

# SPRAWOZDANIE MERYTORYCZNE

## z realizacji zadania na rzecz postępu biologicznego w produkcji roślinnej w 2019. Roku

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

2. **Kierownik zadania:** dr hab. Tomasz Góral  
Zakład Fitopatologii, IHAR-PIB, Radzików, 05-870 Błonie  
tel. 22 7334636; e-mail: [t.goral@ihar.edu.pl](mailto:t.goral@ihar.edu.pl)

### Wykonawcy:

Halina Wiśniewska	prof. dr hab.	IGR PAN Poznań
Paweł Czembor	dr hab., prof. IHAR PIB	IHAR-PIB Radzików
Piotr Ochodzki	dr	IHAR-PIB Radzików
Magdalena Radecka-Janusik	dr	IHAR-PIB Radzików

### 3. Cele zadania

- 1) Ocena stopnia porażenia kłosów przez *Fusarium* celem wyboru form odpornych pod względem odporności typu 1 oraz 2
- 2) Ocena odporności na uszkodzenie ziarna przez *Fusarium* oraz tolerancji genotypów pszenicy na fuzariozę kłosów celem wyboru form odpornych
- 3) 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*
- 4) Wykonanie oceny odporności na fuzariozę kłosów dla linii po selekcji molekularnej oraz rozmnożenie co najmniej pięciu wybranych rodzin F3BC2

### 4. Opis tematów badawczych

#### 4. 1. Temat badawczy 1: Fenotypowanie porażenia kłosów pszenicy fuzariozą kłosów (badanie odporności typu 1 i 2)

##### *Cel tematu*

Ocena stopnia porażenia kłosów przez *Fusarium* celem wyboru form odpornych pod względem odporności typu 1 i 2. Tworzenie mieszańców z genotypami odpornymi.

##### *Materiały i metody*

Odporność na fuzariozę kłosów genotypów pszenicy testowana była w warunkach polowych w IHAR Radzików oraz w IGR PAN w Poznaniu (pole doświadczalne Cerekwica). Materiał badawczy stanowiły genotypy, które wykazały odporność w roku 2018 i w latach wcześniejszych (83) oraz nowe niebadane dotychczas genotypy (165). Formy wzorcowe stanowiły odmiany i linie odporne (12) - 20828 [Fhb1-], A40-19-1-2, Arina, Fregata, Olivin, S 10 [Fhb1+], S 11 [Fhb1+], S 12 [Fhb1+], S 13 [Fhb1+], S 30 [Fhb1+], S 32 [Fhb1+], UNG 136.6.1.1 [Fhb1+]; wybrane genotypy o wysokiej podatności na porażenie kłosa (5) - DL 325/11/2, KBP 1416, NAD 10079, SMH 8694, SMH 8816; współczesne odmiany o wysokim plonie (3) - Artist, Patras, RGT Kilimanjaro. W sumie wysiano 268 obiektów w 2 lokalizacjach.

Doświadczenia polowe zostały założone w układzie losowanych bloków. Pszenica wysiana była na poletkach o powierzchni 0,5 lub 1m<sup>2</sup> w trzech powtórzeniach oraz w kombinacji kontrolnej (nieinokulowanej).

Do produkcji inokulum zastosowano 3 izolaty *Fusarium culmorum*, wytwarzające deoksyniwalenol, niwalenol oraz zearalenon. Izolaty te zostały przetestowane pod względem agresywności wobec pszenicy i pszenżyta i były używane do oceny odporności w warunkach polowych. Izolaty inkubowane były na autoklawowanym ziarnie pszenicy w szklanych kolbach przez około 4 tygodni a następnie były 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* namaczano w wodzie przez około 2 godziny i następnie filtrowano w celu uzyskania zawiesiny zarodników. Stężenie zawiesin zarodników ustalono na około 5 x 10<sup>5</sup> zar./ml za pomocą hematokrytu. Zawiesiny ze wszystkich izolatów były mieszane w równych proporcjach.

Zastosowano technikę inokulacji przez opryskiwanie. Pozwoliło to na określenie połączonych typów odporności I (odporność na infekcję) oraz 2 (odp. na rozprzestrzenianie się patogena w tkankach). Kłosa pszenicy w fazie kwitnienia opryskiwano zawiesiną zarodników w ilości około 100 ml zawiesiny na 1 m<sup>2</sup>. Inokulacja prowadzona była oddzielnie na każdym poletku na początku kwitnienia i powtarzana około 3 dni później w fazie pełni kwitnienia. Inokulacje prowadzone były w godzinach wieczornych, kiedy wzrastała względna wilgotność powietrza. W Cerekwicy zastosowano dodatkowe zamglawianie kłosów przez 72 h po inokulacji. Ocena porażenia została rozpoczęta około 10 dni po ostatniej inokulacji. Przeprowadzono dwie oceny w odstępach 7-dniowych. Nasilenie fuzariozy kłosów było określane na podstawie proporcji porażonych kłosków w kłosie (tylko w kłosach z objawami choroby) oraz proporcji kłosów porażonych na poletku. Z tych wartości został wyliczony indeks fuzariozy kłosów (IFK):

$$IFK_i = \frac{\% \text{ porażenia kłosa }_i}{\% \text{ kłosów porażonych na poletku}_i} \times 100$$

W celu przebadania odporności typów 1 i 2 wysiano 98 genotypów pszenicy ozimej w dwóch doświadczeniach w warunkach częściowo kontrolowanych w tunelach foliowych z instalacją zraszającą.

Dla określenia odporności typu 1 kłosa pszenicy opryskiwane były zawiesiną zarodników *F. culmorum* o stężeniu 10<sup>5</sup> zar./ml. Po 7-10 dniach od inokulacji oceniana była liczba punktów infekcji na 10 kłosach na poletku.

Dla określenia odporności typu 2 zastosowana była metoda inokulacji punktowej kłosów (Fot. 4). Metoda ta jest używana do szacowania odporności typu 2 i pozwala na precyzyjne śledzenie rozprzestrzeniania się patogena w kłosie. Kłosa inokulowane były w fazie pełni kwitnienia poprzez umieszczanie kropli (ok. 50 mcl) 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. Nasilenie fuzariozy kłosów oceniane było poprzez określanie liczby kłosków z objawami choroby. Ocena przeprowadzona została 21 dni po inokulacji.

Po inokulacji w tunelach za pomocą systemu zraszającego utrzymywano wysoką wilgotność powietrza stymulującą rozwój choroby.

W ramach usługi badawczej prowadzone były doświadczenia infekcyjne w 5 punktach doświadczalnych (Dębina, Nagradowice, Polanowice, Smolice, Strzelce). W doświadczeniach tych wysiano 165 genotypów oraz 3 odmiany wzorcowe (Artist, Patras, RGT Kilimanjaro). Były to nowe genotypy, których odporność nie była dotychczas badana. Do inokulacji zastosowano te same izolaty *F. culmorum*, co w I HAR Radzików i IGR PAN. Metodyka doświadczenia była podobna.

## **Wyniki**

Warunki pogodowe w roku 2019 w Poznaniu były niesprzyjające dla rozwoju fuzariozy kłosów. W Cerekwicy opady były bardzo niskie w pierwszej dekadzie czerwca. Był to okres kwitnienia pszenicy oraz inokulacji kłosów. Również niskie były opady w kolejnych dwóch dekadach. W drugiej połowie

czerwca wystąpiły bardzo wysokie temperatury dochodzące do 39°C. Zastosowanie systemu zraszania umożliwiło inokulację kłosów. Na początku czerwca opady w Radzikowie były znacznie wyższe co umożliwiło skuteczną inokulację. W trzeciej dekadzie brak było opadów oraz wystąpiły bardzo wysokie temperatury powietrza (do 38°C) **Błąd! Nie można odnaleźć źródła odwołania..** Warunki pogodowe spowodowały zahamowanie rozwoju choroby i tworzenia toksyn.

Średni IFK dla 83 genotypów w Cerekwicy wyniósł 3,5 %, natomiast w Radzikowie 20,0%). Średnie wartości IFK różniły się istotnie. Podobnie istotne były różnice pomiędzy genotypami a wzorcami odpornymi i podatnymi. Zmienność IFK wyższa w Radzikowie i wynosiła 0 – 34,8% w Cerekwicy oraz 1,0 – 56,0 % w Radzikowie.

Wśród genotypów badanych w obu lokalizacjach najwyższą odporność (IFK < 2,9% = średnia 11,7 – odchylenie standardowe 8,85) wykazały wzorce odporne S 10 [Fhb1+], S 13 [Fhb1+], S 12 [Fhb1+], UNG 136.6.1.1 [Fhb1+], S 11 [Fhb1+], 20828 (R), S 32 [Fhb1+], A40-19-1-2 (R), S 30 [Fhb1+] oraz genotyp STH 9059. Odporność wyższą od Fregaty miały genotypy: NAD 13015, KBP 10 58, NAD 13017, NAD 13014, KBP 04.164, AND 82/11/50, STH 2041. Wśród genotypów z DW 2017/2018 najwyższą odporność wykazały: POB 0517, STH 6116 oraz NAD 15105. Najwyższą podatność (IFK > 20,6% = średnia 11,7 + odch. standardowe 8,9) wykazało 5 wzorców podatnych: KBP 14 16, SMH 8816, SMH 8694, DL 325/11/3, NAD 10079 oraz genotypy STH 4433, NAD 15135, DD 506/14, STH 4567, KBP 1633, KBP 1656.

Indeksy fuzariozy kłosów w Radzikowie i Poznaniu (Cerekwicy) korelowały istotnie. Współczynnik wyniósł  $r = 0,669$ ,  $p < 0,001$  ( $R^2 = 0,448$ ).

Mimo niekorzystnych warunków dla rozwoju fuzariozy kłosów w latach 2018 i 2019 współczynnik korelacji indeksów fuzariozy kłosów dla 55 genotypów odpornych badanych w latach 2018 i 2019 w Radzikowie i Poznaniu był istotny ( $r = 0,785$ ,  $p < 0,001$ ). Stabilną odporność na porażenie kłosa wykazały genotypy (nie licząc większości wzorców odpornych): STH 9059, NAD 13015, NAD 13017, NAD 13014, KBP 04.164, KBP 10 58, POB 0316, NAD 13016, POB 0616.

W dwóch doświadczeniach w warunkach kontrolowanych przebadano odporność typu 1 i typu 2 u 89 genotypów. Średnia odporność typu 1 wyniosła 1,54 punktów infekcji (pi), zakres zmienności od 1,00 pi do 2,89 pi. Najwyższą odporność typu 1 ( $pi < 1,14$ ) wykazał wzorec odporny: 20816/2 [Fhb1+] oraz genotypy NAD 13015, KBP 10 40, NAD 13014, POB 0211, POB 0114, STH 105, NAD 11053, NAD 13024, NAD 13017, POB 759/04, DC 332/09-3, DCh 4763/07, POB 0616. Najniższa odporność ( $pi > 2,16$ ) została stwierdzona u genotypów POB 1013/10, STH 2170, STH 032, POB 1216, AND 468/10, STH 8515, DM 3131/10, AND 245/13; trzech wzorców odpornych Fregata, S 30 [Fhb1+], Arina oraz wzorców podatnych NAD 10079 (S), KBP 14 16 (S). Średnia odporność typu 2 wyniosła 2,1 porażonych kłosków (lpk), zakres zmienności od 0,4 lpk do 5,8 lpk. Najwyższą odporność typu 2 ( $lpk \leq 1$ ) wykazało 18 wzorców odpornych. Wysoką odporność miały też genotypy STH 9059, KBP 10 58, STH 5111, STH 6102. Najniższa odporność ( $lpk > 3,1$ ) została stwierdzona u wzorców podatnych oraz odmian Euforia, Sfera, Belenus, Findus, Plejada, Błyskawica, Tobak i Ceres (pszenica twarda).

Najwyższą średnią odporność obu typów ( $< 1,14$ ) wykazało 14 wzorców odpornych i rody: STH 9059, KBP 10 58, STH 5111, STH 6102, KBP 166; natomiast najniższą ( $> 2,5$ ) 3 wzorce podatne i odmiany Euforia, Sfera, Plejada, Błyskawica, Tobak i Ceres (pszenica twarda).

Odporności typu 1 dla 4 grup genotypów były zbliżone i nie różniły się istotnie statystycznie. W przypadku odporności typu 2 była ona najwyższa u wzorców odpornych (większość z genem *Fhb1*), a najniższa dla wzorców podatnych i odmian. Podobne zależności stwierdzono dla uśrednionej odporności obu typów oraz IFK ocenianego w tunelu.

Brak było korelacji obu typów odporności. Odporność typu 1 nie korelowała z IFK w tunelu. Z IFK korelowała natomiast odporność typu 2 ( $r = 0,592$ ) oraz połączone odporności typu 1+2 ( $r = 0,603$ ).

Odporność typu 1 korelowała słabo jedynie z IFK w warunkach polowych w Radzikowie ( $r = 0,271$ ) oraz ze średnim IFK ( $r = 0,244$ ). Odporność typu 2 korelowała z indeksami FK w Poznaniu ( $r = 0,306$ ) i Radzikowie ( $r = 0,690$ ), jednakże współczynnik dla IFK w Radzikowie był dwukrotnie wyższy. Podobne były zależności dla średniej odporności obu typów ( $r = 0,672$  dla średniego IFK). Indeks FK uzyskany w doświadczeniu w tunelu korelował istotnie z indeksami uzyskanymi w doświadczeniach polowych ( $r = 0,648$  dla średniego IFK).

W doświadczeniach w 5 dodatkowych lokalizacjach badano odporność na fuzariozę kłosów 165 genotypów i 3 odmian wzorcowych (Artist, Patras, RGT Kilimanjaro). W Smolicach na skutek niekorzystnych warunków pogodowych wystąpiło bardzo słabe porażenie kłosów oraz przedwczesne zasychanie roślin. Z tego względu nie uwzględniono tych lokalizacji w analizie wyników. W Polanowicach nasilenie fuzariozy kłosów było bardzo duże i zróżnicowanie genotypów było niewielkie. Ponad połowa genotypów miała maksymalne porażenie.

Uzyskane uszeregowanie genotypów pod względem indeksu fuzariozy kłosów w poszczególnych lokalizacjach podlegało silnym wpływom środowiska. W związku z tym wyliczone współczynniki korelacji były istotne, jednakże miały zróżnicowane wartości. Najbardziej odbiegały od wyników uzyskanych w Poznaniu i Radzikowie wyniki z Polanowic. Największa była zgodność wyników uzyskanych w Dębiniu. Średni IFK uzyskany w Radzikowie i Poznaniu korelował istotnie ze średnim indeksem z 4 lokalizacji. Współczynnik korelacji wyniósł  $r = 0,616$ .

Analiza składowych głównych, w której zmiennymi były indeksy FK z 6 lokalizacji pozwoliła na zidentyfikowanie genotypów wykazujących odporność na porażenie kłosa we wszystkich środowiskach. Były to np. STH 6221, NAD 16041, STHD 7246, DL423/15/7, AND 309/15, AND 311/15, SMH 9601, STHD 7124, KBP 17 9, STH 6116, POB 0918, STH 7113. Znalezione również genotypy podatne we wszystkich środowiskach. Były to np.: DL 359/15/8, STH 6474, AND 61/12, SMH 9564, STH 6466, SMH 9617. Najwyższą odporność spośród wzorców wykazała odmiana RGT Kilimanjaro.

Średnio najwyższą odporność miały genotypy uzyskane z HR Strzelce, natomiast najniższą genotypy z HR Smolice i Poznańskiej HR. Średni IFK dla genotypów z HR Strzelce różnił się istotnie od średnich IFK dla genotypów z HR Smolice, PHR i MHR.

### ***Wnioski***

1. Potwierdzono odporność na fuzariozę kłosów warunkach polowych (typ odporności 1+2) części genotypów z kolekcji from odpornych.
2. Zidentyfikowane nowe genotypy wykazujące odporność na fuzariozę kłosów w różnych środowiskach.
3. Zależności pomiędzy odpornością typu 1 i typu 2 była słaba
4. Odporność typu 1 słabo korelowały z indeksem fuzariozy kłosów z doświadczenia polowego, wysoki był współczynniki korelacji IFK odpornością typu 2.
5. Doświadczenia infekcyjne prowadzone w 5 lokalizacjach pokazały bardzo duży wpływ środowiska na nasilenie fuzariozy kłosów.
6. Warunki pogodowe były w tym roku niekorzystne dla rozwoju fuzariozy kłosów, szczególnie w Wielkopolsce, gdzie brak było opadów w okresie kwitnienia pszenicy ozimej.

## **4. 2. Temat badawczy 2: Analiza zebranego materiału pod kątem oceny odporności na zasiedlanie ziarniaków (typ 3 odporności) i redukcję elementów struktury plonu (typ 4 odporności).**

### ***Cel tematu***

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

### ***Materiały i metody***

W czasie zniw zebranych zostało ręcznie po 20 kłosów z poletka w doświadczeniach polowych – dla około 100 wybranych genotypów, wykazujących odporność na fuzariozę kłosów, z 3 poletek inokulowanych i z poletka kontrolnego. Kłosa młócone były ręcznie lub laboratoryjną młocarnią o słabym nawiewie dla zapobieżenia utracie lekkich porażonych ziarniaków. Proporcja ziarniaków uszkodzonych przez *Fusarium* (typ odporności 3) była określana wizualnie poprzez podział próby ziarniaków na ziarniaki zdrowe i ziarniaki z objawami porażenia przez *Fusarium*. Wyliczono wartość FDK (=Fusarium damaged kernels) w oparciu o masę ziarniaków uszkodzonych (FDK masa) oraz ich

liczbę (FDK liczba) w odniesieniu do masy lub liczebności całej próby. Określona została względna wartość komponentów plonu ziarna w odniesieniu do prób kontrolnych. Oznaczone zostały następujące komponenty: masa ziarna z kłosa, liczba ziarniaków w kłosie, masa tysiąca ziarniaków.

### **Wyniki**

Średnie uszkodzenie ziarniaków przez *Fusarium* w doświadczeniu w Poznaniu wyniosło FDK masa = 2,7% oraz FDK liczba = 4,7%. Zakres zmienności wynosił dla FDK masa od 0,2 do 11,7% oraz dla FDK liczba od 0,3 do 17,3%.

Średnie uszkodzenie ziarniaków przez *Fusarium* w doświadczeniu w Radzikowie wyniosło FDK masa = 3,3% oraz FDK liczba = 5,3%. Zakres zmienności wynosił dla FDK masa od 0,2 do 16,5% oraz dla FDK liczba od 0,4 do 21,9%.

Najniższe średnie uszkodzenie ziarniaków (FDK liczba < 1,9% = średnia – odchylenie standardowe) miało 9 wzorców odpornych i genotypy STH 9059, SMH 7983. Niskie uszkodzenie miały genotypy: KBP 04.164, STH 6130, POB 0316, STH 008, POB 0111, POB 170/04, STH 6116, SMH 7974. Wśród genotypów z DW 18/19 niskie uszkodzenie miały DC 15.556, AND 1090/15, DC 15.571, NAD 16041, DD 589/15. Najwyższe uszkodzenie (FDK liczba > 8,7% = średnia + odchylenie standardowe) odnotowano u 2 wzorców podatnych i 13 genotypów z grupy DW 18/19, np. SMH 9558, STHD 7504, AND 5469/16, DL 416/15/2.

Indeks fuzariozy kłosów uzyskany w Poznaniu korelował istotnie z uszkodzeniem ziarniaków w Poznaniu. Podobne współczynniki uzyskano dla korelacji FDK z IFK w Radzikowie. Średni IFK korelował istotnie ze wartościami średnimi FDK m ( $r = 0,783$ ) i FDK L ( $r = 0,785$ ).

Redukcja komponentów plonu (RMZK, RLZK, RMTZ) na skutek porażenia kosów przez *Fusarium* wyniosła w Poznaniu odpowiednio 18,2%; 11,9%; 10,5%. W doświadczeniu w Radzikowie było to 11,1%; 5,9% oraz 8,7%.

Średnia redukcja plonu ziarna z kłosa (RMZK) na skutek porażenia kosów przez *Fusarium* wyniosła 14,6%. Zakres zmienności cechy 0 – 39,1%. Liczba ziarniaków w kłosie (LZK) została zredukowana średnio o 18,9%. Zakres zmienności cechy 0 – 25,3%. Masa tysiąca ziarniaków (MTZ) została zredukowana średnio o 9,6%. Zakres zmienności cechy 0,9 – 26,3%.

Najniższą redukcję masy ziarna z kłosa w odniesieniu do kontroli (RMZK < 5,3%) odnotowano u 9 wzorców odpornych, 7 genotypów z grupy odpornych: STH 6116, STH 6151, POB 0616, KBP 04.164, KBP 10 58, NAD 13017, NAD 13015 oraz 4 genotypów z DW 18/19: SMH 9382, DL339/15/5, DC 15.556, AND 1090/15. Najsilniejszej redukcji uległ plon ziarna z kłosa u genotypów u wzorców podatnych, odmian Artist i Patras, trzech genotypów odpornych 1115, STH 008 i NAD 15105 oraz 7 genotypów z grupy DW 18/19.

Pośród powyższych genotypów o niskiej redukcji MZK trzy miały najwyższą redukcję LZK – AND 1090/15, SMH 9382, DL339/15/5, natomiast 6 najwyższą redukcję MTZ – SMH 9382, DC 15.556, NAD 13017, DL339/15/5, KBP 10 58.

Średni indeks fuzariozy kłosów (Poznań + Radzików) korelował z redukcjami komponentów plonu. Podobne wartości przyjmowały współczynniki korelacji z uszkodzeniem ziarniaków. Najwyższe były współczynniki korelacji z redukcją MTZ ( $r = 0,727$  dla IFK i  $r = 0,684$  dla FDK L).

Zidentyfikowano genotypy łączące odporność na porażenie kłosa (typ 1+2), uszkodzenie ziarniaków (typ 3) oraz niską redukcję plonu ziarna (typ 4). Były to (nie licząc wzorców odpornych): z DW 18/19 - DC 15.556, DL 339/15/5, AND 1090/15; z grupy odpornych – STH 9059, KBP 04.164, POB 0616, KBP 10 58, NAD 13017, STH 6116, NAD 13015, STH 6151, LAD 463/05, POB 170/04, POB 0517, POB 0111. Niektóre genotypy o wyższym porażeniu kłosa i ziarniaków wykazały niską redukcję plonu ziarna. Były to np. SMH 9382, SMH 9611, DC 15.961, POB 0818.

## ***Wnioski***

1. Badane genotypy wykazały zróżnicowaną odporność na uszkodzenie ziarniaków przez *Fusarium* (typ 3).
2. Indeks fuzariozy kłosów istotnie korelował z uszkodzeniem ziarniaków pszenicy. Współczynniki miały wartości wyższe niż w roku 2017 i zbliżone do uzyskanych w roku 2018.
3. Fuzarioza kłosów powodowała redukcję plonu ziarna z kłosa (typ 4 odporności).
4. Stwierdzono istotne korelacje indeksu fuzariozy kłosów i uszkodzenia ziarniaków z redukcją plonu ziarna, współczynniki miały wysokie wartości
5. Zidentyfikowano genotypy o łączące podwyższoną odporność typu 1+2, 3 i 4.
6. Niektóre genotypy o średnim porażeniu kłosa i uszkodzeniu ziarniaków wykazały bardzo niską redukcję plonu ziarna.

### **4.3. Temat badawczy 3: Analiza akumulacji/degradacji toksyn fuzaryjnych (typ 5 odporności)**

#### ***Cel tematu***

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 5 odporności, poszukiwane markery metaboliczne).

Na podstawie indeksu fuzariozy kłosów w Radzikowie, w Poznaniu wybrane zostały najlepsze genotypy (około 45), których ziarno było analizowane na zawartość mykotoksyn wytwarzanych przez *F. culmorum*. Próby ziarna pochodziły z doświadczeń polowych Radzikowie i Cerekwicy (razem około 70 prób). Próby ziarna z 3 powtórzeń z każdej lokalizacja 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 trichotecenów z grupy B w ziarnie (deoksyniwalenol [DON], 3-acetyl deoksyniwalenol [3AcDON], 15-acetyl deoksyniwalenol [15AcDON], niwalenol [NIV]) była analizowana przy wykorzystaniu techniki chromatografii gazowej. Mykotoksyny były ekstrahowane z 5 g 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.), a 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. Mykotoksyny były przeprowadzone w pochodne trimetylosilylowe za pomocą mieszaniny silylującej Sylon BTZ (BSA+TMCS+TMSI, 3:2:3, Supelco). Po rozpuszczeniu upochodnionej 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. Elucja prowadzona była w gradiencie temperatury. Detekcję mykotoksyn przeprowadzono za pomocą detektora wychwytu elektronów (ECD). Identyfikacja poszczególnych związków została wykonana przez porównanie czasów retencji czystych wzorców mykotoksyn. Stężenie mykotoksyn 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 mykotoksyn.

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

### **Wyniki**

Średnia zawartość deoksyniwalenolu (DON) w ziarnie badanych genotypów wynosiła 1,750 mg/kg. Zakres zmienności od 0,092 (S 11 [Fhb1+]) do 8,863 mg/kg (DL325/11/3 (S)). W próbach z Poznania zawartość DON była wyższa i wyniosła 2,290 mg/kg (0,105 – 13,998 mg/kg). W Radzikowie natomiast była 2-krotnie niższa i wynosiła 1,211 mg/kg (0– 4,306 mg/kg).

Stwierdzono obecność pochodnej acetylowej DON – 3AcDON w ziarnie pszenicy. Zawartość tej toksyny była bardzo niska. Wyniosła średnio 0,076 mg/kg, zakres zmienności od 0 do 0,459 mg/kg. Nie stwierdzono obecności 15AcDON.

Średnia zawartość niwalenolu (NIV) w ziarnie badanych genotypów była niższa niż zawartość DON i wynosiła 0,477 mg/kg. Zakres zmienności od 0,013 (S 32 [Fhb1+]) do 1,657 mg/kg (DC 1718/13). W próbach z Poznania i Radzikowa zawartości NIV były zbliżone, odpowiednio 0,499 mg/k (0 – 2,580 mg/kg) oraz 0,455 mg/kg (0 – 2,481 mg/kg).

Średnia sumaryczna zawartość trichotecenów z grupy B w ziarnie genotypów pszenicy wynosiła 2,304 mg/kg. Zakres zmienności od 0,124 (S 11 [Fhb1+]) do 1,940 mg/kg (DL325/11/3 (S)). W próbach z Poznania zawartość trichotecenów z grupy B wyniosła 2,905 mg/kg (0,128 – 17,385 mg/kg). W Radzikowie natomiast była niższa i wynosiła 1,704 mg/kg (0 – 5,330 mg/kg).

Zawartość ZEN w ziarnie była bardzo niska i jedynie w 15 próbach (na 144 analizowane) przekroczyła limit detekcji LOD = 0,020 mg/kg. Najwięcej ZEN było w 3 próbach wzorców podatnych z Radzikowa.

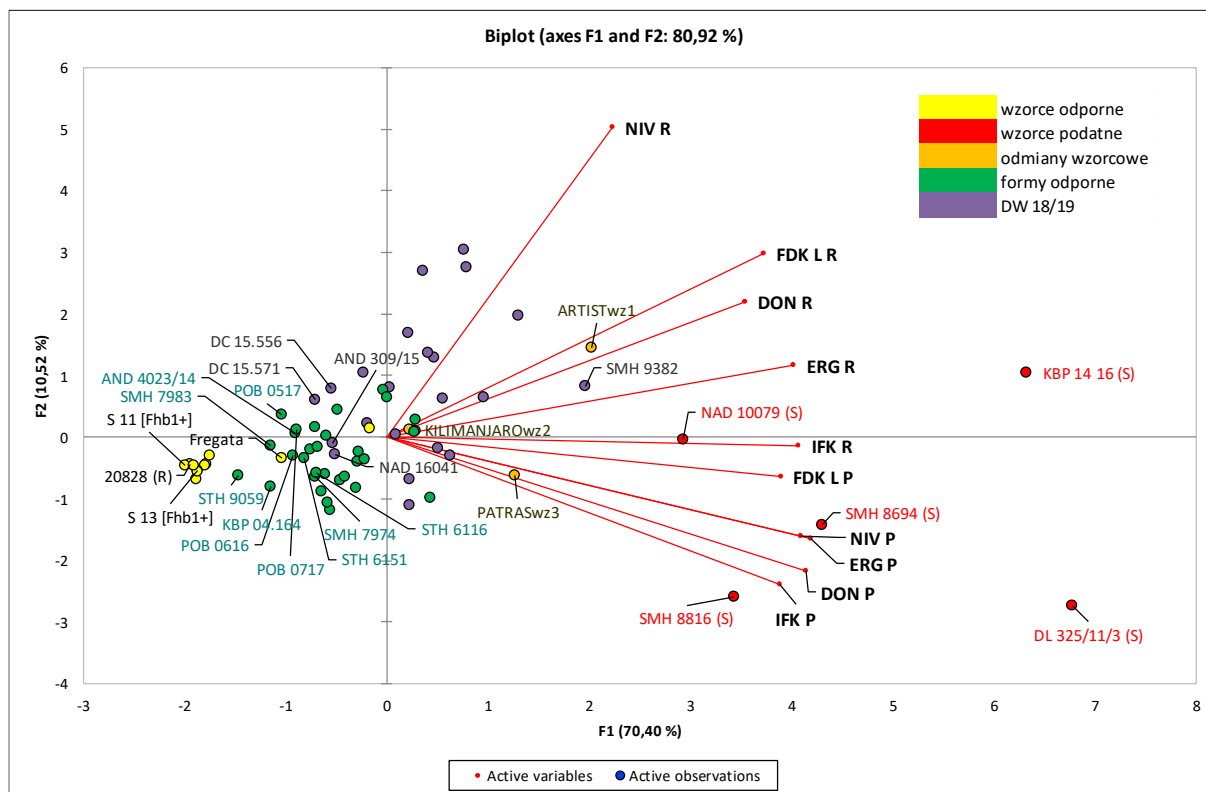
Najmniej DON stwierdzono w ziarnie wzorców 10 wzorców odpornych (z wyjątkiem Ariny) oraz genotypów POB 0717, POB 0517, STH 9059 i KBP 04.164. Wśród genotypów z DW 2018/2019 najmniej DON akumulowały DC 15.571, NAD 16041 i DC 15.556. Najwięcej DON było akumulowane w ziarnie wzorców podatnych, odmian Artist i Patars oraz genotypu SMH 9382 z DW 2019/2019.

Najmniej NIV stwierdzono w ziarnie wzorców 9 wzorców odpornych (z wyjątkiem Ariny i Fregaty) oraz genotypów POB 0517, SMH 7983, AND 4023/14, STH 9059, POB 0111. Wśród genotypów z DW 2018/2019 najmniej NIV akumulowały AND 309/15, DD 589/15, DC 15.556, NAD 16041. Najwięcej NIV było akumulowane w ziarnie wzorców podatnych, odmiany Artist oraz 6 genotypów z DW 2019/2019.

Średnia zawartość ergosterolu w ziarnie pszenicy wyniosła 5,25 mg/kg. Zakres zmienności mieścił się w granicach od 1,60 mg/kg (S 11 [Fhb1+]) do 18,36 mg/kg (KBP 14 16 S).

Indeks fuzariozy kłosów korelował istotnie z zawartością trichotecenów. Najwyższy był współczynnik korelacji z sumą trichotecenów ( $r = 0,835$ ), najniższy dla 3AcDON ( $r = 0,622$ ). Uszkodzenie ziarniaków korelowało z zawartością wszystkich toksyn, najwyższy był współczynnik korelacji z sumą trichotecenów ( $r = 0,922$  dla FDK L). Stężenie DON korelowało istotnie z zawartością NIV ( $r = 0,848$ ).

Analiza wieloczynnikowa wykazała, że w grupie wzorców odpornych najwyższą odporność różnych typów wykazały linie 20828, S11 [Fhb1+] i S13 [Fhb1+] (Rysunek 1). W grupie genotypów wykazujących odporność w latach poprzednich były to STH 9059, SMH 7983, KBP 04.164, POB 0517, POB 0616, POB 0717, SMH 7974, AND 4023/14, POB 170/04, NAD 13017, STH 6130, STH 6151, POB 0316, STH 6116, POB 0111, NAD 13024, POB 679/03, NAD 13014. Wśród genotypów z DW 2018/2019 najwyższą odporność różnych typów wykazały AND 309/15, NAD 16041, DC 15.556 i DC 15.571. Najwyższą podatnością charakteryzowało się 5 wzorców podatnych oraz genotyp SMH 9382 z DW 2018/2019. Z tym że jego podatność była zbliżona do podatności odmian wzorcowych Artist i Patars.



Rysunek 1. Układ współrzędnych dwóch składowych głównych dla 72 genotypów pszenicy ozimej. Składowe wyjaśniają 80,92 zmienności odporności na fuzariozę kłosów mierzoną IFK, FDK L oraz akumulacją ergosterolu (ERG) i trichotecenów z grupy B (DON, NIV) w ziarnie z doświadczeń w Poznaniu (P) i Radzikowie (R). Wektory wskazują kierunek wzrostu wartości zmiennych.

Porównano zawartości toksyn w ziarnie 39 genotypów badanych w latach 2018 i 2019. Zawartości DON korelowały istotnie ( $r = 0,629$ ), wyższy był współczynnik korelacji dla NIV ( $r = 0,773$ ). Współczynnik korelacji dla sumarycznej zawartości trichotecenów B był istotny i wynosił  $r = 0,790$ .

Ranking genotypów na podstawie zawartości trichotecenów B był w obu latach zbliżony. Jedynie odmiana Fregata wykazała niższą zawartość trichotecenów B (głównie DON) w roku 2019 niż w roku 2018 (w porównaniu do innych genotypów). Wyższą zawartość DON miały natomiast 3 odmiany wzorcowe i genotypy NAD 13041 i NAD 15105. Najniższą średnią zawartość toksyn miało 9 wzorców odpornych w tym 7 z genem *Fhb1* oraz genotypy STH 9059, STH 6151, POB 0517, POB 679/03, STH 6116, POB 0111 i AND 4023/14.

### **Wnioski**

1. Badane genotypy pszenicy wykazały zróżnicowaną odporność typu 5 oraz zidentyfikowano genotypy wykazujące podwyższoną odporność tego typu.
2. Stwierdzono małe różnice pomiędzy dwiema lokalizacjami, jeżeli chodzi o akumulację toksyn DON i NIV w ziarnie.
3. Indeks fuzariozy kłosów i stopień uszkodzenia ziarniaków korelowały wysoko istotnie z zawartością trichotecenów w ziarnie.
4. Zidentyfikowano genotypy łączące podwyższonej odporności różnego typu.



#### 4. 4. Temat badawczy 4

##### *Cel tematu badawczego 4*

Celem zadania było przeprowadzenie oceny odporności na fuzariozę kłosa dla linii pszenicy po selekcji molekularnej oraz rozmnożenie co najmniej pięciu wybranych rodzin F<sub>3</sub>BC<sub>2</sub>. Cel został zrealizowany.

##### *Materiały i metody*

W doświadczeniu wykorzystano nasiona zebrane z roślin pokolenia F<sub>2</sub>BC<sub>2</sub> wybrane po selekcji wspomaganej markerami molekularnymi (MAS) przeprowadzonej w roku 2018. Rośliny te pochodziły z pięciu kombinacji krzyżówkowych, gdzie dawcą genu odporności na fuzariozę była linia AIII62/1, natomiast biorcami – linie SMH8527, DL414/10, STH1178, MIB11262 oraz NAD10041. Do testów fitopatologicznych wybrano 49 linii zawierających gen *Fhb1*, tzn. homozygotycznych w typie rodzica dawcy w loci markerów sprzężonych z genem oraz (w miarę możliwości) homozygotycznych w typie rodzica wypierającego w loci markerów flankujących. Dodatkowo wybrano 15 linii kontrolnych (obiekty po krzyżowaniach wstecznych, ale bez genu *Fhb1*), w których nie wykryto genu odporności, 23 wzorce odporne (w większości z genem *Fhb1*) i 5 wzorców podatnych oraz 12 odmian o różnej podatności.

W celu przebadania odporności na fuzariozę kłosów typu 1 (na infekcję pierwotną) i typu 2 (na rozprzestrzenianie się *Fusarium* w kłosie) wybrane linie i wzorce wysiano w dwóch doświadczeniach w warunkach częściowo kontrolowanych w tunelach foliowych z instalacją zraszającą. Dla określenia odporności typu 1 kłosa pszenicy opryskiwane były zawiesiną zarodników 2 izolatów chemotypu 3ADON *F. culmorum* o stężeniu 10<sup>5</sup> zar./ml. Po 7-10 dniach od inokulacji oceniano liczbę punktów infekcji na 10 kłosach na poletku. Dla określenia odporności typu 2 zastosowano metodę inokulacji punktowej kłosów. Kłosa inokulowane były w fazie pełni kwitnienia poprzez umieszczanie kropli (ok. 50 µl) zawiesiny zarodników *F. culmorum* w środkowym kwiatku wybranych kłosów za pomocą samo napełniającej się strzykawki. Stężenie zawiesiny wynosiło 50 × 10<sup>3</sup> zar./ml. Wykorzystano te same izolaty, których użyto do badania odporności typu 1. Każdym izolatem inokulowano po 5 kłosów danej linii. Nasilenie fuzariozy kłosów oceniano poprzez określanie liczby kłosków z objawami choroby. Ocenę przeprowadzono 21 dni po inokulacji. W czasie trwania doświadczenia wysoką wilgotność powietrza stymulującą rozwój choroby utrzymywano za pomocą systemu zraszającego.

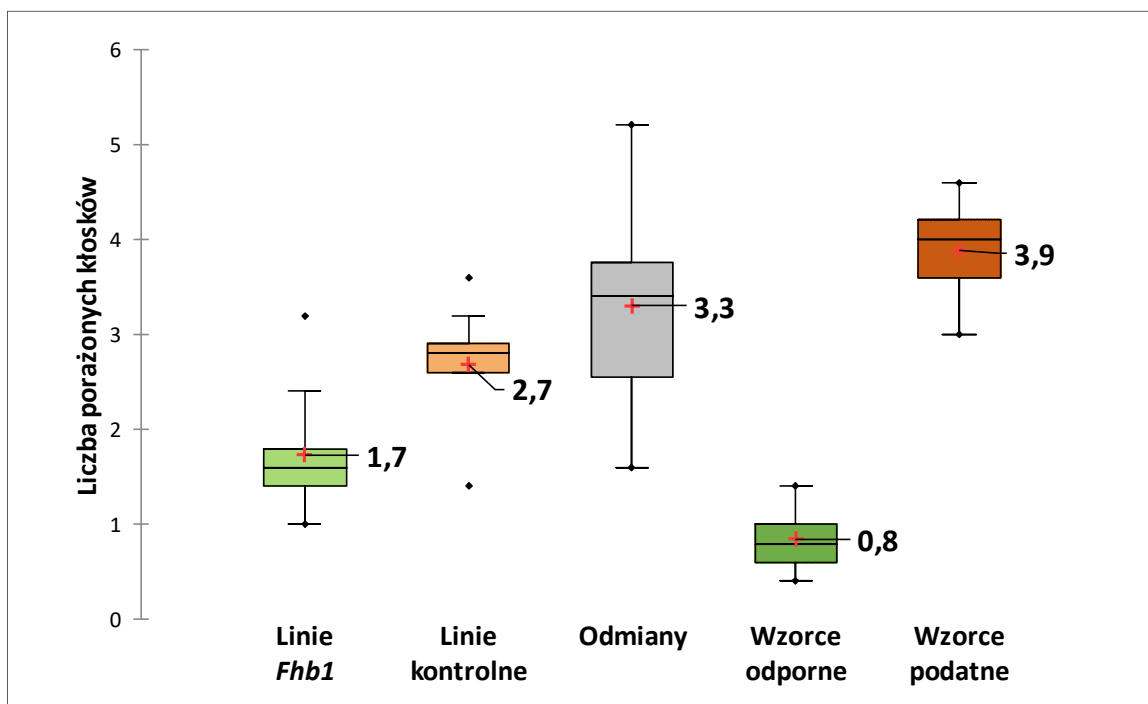
Po zakończeniu doświadczenia z każdej rodziny F<sub>3</sub>BC<sub>2</sub> zebrano nasiona, które zostaną wykorzystane w kolejnym roku badań.

##### *Wyniki*

Wyniki uzyskane w badaniu odporności typu 1 dla 49 linii pszenicy z genem *Fhb1* pochodzących ze wszystkich pięciu rodzin F<sub>3</sub>BC<sub>2</sub> zawierały się w przedziale od 1 do 2,4 pi (punkty infekcji), natomiast dla typu 2 od 1 do 3,2 pk (porażone kłoski). Wyniki dla 15 linii kontrolnych mieściły się w przedziałach 1,2 – 2,0 pi i 1,4 – 3,6 pk, odpowiednio dla typów 1 i 2. Średnie wartości odporności typu 1 i 2 dla linii z genem *Fhb1* wyniosły odpowiednio 1,6 pi i 1,7 pk. Dla linii kontrolnych wartości te wyniosły 1,6 pi i 2,7 pk.

Linie z genem *Fhb1* i linie kontrolne nie różniły się od siebie istotnie pod względem odporności typu 1. Nie wykryto również istotnych różnic pomiędzy badanymi liniami a wzorcami odpornymi (w większości z genem *Fhb1*) i podatnymi. Różnice wykryto natomiast w odporności typu 2, co obrazuje załączony wykres pudełkowy (Rysunek 2), zgodnie z którym linie z genem *Fhb1* wykazywały istotnie wyższą odporność na rozprzestrzenianie się *Fusarium* w kłosie w porównaniu do linii kontrolnych, odmian i wzorców podatnych oraz istotnie mniejszą odporność w porównaniu do wzorców odpornych.

Porównano również wyniki uzyskane w badaniach odporności obu typów dla poszczególnych rodzin F<sub>3</sub>BC<sub>2</sub> zawierających gen *Fhb1*. Istotne różnice wykryto jedynie w odporności typu 1 pomiędzy rodzinami FUS 27 i FUS 34. Nie wykryto istotnych różnic w odporności typu 2 pomiędzy badanymi rodzinami zawierającymi gen *Fhb1*.



Rysunek 2. Wykres pudełkowy obrazujący różnice w odporności typu 2 u badanych linii/odmian pszenicy.

### ***Wnioski***

1. Linie z genem *Fhb1* pochodzące z pięciu rodzin F<sub>3</sub>BC<sub>2</sub> wykazywały istotnie wyższą odporność niż linie kontrolne, odmiany oraz wzorce podatne.
2. Uzyskane wyniki potwierdzają opisywany w literaturze wpływ genu *Fhb1* na odporność typu 2.