnie poprzez osadkę kłosową grzyb rozprzestrzenia się na kolejne kłoski (Kang i Buchenauer 2000). Przy silnym porażeniu następuje zamieranie kłosa powyżej miejsca infekcji. Grzyb kolonizuje również rozwijający się ziarniak powodując jego uszkodzenia o różnym nasileniu (Mesterházy, 1995; Argyris i in., 2003). Może to być uszkodzenie zarodka (ziarniak nie rozwija się), obniżenie masy ziarniaków, pomarszczenie ziarniaków, osłabienie zdolności kiełkowania oraz widoczne zasiedlenie ziarniaków przez *Fusarium* spp. (Chełkowski i in., 1990; Jackowiak i in., 2005; Packa i in., 2008). Wytwarzane w procesie patogenezy mykotoksyny gromadzą się w tkankach kłosa oraz w ziarniakach (Snijders, 1990, Miller 2008). Porażenie ma wpływ na wartość siewną ze względu brak lub osłabienie zdolności kiełkowania ziarniaków, a także porażenie siewek przez grzyby *Fusarium* zasiedlające ziarniaki (Wong i in., 1992; Gilbert i in., 2003; Góral i Arseniuk, 2006).

W laboratoriach oceny nasion, często zadawane jest pytanie jak długo chłodzić nasiona zbóż ozimych, aby uzyskać miarodajny wynik, bez nadmiernego wydłużania czasu trwania analizy zdolności kiełkowania. Dlatego podjęto badania dotyczące

określenia długości okresu wstępnego chłodzenia na zdolność kiełkowania pszenicy ozimej.

MATERIAŁ I METODY

Materiałem do badań były ziarniaki czterech odmian pszenicy ozimej (*Triticum aestivum* L.) Fregata, Hondia, Olivin, Petrus i jednego rodu (DL 325/11) z roślin inokulowanych grzybem *Fusarium culmorum* na poletkach o powierzchni 1 m² oraz z kontrolnych (bez inokulacji) w roku 2016 w Radzikowie. Metodyka przeprowadzonego doświadczenia polowego oraz oceny nasilenia fuzariozy kłosów (indeks fuzariozy kłosów — IFK) i uszkodzenia ziarniaków przez *Fusarium* (FDK — Fusarium damaged kernels) została opisana w pracy Góral i in. (2017). Ziarniaki każdej odmiany z poletek inokulowanych, jak i kontrolnych wysiewano po 50 sztuk w 3 powtórzeniach w kuwetach między bibułą zgodnie z metodyką ISTA (2016). Próby z poletek inokulowanych zawierały zarówno ziarniaki uszkodzone (FDK) jak i zdrowe. Zastosowano następujące warianty badanego czynnika: bez wstępnego chłodzenia, 3 dni chłodzenia, 5 dni i 7 dni. Chłodzenie polegało na umieszczeniu wysianej próby w ciemności w temperaturze 7°C. Po określonym czasie chłodzenia próba nasion została przeniesiona do termostatu ze światłem i stałą temperaturą 20°C. Po 8 dniach została zakończona analiza zdolności kiełkowania tzn. oceniono procentowy udział siewek normalnych, siewek nienormalnych, nasion martwych oraz nasion zdrowych, niekiełkujących. Procent kiełkowania to jest zdolność kiełkowania wskazuje na udział liczby nasion, które wytworzyły siewki normalne. Siewki normalne ujawniają zdolność do dalszego rozwoju w pełne rośliny, gdy rosną w korzystnych warunkach wilgotności, temperatury i światła. Zgodnie z definicją w Przepisach ISTA (2016–2018) siewki nienormalne nie wykazują zdolności do rozwoju w normalną roślinę, gdy rosną na dobrym podłożu oraz w korzystnych warunkach. Natomiast nasiona martwe zgodnie z definicją to takie nasiona, które pęcznieją i są zazwyczaj miękkie, odbarwione, najczęściej spleśniałe i nie wykazują żadnych oznak rozwoju siewki.

Obliczenia statystyczne wykonano za pomocą pakietu Microsoft® Excel 2010/XLSTAT©-Ecology (Version 2018.5, Addinsoft, Inc., Brooklyn, NY, USA). Przeprowadzono 1-czynnikową (odmiana) analizę wariancji indeksu fuzariozy kłosów i uszkodzenia ziarniaków (FDK) (XLSTAT: ANOVA). Następnie przeprowadzono dwuczynnikową (odmiana, czas chłodzenia) analizę wariancji dla zdolności kiełkowania, udziału siewek nienormalnych i nasion martwych (XLSTAT: ANOVA). Średnie dla tych cech zostały porównane testem Tukeya.

WYNIKI I DYSKUSJA

Odmiany wybrane do badań różniły się podatnością na fuzariozę kłosów (tab. 1). Najniższe porażenie kłosa (IFK) miały odmiany Fregata i Petrus, natomiast najwyższe porażenie kłosa stwierdzono u rodu DL 325/11. Uszkodzenia ziarniaków (FDK) spowodowane przez grzyby fuzaryjne było najniższe u odmian Fregata i Petrus, a

najwyższe o odmiany Hondia i rodu DL 325/11. Przeprowadzone badania wykazały wpływ działania wstępnego zabiegu jakim było chłodzenie na wynik oceny wartości siewnej nasion, ale tylko u nasion porażonych. U nasion kontroli różnic nie stwierdzono, materiał był jednorodny.

Tabela 1

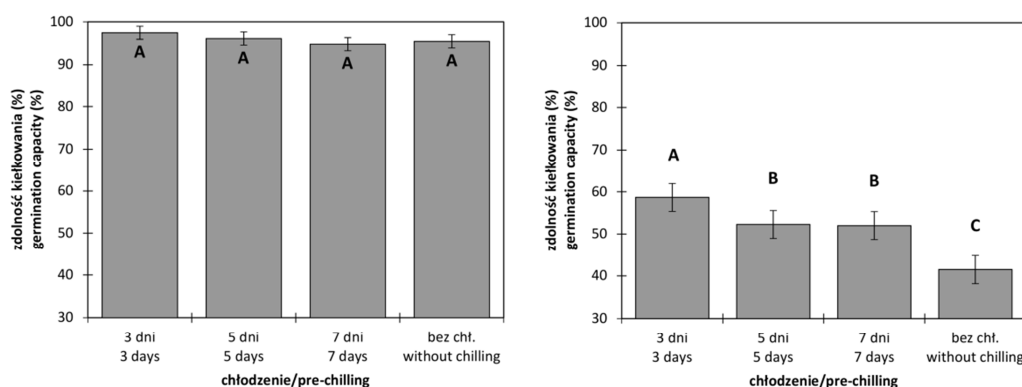
Porażenie kłosa oraz ziarniaków przez *Fusarium* badanych odmian pszenicy ozimej wyrażone jako indeks fuzariozy kłosów (IFK) i stopień uszkodzenia ziarniaków (FDK)
***Fusarium* infection of ear and-kernels of investigated winter wheat varieties expressed as *Fusarium* head blight index (IFK) and *Fusarium* damaged kernels (FDK)**

Odmiana Variety	IFK [%]	FDK [%]
DL325/11/3	48,0 A	30,9 A
Fregata	6,7 B	9,1 B
Hondia	16,3 B	29,6 A
Olivin	16,7 B	16,9 B
Petrus	10,7 B	12,3 B

Średnie oznaczone tą samą literą nie różnią się istotnie na poziomie $p = 0,05$

Means marked with the same letter are not significantly different at $p = 0,05$

Niezależnie od długości czasu chłodzenia, bądź bez tego zabiegu, nasiona kontroli kiełkowały od 93 do 99% tj. wytworzyły bardzo dużo siewek normalnych (rys. 1).



Pionowe kreski oznaczają przedziały ufności dla $p = 0,05$. Średnie oznaczone tymi samymi literami nie różnią się istotnie statystycznie.

The vertical lines indicating confidence intervals for $p = 0,05$. Means marked the same letters did not differ statistically.

Rys. 1. Zdolność kiełkowania nasion kontrolnych (po lewej stronie) i nasion porażonych (po prawej stronie) w zależności od długości czasu wstępnego chłodzenia

Fig. 1. Germination capacity of control (left side) and infected seeds (right side) depending on the length of pre-chilling time

Analiza wariancji wyników dla ziarniaków z poletek kontrolnych wykazała brak wpływu chłodzenia na zdolność kiełkowania oraz udział siewek nienormalnych i nasion martwych. Natomiast analiza wariancji wyników dla ziarniaków z inokulowanych roślin wykazała istotny wpływ zarówno odmiany, jak i długości czasu chłodzenia na wynik

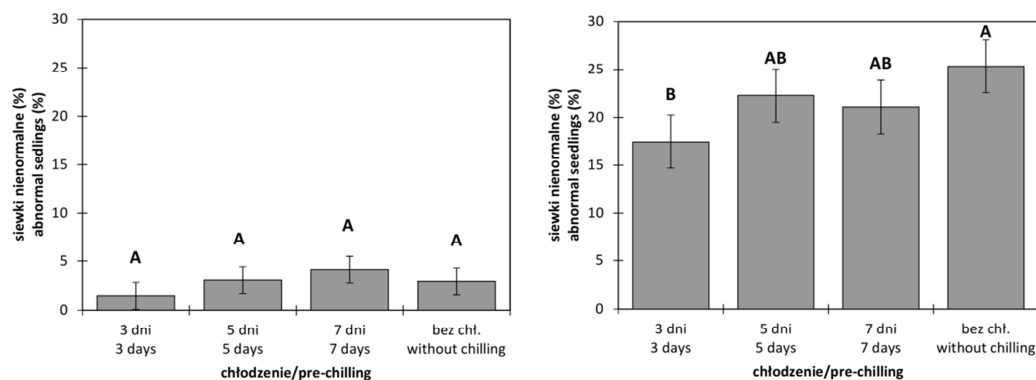
zdolności kiełkowania (tab. 2). Ponieważ do badań użyto odmian o zróżnicowanym porażeniu nasion, to w wyniku otrzymano różną zdolność kiełkowania.

Tabela 2

Analiza wariancji dla cechy zdolność kiełkowania w zależności od odmiany i wstępnego chłodzenia dla nasion porażonych
ANOVA evaluation for comparisons of the infected seeds germination capacity according to variety and pre-chilling

Źródło zmienności Source of variability	SS DF	Suma kwadratów Sum of squares	Średni kwadrat Mean squares	F	Pr > F
Odmiana Variety	4	7923,733	1980,933	49,114	< 0,0001
Chłodzenie Pre-chilling	3	2283,400	761,133	18,871	< 0,0001
Odmiana*chłodzenie Variety*pre-chilling	12	702,933	58,578	1,452	0,183
Błąd Error	40	1613,333	40,333		
Razem Total	59	12523,400			

W zależności od długości czasu chłodzenia najwyższą zdolność kiełkowania dla ziarniaków porażonych uzyskano po 3 dniach chłodzenia, a najniższą bez chłodzenia. Nasiona poddane kiełkowaniu w innych warunkach chłodzenia uzyskały wyniki pośrednie tzn. niższe niż w wariacie po 3 dniach chłodzenia, a wyższe niż w wariacie bez chłodzenia.



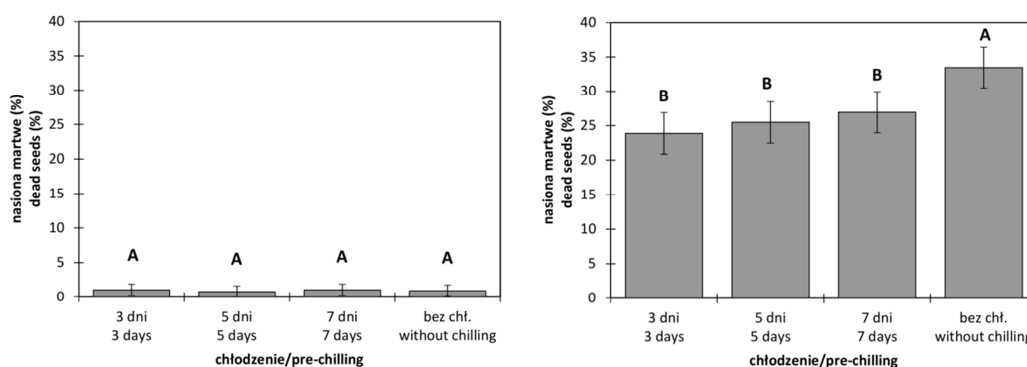
Pionowe kreski oznaczają przedziały ufności dla $p = 0,05$. Średnie oznaczone tymi samymi literami nie różnią się istotnie statystycznie.

The vertical lines indicating confidence intervals for $p = 0.05$. Means marked the same letters did not differ statistically.

Rys. 2. Procent siewek nienormalnych w analizie zdolności kiełkowania nasion kontrolnych (po lewej stronie) i nasion porażonych (po prawej stronie) w zależności od długości czasu wstępnego chłodzenia

Fig. 2. Percentage of abnormal seedlings in germination test of control (left side) and infected seeds (right side) depending on the length of pre-chilling time

Natomiast Henry i Brennan (1988) twierdzili, że najkorzystniejsze jest stosowanie chłodzenia przez jedną dobę oraz dodatek kwasu giberelinowego do przełamania spoczynku nasion. Wyniki prezentowane przez autorów dotyczyły przydatności do badań hodowlanych, a nie do rutynowej oceny wartości siewnej nasion. W prezentowanych badaniach udział siewek nienormalnych był najwyższy w wariancie bez chłodzenia, a najniższy w wariancie po 3 dniach chłodzenia (rys. 2). Siewki nienormalne miały typowe deformacje jak: brak części pędowej, tylko część korzeniową albo pusty lub rozszczepiony koleoptyl. U nasion kontrolnych udział siewek nienormalnych był bardzo mały, niezależnie od długości czasu wstępnego chłodzenia i wynosił zaledwie od 2 do 6%. Na wytwarzanie siewek nienormalnych może mieć wpływ porażenie grzybami, gdy zaatakowany jest kiełek i nie ma dalszego rozwoju siewki. Ponadto uszkodzenia ziarniaków mają wpływ na liczbę siewek nienormalnych co potwierdziły badania Kolasińskiej i Borosa (2004) dotyczące jęczmienia oplewionego i nieoplewionego. Analiza zdolności kiełkowania ziarniaków kontrolnych wykazała znikomy (0–1%) udział nasion martwych niezależnie od długości czasu zabiegu wstępnego, czyli chłodzenia (rys. 3).



Pionowe kreski oznaczają przedziały ufności dla $p = 0,05$. Średnie oznaczone tymi samymi literami nie różnią się istotnie statystycznie.

The vertical lines indicating confidence intervals for $p=0,05$. Means marked the same letters did not differ statistically.

Rys. 3. Procent nasion martwych w analizie zdolności kiełkowania nasion kontrolnych (po lewej stronie) i nasion porażonych (po prawej stronie) w zależności od długości czasu wstępnego chłodzenia
Fig. 3. Percentage of dead seeds in germination test of control (left side) and infected seeds (right side) depending on the length of pre-chilling time

Ocena nasion porażonych wykazała najmniejszy udział nasion martwych po chłodzeniu przez 3 dni, a największy bez chłodzenia. Stała temperatura powyżej 20°C sprzyja rozwojowi grzybów z rodzaju *Fusarium*. Optymalna temperatura do wzrostu *F. culmorum* i *F. graminearum* wynosi 25°C (Ramirez i in., 2004; Hudec i Muchova, 2010; Neagu i Borda, 2013). Z tym, że *F. culmorum*, w odróżnieniu od *F. graminearum* rozwija się dobrze również w niższych temperaturach około 20°C (Hope i in., 2005; Schmidt-Heydt i in., 2011). Z tego względu największy udział nasion martwych wystąpił w wariancie bez chłodzenia. Zastosowanie chłodzenia przez 3 dni opóźniło rozwój

grzybów. Dłuższe chłodzenie nie wykazało istotnego wpływu na wynik zdolności kiełkowania.

W ocenie nasion zalecane są różne metody przełamania spoczynku (Przepisy ISTA 2016–2018). Jedną z metod jest zastosowanie wstępnego chłodzenia w temperaturze pomiędzy 5, a 10°C. Niektóre gatunki zbóż, które nie wykazują głębokiego spoczynku mogą dobrze kiełkować w temperaturze 15°C bez wstępnego chłodzenia (Kozłowski, 1972). Wymieniona wartość temperatury nie jest zalecana do oceny zdolności kiełkowania pszenicy zgodnie z Przepisami ISTA (2016–2018), które obowiązują w ocenie nasion w kraju i w obrocie międzynarodowym.

Na skrócenie spoczynku ziarniaków pszenicy ozimej korzystnie wpływa także przechowywanie ziarna w podwyższonej temperaturze (Łuczyńska, 1964). Jednak taka metoda nie jest powszechnie stosowana w laboratoriach oceny nasion.

Według Webera (2007) poziom odporności odmian pszenicy na choroby fuzaryjne w dużym stopniu zależy nie tylko od genotypu, ale także od przedplonu, sposobu uprawy, warunków atmosferycznych i ekologicznych w danym roku. Dlatego występowanie dużej liczby nasion martwych w analizie zdolności kiełkowania pszenicy ozimej nie jest cechą stałą. Także w badaniach mikrobiologicznych stwierdzono, że zarówno chłód jaki i biologiczna stratyfikacja istotnie zwiększają tempo kiełkowania i wydajność tego procesu.

De Carvalho i in. (2016) oceniali zdolność kiełkowania i żywotność pszenicy zaraz po zbiorze, a także po przechowywaniu przez 30 i 180 dni w 14°C i 60% wilgotności względnej powietrza i stwierdzili, że wstępne chłodzenie ziarniaków przez 3 dni jest najkorzystniejsze do przełamania spoczynku. Potwierdziły to wyniki niniejszych badań.

PODSUMOWANIE

Ocena zdolności kiełkowania pszenicy ozimej zaraz po zbiorze może być trudna z powodu występowania spoczynku późniwego. Stwierdzono, że chłodzenie wstępne trwające 3 dni spowodowało wzrost zdolności kiełkowania. Przedłużanie tego zabiegu do 5 lub 7 dni nie dało zadawalającego rezultatu, to jest polepszenia wyniku zdolności kiełkowania. Przyczyną był duży udział nasion martwych tj. porażonych głównie przez grzyby z rodzaju *Fusarium*. Na podkreślenie zasługuje fakt, że oceniano nasiona wcześniej poddane stresowi biotycznemu, to jest inokulacji szczepami *Fusarium culmorum*.

LITERATURA

- Argyris J., Van Sanford D., TeKrony D. 2003. *Fusarium graminearum* infection during wheat seed development and its effect on seed quality. *Crop Sci.* 43: 1782 — 1788.
- Bottalico, A., Perrone, G. 2002. Toxigenic *Fusarium* species and mycotoxins associated with head blight in small-grain cereals in Europe. *Eur. J. Plant Pathol.* 108: 611 — 624.
- Carvalho T. C. de, de Castro Ohlson O., Panobianco M. 2016. Alternative treatment to stimulate the germination of recently harvested wheat seeds. *J. Seed Sci.* vol. 38 n. 4: 334 — 349.
- Chełkowski, J., Cierniewska, A., Wakuliński, W. 1990. Mycotoxins in cereal grain Part 14. Histochemical examination of *Fusarium*-damaged wheat kernels. *Nahrung* 34: 357 — 361.

- Gilbert J., Woods S.M., Conner R.L., Fernandez M.R., McLaren D. 2003. Role of spring wheat seed infested with *Fusarium graminearum* in spread and development of fusarium head blight and effects on agronomic performance. *Can. J. Plant Pathol.* 25: 73 — 81.
- Góral T., Arseniuk E. 2006. Pathogenicity and resistance in *Fusarium* spp. — wheat, triticale and rye pathosystems at the seedling stage. *Plant Breeding and Seed Science* 54: 3 — 15.
- Góral T., Wiśniewska, H., Ochodzki, P., Walentyn-Góral, D., Grzeszczak, I., Belter, J., Majka, M., Bogacki, J., Drzazga, T., Ługowska, B., Matysik, P., Witkowski, E., Rubrycki, K., Woźna-Pawlak, U. 2017. Fuzarioza kłosów oraz akumulacja toksyn fuzaryjnych w ziarnie rodów hodowlanych pszenicy ozimej. *Biul. IHAR* 282: 17 — 40.
- Grzesiuk S., Kulka K. 1988. *Biologia ziarniaków zbóż*. PWN Warszawa.
- Henry R. J., Brennan P. S. 1988. Dormancy breaking procedures and the breeding of white-grained wheat with resistance to pre-harvest sprouting. *Euphytica* 39 (2): 161 — 166.
- Hope R., Aldred D., Magan N. 2005. Comparison of environmental profiles for growth and deoxynivalenol production by *Fusarium culmorum* and *F. graminearum* on wheat grain. *Lett. Appl. Microbiol.* 40: 295 — 300.
- Hudec K., Muchová D. 2010. Influence of temperature and species origin on *Fusarium* spp. and *Microdochium nivale* pathogenicity to wheat seedlings. *Plant Prot. Sci.* 46: 59–65.
- Jackowiak H., Packa D., Wiwart M., Perkowski J. 2005. Scanning electron microscopy of *Fusarium* damaged kernels of spring wheat. *Int. J. Food Microbiol.* 98: 113 — 123.
- Kang Z., Buchenauer H. 2000. Cytology and ultrastructure of the infection of wheat spikes by *Fusarium culmorum*. *Mycol. Res.* 104: 1083 — 1093.
- Kolańska K., Boros L. 2004. Wpływ sposobu uszlachetniania na wartość siewną nasion jęczmienia jarego oplewionego i nagoziarnistego. *Biul. IHAR* 233 : 81 — 90.
- Kozłowski T.T. 1972. *Seed biology. Volume III Insects and Seed Collection, Storage, Testing and Certification*. Academic Press New York and London.
- Łuczynska J. 1964. Metody określania stanu spoczynkowego ziarna pszenic ozimych. *Biul. IHAR* 3: 139 — 140.
- Mesterházy Á. 1995. Types and components of resistance to *Fusarium* head blight of wheat. *Plant Breed.* 114: 377 — 386.
- Miller J.D. 2008. Mycotoxins in small grains and maize: old problems, new challenges. *Food Addit. Contam.* 25: 219 — 30.
- Neagu C., Borda D. 2013. Modelling the growth of *Fusarium graminearum* on barley and wheat media extract. *Rom Biotechnol. Lett.* 18: 8489 — 8498.
- Packa D., Jackowiak H., Góral T., Wiwart M., Perkowski J. 2008. Scanning electron microscopy of *Fusarium*-infected kernels of winter triticale (*x Triticosecale* Wittmack). *Seed Sci. Biotechnol.* 2: 27 — 31.
- Przepisy ISTA 2016–2018. polska wersja wydania, Zakład Nasiennictwa i Nasionoznawstwa. IHAR-PIB Radzików.
- Ramirez M. L., Chulze S., Magan N. 2004. Impact of environmental factors and fungicides on growth and deoxynivalenol production by *Fusarium graminearum* isolates from Argentinian wheat. *Crop Prot.* 23: 117 — 125.
- Schmidt-Heydt M., Parra R., Geisen R., Magan N. 2011. Modelling the relationship between environmental factors, transcriptional genes and deoxynivalenol mycotoxin production by strains of two *Fusarium* species. *J. R. Soc. Interface* 8: 117 — 126.
- Snijders C.H.A. 1990. *Fusarium* head blight and mycotoxin contamination of wheat, a review. *Netherlands J. Plant Pathol.* 96: 187 — 198.
- Weber R. 2007. Zagrożenie i sposoby ograniczania chorób fuzaryjnych pszenicy. *Post. Nauk Roln.* 2/2007:19 — 31.
- Wong L. S. L., Tekauz A., Leisle D., Abramson D., McKenzie R. I. H. 1992. Prevalence, distribution, and importance of *Fusarium* head blight in wheat in Manitoba. *Can. J. Plant Pathol.* 14: 233 — 238.