

Lp. w zał. do Rozporządzenia MRiRW: 6.

Tytuł zadania: **Poszukiwanie oraz wykorzystanie markerów fenotypowych, metabolicznych i molekularnych do badania typów odporności na fuzariozę kłosów u form pszenicy o zróżnicowanej podatności.**

Kierownik zadania: *dr T. Góral*

Temat badawczy 1: Fenotypowanie porażenia kłosów pszenicy fuzariozą kłosów (badanie odporności typu I i II)

#### Cel

Ocena stopnia porażenia kłosów przez *Fusarium* celem wyboru form odpornych pod względem odporności typu I i II. Tworzenie mieszańców z genotypami odpornymi. Cel tematu został w pełni zrealizowany.

#### Materiały i metody

Odporność na fuzariozę kłosów około 200 genotypów pszenicy testowana była w warunkach polowych w IHAR-PIB Radzików oraz w IGR PAN w Poznaniu (pole doświadczalne Cerekwica). Doświadczenia polowe zostały założone w układzie losowanych bloków. Pszenica wysiana została na poletkach o powierzchni 0,5-1m<sup>2</sup> w trzech powtórzeniach oraz w kombinacji kontrolnej. Do produkcji inokulum zastosowane były 3 izolaty *Fusarium culmorum*, wytwarzające deoksyniwalenol oraz zearalenon. Izolaty te zostały przetestowane pod względem agresywności wobec pszenicy i pszenżyta i były używane do oceny odporności w warunkach polowych. Izolaty były inkubowane na autoklawowanym ziarnie pszenicy w szklanych kolbach przez około 4 tygodni a następnie naświetlane ciągłym światłem UV przez 4 do 7 dni w temperaturze 18°C. Ziarno skolonizowane przez *F. culmorum* było następnie suszone i przechowywane w lodówce w temperaturze 4°C do momentu użycia. W dniu, kiedy wykonywana była inokulacja, ziarno z grzybnią i zarodnikami *F. culmorum* było namaczane w wodzie przez około 2 godziny i następnie filtrowane w celu uzyskania zawiesiny zarodników. Zawiesiny ze wszystkich izolatów były mieszane i stężenie zarodników ustalono na około 5 x 10<sup>5</sup> zar./ml za pomocą hematokrytu. Zastosowana została technika inokulacji przez opryskiwanie. Inokulacja przez opryskiwanie pozwoliła na określenie połączonych typów odporności I i II (odporność na infekcję oraz na rozprzestrzenianie się patogena w tkankach). Technika ta w pewnym stopniu symuluje naturalne warunki infekcji kłosa przez *Fusarium*.

Kłosa pszenicy w fazie kwitnienia były opryskiwane zawiesiną zarodników w ilości około 100 ml zawiesiny na 1 m<sup>2</sup>. Inokulacja przeprowadzona została oddzielnie na każdym poletku na początku kwitnienia i powtórzona została około 3 dni później w fazie pełni kwitnienia. W fazie tej pszenica jest najbardziej wrażliwa na infekcję kłosa przez *Fusarium*. Inokulacje prowadzone były w godzinach wieczornych, kiedy wzrastała względna wilgotność powietrza. Ocenę porażenia rozpoczęto około 10 dni po ostatniej inokulacji. Zostały przeprowadzone 2 oceny w odstępach 7-dniowych. Nasilenie fuzariozy kłosów zostało określone na podstawie proporcji porażonych kłosów w kłosie (tylko w kłosach z objawami choroby) oraz proporcji kłosów prażonych na poletku. Z tych wartości wyliczony został indeks fuzariozy kłosów.

Przebadano odporność typu I (odporność na infekcję) i II (odporność na rozprzestrzenianie się *Fusarium* w kłosie) 74 genotypów pszenicy ozimej oraz 9 odmian/linii wzorcowych. Doświadczenie prowadzono w warunkach częściowo kontrolowanych w tunelu foliowym z instalacją zraszającą. Zastosowana została metoda inokulacji punktowej kłosów. Metoda ta jest używana do szacowania odporności typu II i pozwala na precyzyjne śledzenie rozprzestrzeniania się patogena w kłosie. Kłosa inkulowane były w fazie pełni kwitnienia poprzez umieszczanie kropli (ok. 50 µl) zawiesiny zarodników *Fusarium* w środkowym kwiatku wybranych kłosów za pomocą samo napełniającej się strzykawki. Stężenie zawiesiny wynosiło 50 x 10<sup>3</sup> zar./ml. Inokulowanych było po 10 kłosów danego genotypu. Po inokulacji w tunelu utrzymywana była wysoka wilgotność powietrza stymulująca rozwój choroby. Nasilenie fuzariozy kłosów oceniano poprzez określanie liczby kłosów z objawami choroby. Ocena przeprowadzona została 21 dni po inokulacji.

W celu określenia odporności typu I kłosa pszenicy opryskiwane były zawiesiną zarodników *Fusarium* o stężeniu 10<sup>5</sup> zar./ml. Po 7-10 dniach od inokulacji oceniano liczbę punktów infekcji. Po 21 dniach po inokulacji przeprowadzono dodatkowo ocenę indeksu fuzariozy.

W ramach usługi badawczej prowadzone były doświadczenia infekcyjne w 5 punktach doświadczalnych. Do inokulacji zastosowane zostały te same izolaty *F. culmorum*, co w IHAR-PIB Radzików i IGR PAN. Metodyka doświadczenia była podobna.

### Wyniki i dyskusja

W doświadczeniach infekcyjnych w Radzikowie i Cerekwicy przebadano odporność na fuzariozę kłosów 224 genotypów oraz 10 odmian/linii wzorcowych pszenicy ozimej. Genotypy te pochodziły z krzyżowań prowadzonych w spółkach hodowli roślin (153 genotypy - DW 2014) oraz z kolekcji utworzonej w wyniku badań nad odpornością na fuzariozę kłosów w latach 2008-2013 (72 genotypy – „odporne”). Wzorce stanowiły odmiany wysokoplonujące – KWS Ozon, Patars, Tonacja; linie o wysokiej odporności na fuzariozę kłosów - A40-19-1-2, UNG 136.6.1.1, Arina, 20828; genotypy pszenicy o wysokiej podatności na porażenie kłosa - SMH 8694, SMH 8816, NAD 10079.

Średnie nasilenie fuzariozy kłosów wyniosło w Cerekwicy IFK = 23,9%, natomiast w Radzikowie IFK = 23,5%. Nie było istotnych statystycznie różnic pomiędzy indeksami fuzariozy kłosów w obu miejscowościach. Współczynnik korelacji pomiędzy IFK w Cerekwicy i IFK w Radzikowie był istotny.

Zakres IFK mieścił się w granicach: Cerekwica – 5,9% (STH 1144) -72,5% (KBP\_09\_38), Radzików – 0,5% (UNG 136.6.1.1) – 54,7% (KBP 11 21). Dla genotypów z grupy DW2104 IFK wyniósł: 28,2% w Cerekwicy i 26,8% w Radzikowie, natomiast dla genotypów z grupy „odporne” było to: 15,1% w Cerekwicy i 16,4% w Radzikowie.

Wysokość roślin pszenicy w Cerekwicy była znacznie mniejsza niż w Radzikowie i wynosiła odpowiednio 75,0 cm (52,0–102,0 cm) i 105,4 cm (81,7-136,3 cm). Jedynie 3 genotypy w Cerekwicy miały powyżej 100 cm, natomiast w Radzikowie było to 2/3 genotypów. Jeżeli chodzi o obie badane grupy to grupa odpornych genotypów miała większą średnią wysokość roślin (94,2 cm) w porównaniu do grupy genotypów DW2014 (88,5 cm). W obu lokalizacjach zależności między grupami były takie same.

Wysokość roślin istotnie, lecz słabo korelowała z IFK w Cerekwicy, natomiast w Radzikowie współczynnik korelacji był wysoko istotny. Średnio wysokość roślin miała istotny negatywny wpływ na nasilenie fuzariozy kłosów. Współczynniki korelacji wysokości roślin z IFK były negatywne, co wskazuje na wolniejszy rozwój choroby na kłosach wyższych genotypów. Niższe porażenie wysokich genotypów jest głównie wynikiem morfologii i różnic w mikroklimacie na poziomie kłosa. Jednak większą podatność niskich odmian może wynikać z obecności genu karłowatości *Rht-D1b* (*Rht2*).

Genotypy w grupie „odporne” były istotnie słabiej porażane fuzariozą kłosów. W grupie DW2014 zidentyfikowano również genotypy wykazujące odporność np. STH 1144, POB 0513, STH 2041, NAD 11017. Większość tych genotypów charakteryzowała się jednakże wysokością powyżej 90 cm. Genotypy niskie (poniżej 80 cm) miały indeksy FK przeważnie powyżej 25%. Wyjątek stanowiły genotypy DD 137/10-4 NAD 10041, STH 1124, DL 414/10, DL 414/10/6/3 z grupy DW2014 oraz CHD 6651/06 z grupy odpornych.

W badaniach typów odporności I i II uzyskano zróżnicowanie reakcji genotypów pszenicy w zakresie 1–4 punkty infekcji (PI) dla typu I oraz 1,1–3,8 kłosów porażonych dla typu II. Jeżeli chodzi o typ I odporności to 17 genotypów na 83 badane (20%) miało liczbę punktów infekcji równą 1, natomiast 8 (10%) powyżej 3. Najniższą odporność typu I zanotowano u genotypu KBP10 3,4-4,0 PI. W przypadku odporności typu II, najwyższą (1,1 kłosów porażonych) charakteryzowały się dwa wzorce odporności - A40-19-1-2 (R) i UNG 136.6.1.1 (VR) oraz MOB ZB 301206. Najniższą odporność typu 2 posiadały genotypy STH 1129, NAD 10046 i DD 64/09 (3,7-3,8 kłosa porażonego).

Najwyższą średnią odporność obu typów zanotowano u genotypów: A40-19-1-2 (R), KBP 10 58, DED 316/06, MOB WB 612006, SZD 1604/06 oraz POB 0211. Najniższa była odporność genotypów: SMH 8816 (S), NAD 10079 (S) oraz STH 1129.

Brak było zależności między odpornością obu typów. Odporności obu typów oddzielnie korelowały z indeksami fuzariozy kłosów uzyskanymi w tunelu oraz w doświadczeniach polowych w Cerekwicy i w Radzikowie. Wyższe jednakże były współczynniki korelacji średniej odporności typu I i II z indeksami fuzariozy kłosów.

Analiza składowych głównych pozwoliła zidentyfikować genotypy łączące oba typy odporności oraz odporność „polową”. Były to: wzorce odporne - A40-19-1-2 (R), UNG 136.6.1.1 (VR), Arina (MR)

i 20828 (R) oraz genotypy KBP 10 58, POB 0111, SMH 8553, MOB 5578/06, AND 1055/02, POB 170/04, AND 400/05, POB 0211.

W doświadczeniach w 6 lokalizacjach badano odporność 153 genotypów i 3 odmian wzorcowych na fuzariozę kłosów. Zidentyfikowano genotypy wykazujące odporność na porażenie kłosa we wszystkich środowiskach (włączając Cerekwicę i Radzików). Były to np.: KOH 275, C 3779/10, STH 1144, STH 2170, NAD 11017, STH 188, POB 1013, NAD 11053. Znaleziono również genotypy podatne we wszystkich środowiskach. Były to np.: C 3634/10, KBP\_11\_45, KBP\_10\_4, DM 3404/12, C 489/10, STH 0179, SMH 8644, NAD 10085.

Uzyskane uszeregowanie genotypów pod względem indeksu fuzariozy kłosów w poszczególnych lokalizacjach podlegało silnym wpływom środowiska. Najbardziej odbiegały od pozostałych wyniki uzyskane w NAGRADOWICACH, niskie były również współczynniki korelacji IFK w DĘBINIE i POLANOWICACH z pozostałymi. Największa była zgodność średnich wyników uzyskanych w CEREKWICY i RADZIKOWIE z wynikami ze SMOLIC i KOBIERZYC. Mimo tych rozbieżności współczynnik korelacji średniego IFK w CEREKWICY i RADZIKOWIE ze średnim IFK z 6 lokalizacji był wysoki i wynosił  $r = 0,665$ . Rozbieżności rezultatów uzyskanych w różnych lokalizacjach mogły wynikać w dużym stopniu ze zróżnicowania warunków pogodowych. Szczególnie dotyczy to odpadów w okresie inokulacji kłosów pszenicy – pierwsza dekada czerwca oraz w początkowym okresie rozwoju choroby (czerwiec). Istotny wpływ warunków pogodowych na rozwój fuzariozy kłosów wskazuje na konieczność przeprowadzania doświadczeń infekcyjnych, w co najmniej kilku środowiskach (lokalizacje, lata).

Analiza składowych głównych, w której zmiennymi były indeksy FK z 7 lokalizacji (z wyłączeniem NAGRADOWIC) pozwoliła na identyfikację genotypów o stabilnej reakcji w różnych środowiskach, zarówno podatnych jak i odpornych na fuzariozę kłosów.

W doświadczeniu infekcyjnym w CEREKWICY analizowano odporność na fuzariozę kłosów linii pszenicy ozimej uzyskanych z krzyżowania pszenicy ozimej Turnia z odmianą jarą Sumai3 zawierającą gen odporności *Fhb1*. Odporność linii porównano z odpornością odmian wzorcowych oraz najodporniejszych linii pszenicy z populacji badanej w 2014. Linie TOF6-oz wykazały wysoką odporność na fuzariozę kłosów. Była ona wyższa niż odporność wzorca UNG 136.6.1.1 zawierającego gen *Fhb1*. Dwie linie pszenicy ozimej - C 3779/10, LAD 463/05 wykazały wysoką odporność, zbliżoną do linii TOF6-oz.

W ramach usług badawczych wykonano krzyżowania z przekazanymi z IHAR-PIB 6 liniami odpornymi. W 5 z tych linii w ramach prac w temacie badawczym 4 zidentyfikowano obecność lub brak genu odporności *Fhb1*. Linia A 40-19-1-2 nie zawiera genu *Fhb1*, ponieważ została uzyskana z krzyżowania z linią odporną SVP 72017-17-5-10-1 nie mającą w rodowodzie pozaeuropejskich źródeł odporności. Do krzyżowań wykorzystano również genotypy, które w doświadczeniach prowadzonych w roku 2013 wykazały odporność na fuzariozę kłosów i akumulację mikotoksyn w ziarnie (DC 185/09-2, DC 332/09, DC 21/09-4).

#### Wnioski

1. Zidentyfikowano genotypy pszenicy wykazujące odporność na fuzariozę kłosów warunkach polowych (typ odporności I + II).
2. Potwierdzono odporność większości genotypów z kolekcji from odpornych.
3. Stwierdzono istotny wpływ wysokości roślin na wartość indeksu fuzariozy kłosów.
4. Genotypy odporne miały w większości (ok. 75%) wysokość powyżej średniej dla badanej populacji.
5. Nie było istotnej zależności pomiędzy odpornością typu I i typu II.
6. Odporności typu I i II korelowały z indeksami fuzariozy kłosów z doświadczeń polowych, jednakże wyższe były współczynniki korelacji IFK ze średnią odpornością obu typów.
7. Doświadczenia infekcyjne prowadzone w 6 lokalizacjach pokazały silny wpływ środowiska na nasilenie fuzariozy kłosów, jednakże zidentyfikowano genotypy o stabilnej reakcji (odporne, podatne) w różnych środowiskach.

Temat badawczy 2: Analiza zebranego materiału pod kątem oceny odporności na zasiedlanie ziarniaków (typ III) i elementów struktury plonu (typ V odporności) w formach inokulowanych i kontrolnych

#### Cel

Ocena odporności na uszkodzenie ziarna przez *Fusarium* oraz tolerancji genotypów pszenicy na fuzariozę kłosów celem wyboru form odpornych.

#### Materiały i metody

W czasie żniw zebranych zostało ręcznie po 20-30 kłosów z poletka w doświadczeniach polowych – dla 120 wybranych, wykazujących odporność na fuzariozę kłosów, genotypów z 3 poletek inokulowanych i z poletka kontrolnego. Kłosa młócone były ręcznie lub laboratoryjną młocarnią o słabym nawiewie dla zapobieżenia utraty lekkich porażonych ziarniaków. Proporcja ziarniaków uszkodzonych przez *Fusarium* (typ odporności III) była określana wizualnie poprzez podział próby ziarniaków na ziarniaki zdrowe i ziarniaki z objawami porażenia przez *Fusarium*. Określona została redukcja komponentów plonu ziarna w odniesieniu do prób kontrolnych. Oznaczone zostały następujące komponenty: masa ziarna z kłosa, liczba ziarniaków w kłosie, masa tysiąca ziarniaków.

#### Wyniki i dyskusja

Średnie uszkodzenie ziarniaków 140 genotypów pszenicy w Cerekwicy wyniosło 57,8% wagowo oraz 67,2% liczbowo. Zakres reakcji wyniósł od 14,7% (C 3779/10) do 91,5% (SMH 8817) wagowo oraz od 19,1% (UNG 136.6.1.1, C 3779/10) do 97,0% (SMH 8644) liczbowo.

Najniższe uszkodzenie ziarniaków zanotowano dla genotypów: UNG 136.6.1.1 (VR), C 3779/10, LAD 463/05, STH 9059, A 40-19-1-2 (R), 20828 (R), STH 1144, KOH 275 oraz KBP 1058. Najwyższe dla genotypów: KWS Ozon, SMH 8585, MOB WB 612006, KBH 1131, SMH 8816 (S), NAD 10046, NAD 10079 (S), SMH 8851, SMH 8817 oraz SMH 8644.

Redukcje masy ziarna z kłosa, liczby ziarniaków w kłosie oraz masy 1000 ziarniaków wyniosły odpowiednio 70,7%; 54,2% oraz 39,0%. Zakres reakcji: RMZK – 8,0–95,8%; RLZK – 0-93,7%; RMTZ – 4,0–68,3%

Najniższą redukcję MZK odnotowano dla genotypów Arina, NAD 11017, C 3779/10, LAD 463/05, AND 143/10 oraz NAD 11100. Najniższą redukcję LZK odnotowano dla genotypów: Arina, AND 143/10, NAD 11100, NAD 11017, DM 2566/11, C 3779/10 oraz AND 446/10. Najniższą redukcję MTZ odnotowano dla genotypów: LAD 463/05, KBP 05.271, POB 1013/10, 20828 (R), SMH 8819, UNG 136.6.1.1 (VR) oraz A 40-19-1-2 (R).

Badane zmienne korelowały ze sobą istotnie statystycznie. Najwyższe współczynniki odnotowano dla korelacji IFK C oraz FDK C z redukcją MZK. Najniższe były współczynniki korelacji IFK C z redukcją masy 1000 ziarniaków oraz FDK z redukcją liczby ziarniaków w kłosie. Wysoki był współczynnik korelacji pomiędzy średnim indeksem fuzariozy z Cerekwicy i Radzikowa (odp. typu I + II) (przekształconym logarytmicznie) oraz uszkodzeniem ziarniaków FDK (odp. typu III) (wyrażonym liczbowo). Współczynnik wynosił  $r = 0,656$ . Istotność powyższych korelacji wskazuje, że w przypadku pszenicy podwyższona odporność na porażenie kłosa w dużym stopniu determinuje niskie uszkodzenie ziarniaków i niską redukcję plonu ziarna.

#### Wnioski

1. Badane genotypy wykazały zróżnicowanie odporność typu III oraz typu V.
2. Zidentyfikowano genotypy pszenicy wykazujące niskie uszkodzenie ziarniaków przez *Fusarium*.
3. Zidentyfikowano genotypy pszenicy wykazujące niską redukcję komponentów plonu.
4. Korelacje pomiędzy indeksem fuzariozy kłosów, uszkodzeniem ziarniaków i redukcją plonu ziarna z kłosa były istotne.

#### Temat badawczy 3: Analiza kumulacji/degradacji toksyn fuzaryjnych (typ IV odporności)

##### Cel

Celem planowanych badań jest określenie zawartości ergosterolu (wskaźnik zawartości grzybni) oraz toksyn fuzaryjnych – deoksyniwalenolu i pochodnych, niwalenolu i zearalenonu w ziarnie wybranych genotypów pszenicy wykazujących podwyższoną odporność na porażenie kłosa i uszkodzenie ziarniaków przez *Fusarium*.

##### Materiały i metody

Ziarno z form o najwyższej odporności i niewielkiej obniżce parametrów plonotwórczych analizowane było pod względem zawartości ergosterolu oraz toksyn fuzaryjnych – deoksyniwalenolu, niwalenolu, zearalenonu (typ IV odporności, poszukiwane markery metaboliczne).

Na podstawie indeksu fuzariozy kłosów w Radzikowie i w Poznaniu wybrane zostały najlepsze genotypy (około 35), których ziarno było analizowane na zawartość mikotoksyn wytwarzanych przez

*F. culmorum*. Próby ziarna pochodziły z doświadczeń polowych w Radzikowie i Cerekwicy (razem około 70 prób). Próby ziarna z 3 powtórzeń z każdej lokalizacji zostały zmieszane.

Zawartość ergosterolu określona była metodą wysokosprawnej chromatografii cieczowej. Ergosterol został wyekstrahowany roztworem metanolu w środowisku alkalicznym przy jednoczesnym zmydłaniu z użyciem promieniowania mikrofalowego. Po neutralizacji roztworu, ergosterol został wyekstrahowany do fazy organicznej za pomocą pentanu. Po wysuszeniu w strumieniu azotu ergosterol był rozpuszczany w metanolu i rozdzielany chromatograficznie techniką HPLC na kolumnie krzemionkowej za pomocą metanolu. Detekcja prowadzona była na detektorze UV. Identyfikacja ergosterolu nastąpiła na podstawie czasu retencji. Ilość ergosterolu została określona na podstawie krzywej kalibracyjnej czystego wzorca (metoda wzorca zewnętrznego).

Zawartość trichotecen z grupy B w ziarnie (deoksyniwalenol [DON], niwalenol [NIV]) była analizowana przy wykorzystaniu techniki chromatografii gazowej. Mikotoksyny były ekstrahowane z 5g zmielonego ziarna za pomocą 25 ml wodnego roztworu acetonitrylu (acetonitryl:woda 84:16) poprzez wytrząsanie na wytrząsarce przez noc. Próba została odwirowana (3000 obr\*min<sup>-1</sup>, 5 min.), ekstrakt oczyszczony na kolumnie Trich 227+ (RomerLabs). Do 4 ml oczyszczonego ekstraktu dodano 1 µg wzorca wewnętrznego (chloraloza) i odparowano do sucha w strumieniu powietrza. Mikotoksyny były przeprowadzone w pochodne trimetylosilylowe za pomocą mieszaniny silylującej Sylon BTZ (BSA+TMCS+TMSI, 3:2:3, Supelco). Po rozpuszczeniu upochochnionej próby w izooktanie nadmiar odczynnika silylującego został rozłożony i usunięty za pomocą wody. Warstwa organiczna była przeniesiona do wialki autosamplera i poddana analizie chromatograficznej na chromatografie SRI 8610C, wyposażonym w kolumnę BGB-5MS, o długości 30m. i średnicy wewnętrznej 0,25mm. Gazem nośnym był wodór. Elucję prowadzona była w gradiencie temperatury. Detekcję mikotoksyn przeprowadzono za pomocą detektora wychwyty elektronów (ECD). Identyfikacja poszczególnych związków została wykonana przez porównanie czasów retencji czystych wzorców mikotoksyn. Stężenie mikotoksyn było określone na podstawie krzywej kalibracji, z zastosowaniem chloralozy, jako wzorca wewnętrznego.

Dla porównania przeprowadzone zostały analizy czystych związków (standardy), prób ziarna nieporażonego oraz próby wzorcowe ziarna ze znaną zawartością mikotoksyn.

Zawartość zearalenonu (ZEA) oznaczana była za pomocą ilościowego testu immunoenzymatycznego (ELISA) AgraQuant® ZON 40/1000 (LOD 10 ppb) (Romer Laboratories) zgodnie z procedurą podaną przez producenta.

#### Wyniki i dyskusja

Średnia zawartość DON w ziarnie pszenicy ozimej wynosiła 38,7 ppm (mg/kg). Zakres zawartości DON wynosił od 15,6 ppm (STH 9059) do 115,6 ppm (NAD 11100). Współczynnik zmienności przyjmował wartość 42,4%. Najniższą zawartością DON charakteryzowały się genotypy: STH 9059, KBP 1040, LAD 463/05, NAD 11017, MOB 5578/06, POB 0212. Najwięcej DON stwierdzono w ziarnie genotypów POB 0211, AND 1055/02, POB 0911, NAD 11100. Genotyp AND 1055/02 charakteryzował się słabym porażeniem kłosa oraz średnim uszkodzeniem ziarniaków. W ziarnie pszenicy nie stwierdzono obecności pochodnej DON – 3AcDON oraz niewielkie ilości 15AcDON oraz niwalenolu.

Zawartość DON korelowała istotnie z indeksem fuzariozy kłosów w Cerekwicy oraz z uszkodzeniem ziarniaków. Ten drugi współczynnik przyjmował wyższą wartość. Wysoka była wartość współczynnika korelacji ze średnim indeksem fuzariozy kłosów w Cerekwicy i Radzikowie.

Średnia zawartość zearalenonu w ziarnie pszenicy ozimej wynosiła 932 ppb (mcg/kg). Zakres zawartości ZEA mieścił się w granicach od 48 ppb (STH 1144) do 6450 ppb (NAD 10079 S). Współczynnik zmienności wynosił 129,2%. Najniższą zawartością ZEA charakteryzowały się genotypy: STH 1144, C 4573/10, NAD 11017, C 1/10, STH 008, KBP 1013, STH 9059 i C 3779/10. Najwięcej ZEA stwierdzono w ziarnie genotypów: POB 0112, NAD 11100, KBP 0936.

Zawartość ZEA korelowała istotnie z indeksem fuzariozy kłosów w Cerekwicy oraz z uszkodzeniem ziarniaków. Ten drugi współczynnik przyjmował wyższą wartość. Wysoka była wartość współczynnika korelacji ze średnim indeksem fuzariozy kłosów w Cerekwicy i Radzikowie. Zawartości DON i ZEA korelowały istotnie.

#### Wnioski

1. Badane genotypy wykazały zróżnicowaną odporność typu IV.
2. Zidentyfikowano genotypy pszenicy wykazujące odporność typu IV.

3. Zidentyfikowano genotypy pszenicy wykazujące niską odporność typu IV: niskie wartości IFK i FDK - wysoka zawartość DON, średnie wartości IFK i FDK, niska redukcja masy ziarna – bardzo wysoka zawartość DON.
4. Stopień porażenia kłosów (IFK) oraz uszkodzenie ziarniaków (FDK) korelowały istotnie z zawartością DON i ZEA w ziarnie.
5. Współczynniki korelacji dla ZEA były niższe ze względu na znacznie większą zmienność zawartości tej toksyny w porównaniu do DON.

Temat badawczy 4: Analiza polimorfizmu DNA w loci markerów selekcyjnych dla potencjalnych rodziców wypierających i linii Muszelka+Fhb1

#### Cel

Celem zamierzonych badań było określenie polimorfizmu DNA form rodzicielskich, który pozwoli na wybór zestawu markerów molekularnych wspomagających selekcję osobników pod względem występowania wprowadzanego genu odporności *Fhb1*.

#### Materiały i metody

Do analiz molekularnych wykorzystano zestaw odmian/linii dawców i biorców oraz pierwotne źródło genu *Fhb1* odmianę Sumai3. Dawcami było 10 genotypów pszenicy ozimej pochodzących z Austrii, Węgier oraz badań prowadzonych w ramach programu Postęp Biologiczny w Produkcji Roślinnej (MRiRW lata 2008-2013) w tym otrzymanych linii Muszelka+Fhb1 (AIII62 i AIII75). Natomiast zestaw biorców stanowiło 35 odmian/linii przysłanych przez 5 spółek hodowli roślin.

Analizy molekularne podzielono na dwa etapy: pierwszy, dotyczył analizy homogenności i występowania w badanych materiałach allelu markera molekularnego UMN10 blisko sprzężonego z genem *Fhb1*; drugi, dotyczył analizy polimorfizmu DNA dla 10 markerów flankujących gen *Fhb1*: gwm389, barc238, barc12, gpw7080, gwm493, barc131, wmc754, gpw3248, barc92, cfp1274. Rozdział i analizę znakowanych produktów PCR prowadzono przy użyciu analizatora DNA ABI377XL (Applied Biosystems, Foster City, USA).

#### Wyniki

W wyniku przeprowadzonej analizy locus markera molekularnego UMN10 dla 45 obiektów, stwierdzono poza jednym wyjątkiem homogenność obiektów (austrijska linia dawcy *Fhb1*). Spośród badanych pozostałych 9 dawców odporności, dwie linie wykazywały allel podatności w locus markera UMN10. Natomiast u pozostałych siedmiu linii dawców wykryto allel odporności. W przypadku 35 linii biorców, stwierdzono występowanie u jednej linii (STH 124) allelu odporności i w pozostałych allelu podatności.

W drugim etapie analiz molekularnych poszukiwano polimorfizmu DNA różnicującego 7 linii dawców (tylko z allelem odporności) i 34 linii biorców (tylko z allelem podatności) w loci markerów flankujących gen *Fhb1*. Analizowano układ (kolejność na mapie genetycznej) i wielkość produktów PCR dla poszczególnych loci markerów molekularnych w poszukiwaniu zestawu markerów dla kombinacji dawca-biorca, który umożliwiałby efektywną selekcję pożądanych alleli w populacjach mieszańcowych (potomnych). W związku z tym wybrano zestaw linii do krzyżowań w pięciu kombinacjach: dawca linia AIII62 oraz pięciu biorców, tj. SMH8527, DL414/10, STH1178, MIB11262 i NAD 10041.

#### Dyskusja

W regionie występowania genu *Fhb1* na krótkim ramieniu chromosomu 3B zostało zidentyfikowanych wiele markerów molekularnych (np. UMN10, gwm389, barc131, wmc493 i wmc754), które były wykorzystywane w MAS. Zastosowany w badaniach marker UMN10 potwierdził swoją wartość i jednoznacznie wyróżnił obecność genu *Fhb1* w testowanych liniach dawców, które w większości przypadków są liniami wyprowadzonymi po krzyżowaniach z azjatyckimi źródłami odporności na FHB. Natomiast na 35 badanych potencjalnych linii biorców tylko jedna linia STH124 wykazywała obecność genu *Fhb1*, co jest zgodne z wynikami analiz prowadzonych przez innych badaczy, w których wykazano powszechny brak tego genu odporności w puli genetycznej europejskich pszenic.

#### Wnioski

1. Marker molekularny UMN10 pozwolił na efektywne genotypowanie odmian/linii posiadających gen *Fhb1*.

2. Analiza zestawu markerów flankujących gen *Fhb1* umożliwiła wybranie kombinacji form rodzicielskich, dla których będzie można przeprowadzić efektywną selekcję pożądaných alleli w populacjach mieszańcowych (potomnych).

Temat badawczy 5: Wprowadzanie genu odporności *Fhb1* do genotypów pszenicy z linii Muszelka+Fhb1

Cel

Celem tematu jest wprowadzenie genu odporności *Fhb1* do genotypów pszenicy, który warunkuje zwiększoną odporność kłosów na porażenie przez grzyby z rodzaju *Fusarium*.

Zakres prac zakładany do realizacji celu w roku sprawozdawczym został w pełni wykonany.

Materiały i metody

Na podstawie wyników otrzymanych w zadaniu poprzednim, do krzyżowań wybrano dawcę odporności linię AIII62 (pochodząca od Muszelki+Fhb1) oraz pięciu biorców: SMH8527, DL414/10, STH1178, MIB11262 i NAD10041. Siewki wybranych obiektów jarowizowano (8 tygodni w temp. 4°C), a następnie prowadzono w kontrolowanych warunkach komory klimatycznej: 16 godzin światła/22°C oraz 8 godzin ciemności/18°C. W odpowiedniej fazie rozwojowej kłosa (przed kwitnieniem) formy mateczne (5 linii biorców) kastrowano i po upływie 4-6 dni zapyłano pyłkiem formy ojcowskiej AIII62. Po dojrzewaniu kłosów zebrano nasiona pokolenia F<sub>1</sub> z poszczególnych kombinacji krzyżówkowych.

Wyniki

W poszczególnych kombinacjach krzyżówkowych zebrano od 126 do 262 nasion pokolenia F<sub>1</sub>.

Dyskusja

W hodowli roślin krzyżowania wsteczne (wypierające) są szeroko stosowaną metodą wprowadzania jednej lub kilku cech jednocześnie do genotypów o wysokiej wartości użytkowej (biorca), które tych cech są pozbawione. Wykorzystanie markerów molekularnych w krzyżowaniach wstecznych (ang. Marker Assisted Backcrossing, MABC) zdecydowanie zwiększyło efektywność selekcji pożądaných genotypów. W roszczerzonej wersji MABC, poza selekcją roślin w populacji mieszańcowej, które zawierają marker molekularny sprzężony z wprowadzanym (docelowym) genem (ang. Foreground Selection, FS), dodatkowo poszukuje się obiektów dla których doszło do rekombinacji pomiędzy markerem flankującym i wprowadzanym genem, tzw. selekcja rekombinantów (ang. Recombinant Selection, RS), co ma zapobiec wprowadzeniu do genomu biorcy wielu niepożądanych genów, które mogą być z nim sprzężone.

W przypadku badań prowadzonych w ramach niniejszego tematu, gen *Fhb1* będzie wprowadzany na drodze dwóch krzyżowań wstecznych. Teoretycznie, aby otrzymać po dwóch krzyżowaniach wstecznych przynajmniej jednego osobnika heterozygotycznego dla markera centralnego i homozygotycznego dla flankujących markerów w typie alleli rodziców wypierających (gwm389 i cfp1274) należy w każdym pokoleniu (tj. F<sub>1</sub>BC<sub>1</sub> i F<sub>1</sub>BC<sub>2</sub>) przebadać przynajmniej po 62 osobniki przy poziomie prawdopodobieństwa  $P = 0,99$ . Uzyskane w bieżącym roku liczebności nasion pokolenia F<sub>1</sub> (126–262) w pełni zabezpieczają liczbę form matecznych, które będą wykorzystane do krzyżowań wstecznych w kolejnym roku realizacji tematu.