

# SPRAWOZDANIE MERYTORYCZNE

z realizacji zadania na rzecz postępu biologicznego w produkcji roślinnej w 2017 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 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
Michał Kwiatek	dr	IGR PAN Poznań
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 i 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) Uzyskanie pokolenia F<sub>2</sub>BC<sub>2</sub> pięciu kombinacji krzyżówkowych pszenicy ozimej po wcześniejszej selekcji molekularnej osobników pokolenia F<sub>1</sub>BC<sub>2</sub> na obecność genu *Fhb1* odporności na fuzariozę kłosa.

### 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 2016 i w latach wcześniejszych (104) oraz nowe niebadane dotychczas genotypy (159). Formy wzorcowe stanowiły odmiany i linie odporne - 20828 [Fhb1-], A40-19-1-2, Arina, Fregata, Olivin, UNG 136.6.1.1 [Fhb1+], S 10 [Fhb1+], S 11 [Fhb1+], S 12 [Fhb1+], S 13 [Fhb1+], S 30 [Fhb1+], S 32 [Fhb1+], S 38 [Fhb1-], S 43 [Fhb1+] oraz wybrane genotypy o wysokiej podatności na porażenie kłosa - DL 325/11/2, KBP 1416, NAD 10079, SMH 8694, SMH 8816. W sumie wysiano 282 obiektów w 2 lokalizacjach.

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

Do produkcji inokulum zastosowano 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 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  $5 \times 10^5$  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 1 (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 zamgławianie kłosów przez 72 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 kłosów 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 80 genotypów pszenicy ozimej w dwóch doświadczeniach w warunkach częściowo kontrolowanych w tunelach foliowych z instalacją zraszającą.

Dla określenia odporności typu I kłosa pszenicy opryskiwane były zawiesiną zarodników *F. culmorum* o stężeniu  $10^5$  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 (Buerstmayr i in. 2002, Miedaner i in. 2003). 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  $50 \times 10^3$  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, Kobierzyce, Nagradowice, Polanowice, Smolice, Strzelce). W doświadczeniach tych wysiano 153 genotypy. Były to nowe genotypy, których odporność nie była dotychczas badana. Do inokulacji zastosowano te same izolaty *F. culmorum*, co w IHAR Radzików i IGR PAN. Metodyka doświadczenia była podobna.

## Wyniki

Warunki pogodowe w Cerekwicy w roku 2017 były bardziej sprzyjające dla rozwoju fuzariozy kłosów i tworzenia się toksyn niż w Radzikowie (Tabela 1). Wysoka suma opadów w Radzikowie w czerwcu wynikała z bardzo wysokiego jednorazowego opadu (73 mm) w dniu 28 czerwca, a więc około 3 tygodni po inokulacji. W lipcu opady w Cerekwicy były znacznie wyższe niż w Radzikowie.

Tabela 1. Temperatura i opady w maju, czerwcu, lipcu i sierpniu 2017 w dwóch lokalizacjach doświadczalnych (Poznań/Cerekwica i Radzików).

Miesiąc	Poznań		Radzików	
	Opady (mm)	Temp. °C	Opady (mm)	Temp. °C
Maj 2017	52,8	13,6	57,0	14,6
Czerwiec 2017	53,4	17,4	126,6	18,4
Lipiec 2017	168,0	17,8	70,0	18,9
Sierpień 2017	80,2	18,7	35,6	19,6

Średni IFK dla 123 genotypów w Cerekwicy wyniósł 13,4 %, natomiast w Radzikowie 17,5%. Średnie wartości IFK różniły się istotnie. W Radzikowie zmienność IFK był wyższa (0 – 58,7%) niż w Cerekwicy (3,4 – 47,5%). Spośród genotypów badanych w obu lokalizacjach najwyższą odporność ( $IFK < 7,4\%$  = średnia 15,4 – odchylenie standardowe 8,0) wykazały wzorce odporne: S 13 [Fhb1+], S 43 [Fhb1+], Fregata, 20828 [Fhb1-], S 38 [Fhb1-], S 32 [Fhb1+], A40-19-1-2, UNG 136.6.1.1 [Fhb1+], S 10 [Fhb1+], S 11 [Fhb1+], S 12 [Fhb1+] oraz genotypy: STH 032, STH 2041, KOH 275, POB 0514.

Najwyższą podatność ( $IFK > 23,4\%$  = średnia 15,4 + odchylenie standardowe 8,0) wykazały wzorce podatne: KBP 14 16, SMH 8816, SMH 8694, DL 325/11/3, NAD 10079 oraz genotypy: DD 248/12, KBH 4785/04, STH 805, KOH 361, KBP 14 14, AND 143/10, HRSM 889, KBP 05.284.

Wysokość roślin istotnie korelowała z IFK w Cerekwicy i Radzikowie, jednakże współczynniki były niskie. Współczynnik korelacji ze średnim IFK dla obu lokalizacji wyniósł  $r=-0,414$ . Uwzględniając wysokość wyliczono IFK poprawiony ( $IFK_{popr.} = IFK_i \times \frac{W_{ysi}}{W_{ys}}$ ). Ranking najbardziej podatnych genotypów nie zmienił się, natomiast w grupie najbardziej odpornych znalazły się dodatkowo dwa genotypy DL 423/11/2 (80,7 cm) i AND 4023/14 (92,7 cm).

Termin kwitnienia pszenicy korelował z nasileniem fuzariozy kłosów w obu lokalizacjach jednakże współczynniki były bardzo niskie. Podobnie niski był współczynnik korelacji ze średnim IFK dla obu lokalizacji ( $r=0,289$ ). W bieżącym roku kwitnienie było późne (średnio 13 dni od 30.05). Różnica między najwcześniejszymi genotypami i najpóźniejszymi wynosiła 8 dni.

Współczynnik korelacji indeksów fuzariozy kłosów dla 72 genotypów odpornych badanych w latach 2016 i 2017 był istotny ( $r=0,712$ ). Stabilną odporność na porażenie kłosa wykazały genotypy (nie licząc większości wzorców odpornych): POB 679/03, POB 0514, STH 2041, DL 423/11/2, KBP 05.271, STH 032, KOH 275, STH 105, AND 260/10, POB 0211.

W dwóch doświadczeniach w warunkach kontrolowanych przebadano odporność typu 1 i typu 2 u 89 genotypów. Średnia odporność typu 1 wyniosła 1,76 punktów infekcji (pi), zakres zmienności od 1,10 pi do 2,70 pi. Najwyższą odporność typu 1 ( $pi < 1,37$ ) wykazały wzorce odporne: S 32 [Fhb1+], S 10 [Fhb1+], UNG 226 [Fhb1+], S 11 [Fhb1+], S 13 [Fhb1+], 20816/2 [Fhb1+] oraz genotypy STH 087, AND 468/10, POB 0814 SMH 8980, DD 248/12, DC 189/11, KBP 10 40. Najniższa odporność ( $pi > 2,16$ ) została stwierdzona u genotypów 1115, POB 0211, KBP 296/59, AND 143/10, NAD 13024, KBP 139, DC 648/09, KBP 14 14, POB 0111, (S), AND 446/10, MOB ZB 301206; dwóch wzorców podatnych SMH 8694 i DM 2728/09 oraz wzorca odpornego Arina.

Średnia odporność typu 2 wyniosła 3,08 porażonych kłosów (pk), zakres zmienności od 1,00 pk do 7,40 pk. Najwyższą odporność typu 2 ( $pk < 1,91$ ) wykazały wzorce odporne: 20816/2 [Fhb1+], 20816/3 [Fhb1+], 20816/5 [Fhb1+], UNG 226 [Fhb1+], UNG136.16.7.4 [Fhb1+], S 32 [Fhb1+], S43-1 [Fhb1+], S 13 [Fhb1+], S 10 [Fhb1+], S 12 [Fhb1+], S 11 [Fhb1+], UNG 136.6.1.1 [Fhb1+] oraz genotypy KBP 09 36, POB 0111, DM 3873/10 (wzorzec akumulujący duże ilości DON w ziarnie). Najniższa odporność ( $pi > 4,26$ ) została stwierdzona u genotypów: AND 260/10, SMH 9062, DM 2566/11, KOH 361, DC 393/11, CHD 6651/06, AND 468/10, SMH 9005, DD 248/12 i wzorców podatnych SMH 8816, DL325/11/3, KBP 14 16.

Najwyższą średnią odporność obu typów ( $< 1,79$ ) wykazały wzorce odporne: 20816/2 [Fhb1+], UNG 226 [Fhb1+], S 32 [Fhb1+], 20816/3 [Fhb1+], 20816/5 [Fhb1+], UNG136.16.7.4 [Fhb1+], S 10 [Fhb1+], S 13 [Fhb1+], S 11 [Fhb1+], S 12 [Fhb1+], S43-1 [Fhb1+], S 30 [Fhb1+] oraz genotypy DM 3873/10 (wzorzec akumulujący duże ilości DON w ziarnie), KBP 09 36; natomiast najniższą ( $> 3,05$ ) genotypy: DD 248/12, HRSM 889, AND 260/10, SMH 9062, DM 2566/11, CHD 6651/06, SMH 9005 oraz wzorce podatne SMH 8694, SMH 8816, DL325/11/3, KBP 14 16. Wysoka była również odporność następujących genotypów: NAD 13014, POB 679/03, KBP 10 40, NAD 13015, NAD 13016, POB 0111, POB 0814, 1115.

Brak było korelacji obu typów odporności. Odporność typu 2 korelowała istotnie z IFK warunkach polowych w Radzikowie ( $r=0,780$ ) natomiast nie było korelacji odporności typu 1 z IFK. Współczynnik korelacji dla średniej odporności obu typów z IFK warunkach polowych wyniósł  $r=0,756$ .

W doświadczeniach w 6 dodatkowych lokalizacjach przebadano odporność na fuzariozę kłosów 153 genotypów i 3 odmian wzorcowych (Artist, Patras, RGT Kilimanjaro). W Smolicach na skutek niekorzystnych warunków pogodowych wystąpiło bardzo słabe porażenie kłosów dlatego też nie uwzględniono tej lokalizacji w analizie wyników.

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 niskie wartości. Najbardziej odbiegały od pozostałych wyniki

uzyskane w Polanowicach. Największa była zgodność wyników uzyskanych w Strzelcach i Dębinie. Średni IFK uzyskany w Radzikowie i Poznaniu korelował istotnie indeksami z poszczególnych lokalizacji. Najwyższy był współczynnik korelacji dla IFK uzyskanego w Strzelcach. Współczynnik korelacji z średnim IFK z 4 lokalizacji wyniósł  $r=0,642$ .

Analiza składowych głównych, w której zmiennymi były indeksy FK z 5 lokalizacji pozwoliła na zidentyfikowanie genotypów wykazujących odporność na porażenie kłosa we wszystkich środowiskach. Były to np.: AND 82/11/50, POB 1016, POB 1216, NAD 14008, STH 5483, AND 532/11, AND 245/13, STH 4317, POB 0616, POB 0216, POB 0816, POB 0516, SMH 9523, NAD 14020, POB 0316, STH 5407, KBP 296/48, SMH 9326, STH 5485, DM 850/14. Znalezione również genotypy podatne we wszystkich środowiskach. Były to np.: KBP 15.2, MIB 14135, SMH 9260, KBP 15.18, AND 198/13, SMH 9243, KBP 15.17, DL 215/13/5, SMH 9409, KBP 14 44, SMH 9356, AND 197/13, DL 330/13/8, SMH 9313, DL 358/13/4. Najwyższą odporność spośród wzorców wykazała odmiana RGT Kilimanjaro.

### **Wnioski**

1. Potwierdzono odporność na fuzariozę kłosów warunkach polowych (typ odporności 1+2) większości genotypów z kolekcji from odpornych.
2. Zidentyfikowane nowe genotypy wykazujące odporność na fuzariozę kłosów w różnych środowiskach.
3. Nie było istotnej zależności pomiędzy odpornością typu 1 i typu 2.
4. Odporność typu 1 słabo korelowała z indeksem fuzariozy kłosów z doświadczenia polowego, wyższy był współczynnik korelacji IFK odpornością typu 2.
5. Doświadczenia infekcyjne prowadzone w 5 lokalizacjach pokazały silny wpływ środowiska na nasilenie fuzariozy kłosów.

**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 żniw zebranych zostało ręcznie po 20-30 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* (Argyris i in. 2003). 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 = 15,2% oraz FDK liczba = 16,9%. W Radzikowie było to FDK masa = 7,4% oraz FDK liczba = 8,9%. Średnie FDK w obu lokalizacjach wyniosło FDK masa = 11,3% oraz FDK liczba = 12,9%. Zakres zmienności wyniósł dla FDK masa od 1,6 do 40,5% oraz dla FDK liczba od 1,3 do 42,1%. Najniższe uszkodzenie ziarniaków (FDK liczba < 6,6% = średnia – odchylenie standardowe) miały wzorce odporne: S 43 [Fhb1+], S 38 [Fhb1-], S 32 [Fhb1+], S 11 [Fhb1+], S 10 [Fhb1+], S 13 [Fhb1+], Fregata, S 12 [Fhb1+] oraz genotypy POB 679/03, SMH 7983, STH 032, POB 170/04, STH 2041. Najwyższe uszkodzenie (FDK liczba > 19,2% = średnia + odchylenie standardowe) odnotowano u genotypów: AND 340/06-1, STH 3010, C 41/10, AND 179/13, NAD 06133, AND 46810, DL 463/07, HRSM 902, NAD 14020; u odmian wzorcowych: Artist, Patras oraz u wzorców podatnych: SMH 8816, DL 325/11/3, DL 358 /13/4, KBP 14 16.

Redukcja plonu ziarna z kłosa (RMZK) na skutek porażenia kosów przez *Fusarium* wyniosła średnio 34,8%. Zakres zmienności cechy 0 – 74,2%. Liczba ziarniaków w kłosie (LZK) została zredukowana średnio o około 27,6,8%. Zakres zmienności cechy 3,0 – 61,4%. Masa tysiąca ziarniaków (MTZ) została zredukowana średnio o 14,1%. Zakres zmienności cechy 1,1 – 31,0%.

Najniższą redukcję masy ziarna z kłosa w odniesieniu do kontroli (RMZK < 24,0%) odnotowano u wzorców odpornych: S 10 [Fhb1+], S 32 [Fhb1+], 20828 [Fhb1-], S 11 [Fhb1+], UNG 136.6.1.1 [Fhb1+], Fregata oraz genotypów: POB 0816, KBP 10 58, STH 105, POB 0316, POB 0514, STH 9059, POB 0616, STH 008, STH 2041, POB 170/04, STH 032. Dwa z pośród tych genotypów (POB 0316, POB 0816) miały uszkodzenie ziarniaków powyżej średniej. Najsilniejszej redukcji uległ plon ziarna z kłosa u genotypów: NAD 14020, STH 5308, KBP 15.12, HRSM 902, AND 179/13, STH 8515; odmian Artist, Patras i RGT Kilimanjaro oraz wzorców podatnych SMH 8694, NAD 10079, DL 325/11/3, KBP 14 16, DL 423/11/2, DL 358 /13/4.

Indeks fuzariozy kłosów korelował wysoko istotnie z uszkodzeniem ziarniaków, a także z redukcją komponentów plonu, jednak współczynniki były niższe. Najwyższą wartość miał współczynnik korelacji z redukcją MZK. Stopień uszkodzenia ziarniaków korelował istotnie z redukcjami komponentów plonu. Wartości współczynników były zbliżone do tych dla IFK.

Zidentyfikowano genotypy łączące odporność na porażenie kłosa (typ 1+2), uszkodzenie ziarniaków (typ 3) oraz niską redukcję plonu ziarna (typ 4). Były to: POB 0514, STH 105, STH 2041, STH 9059, KBP 10 58, POB 170/04, POB 679/03, STH 008 oraz większość wzorców odpornych. Genotyp POB 0316 miał średnie porażenie kłosa, wysoki poziom uszkodzenia ziarniaków i równocześnie bardzo niską redukcję komponentów plonu. Podobna reakcja wystąpiła u genotypów POB 0816 i POB 1216, natomiast genotyp POB 0616, mimo porażenia kłosa powyżej średniej miał niskie uszkodzenie ziarniaków i niską redukcję plonu.

### **Wnioski**

1. Badane genotypy wykazały zróżnicowaną odporność na uszkodzenie ziarniaków przez *Fusarium* (typ 3).
2. Indeks fuzariozy kłosów istotnie korelował z uszkodzeniem ziarniaków pszenicy.
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.
5. Zidentyfikowano genotypy o łączące typy odporności 1+2, 3 i 4.

### **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 mikotoksyn wytwarzanych przez *F. culmorum*. Próby ziarna pochodziły z doświadczeń polowych 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 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. Mikotoksyny 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 wiązki autosamplera i poddana analizie chromatograficznej na chromatografii 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 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 (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 ergosterolu (ERG) wyniosła 20,3 mg/kg, zakres zmienności od 4,4 do 74,3 mg/kg. Najmniej ERG było w ziarnie wzorców odpornych: S 38 [Fhb1-], S 10 [Fhb1+], S 43 [Fhb1+], S 32 [Fhb1+] i genotypów: POB 0111, SMH 7983, NAD 13015; najwięcej w ziarnie genotypów: Artist, DD 559/07, Patras, AND 4008/10, C 3779/10 i wzorców podatnych: DL 325/11/2, KBP 1416, DL 358 /13/4.

Średnia zawartość deoksyniwalenolu (DON) w ziarnie badanych genotypów pszenicy wynosiła 7,825 mg/kg. Zakres zmienności od 1,390 do 25,000 mg/kg. Dla wzorców odpornych było to 4,323 mg/kg (1,390 – 12,915 mg/kg), dla wzorców podatnych 14,668 mg/kg (8,925 – 25,000 mg/kg) oraz dla wzorców o wysokiej akumulacji toksyn 19,563 mg/kg (7,740 – 10,961 mg/kg). Najmniej DON stwierdzono w ziarnie genotypów: S 10 [Fhb1+], S 38 [Fhb1-], S 32 [Fhb1+], S 43 [Fhb1+], NAD 13015, SMH 7983; najwięcej DON było akumulowane w ziarnie genotypów: AND 1055/02, Patras, Artist, DCh 47 67/07, AND 4008/10, C 3779/10 oraz wzorców podatnych: KBP 1416, DL 325/11/2, DL 358 /13/4.

Stwierdzono obecność w ziarnie pszenicy pochodnej acetylowej DON – 3AcDON oraz niwalenolu (NIV). Brak było pochodnej acetylowej 15AcDON. Zawartość 3AcDON wyniosła średnio 0,283 mg/kg, zakres zmienności od 0,050 do 1,087 mg/kg. Średnia zawartość NIV była dwukrotnie niższa od zawartości DON i wyniosła 3,097 mg/kg, zakres zmienności od 0,470 do 13,745 mg/kg. Wzorce odporne akumulowały średnio 1,831 mg/kg NIV, wzorce podatne 7,887 mg/kg oraz wzorce o wysokiej akumulacji toksyn 3,254 mg/kg.

Średnia sumaryczna zawartość trichotecenów z grupy B w ziarnie genotypów pszenicy wynosiła 11,205 mg/kg. Zakres zmienności od 2,457 do 39,832 mg/kg. Dla wzorców odpornych było to 6,291 mg/kg (2,457 – 15,540 mg/kg), dla wzorców podatnych 23,188 mg/kg (14,762 – 39,832 mg/kg) oraz dla wzorców o wysokiej akumulacji toksyn 13,104 mg/kg (9,068 – 15,643 mg/kg). Najmniej trichotecenów B stwierdzono w ziarnie genotypów S 32 [Fhb1+], S 38 [Fhb1-], S 10 [Fhb1+], S 43 [Fhb1+], S 30 [Fhb1+], POB 0111, SMH 7983, POB 679/03, 20828 [Fhb1-]; najwięcej w ziarnie genotypów KBP 05.284, DD 559/07, DCh 47 67/07, Artist, AND 4008/10, Patras, C 3779/10 oraz wzorców podatnych: DL 325/11/2, KBP 1416, DL 358 /13/4.

Zawartość zearalenonu (ZEN) w ziarnie pszenicy była wysoka i wynosiła średnio 601 µg/kg. Zakres zmienności od 78 do 4195 µg/kg. Najmniej ZEN stwierdzono w ziarnie genotypów: S 38 [Fhb1-], S 32 [Fhb1+], STH 105, S 10 [Fhb1+], S 43 [Fhb1+], 20828 [Fhb1-], S 30 [Fhb1+], A 40-19-1-29, POB 679/03, Fregata, KBP 10 58; najwięcej w ziarnie genotypów: SMH 8816 (S), RGT Kilimanjaro, SMH 8694 (S), AND 245/13, Artist, DL 325/11/2 (S), KBP 08 13, KBP 14.16 (S), DL 358 /13/4 (S).

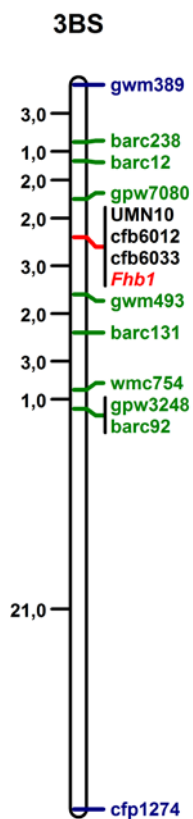
Indeks fuzariozy kłosów korelował istotnie z zawartością trichotecenów oraz zearalenonu w ziarnie. Najniższy był współczynnik korelacji DON, najwyższy dla 3AcDON. Wysoki był współczynnik korelacji IFK z zawartością ZEN. Uszkodzenie ziarniaków korelowało istotnie z zawartościami wszystkich toksyn. Najwyższy był współczynnik dla 3AcDON i NIV, najniższy dla DON. Zawartość ERG korelowała wysoko istotnie z zawartościami trichotecenów, niższy był współczynnik dla ZEN.

Rysunek 1. Układ współrzędnych dwóch składowych głównych dla 77 genotypów pszenicy ozimej. Składowe wyjaśniają 90,479% zmienności odporności na fuzariozę kłosów mierzonej indeksem fuzariozy kłosów (IFK), uszkodzeniem ziarniaków (FDK L, m) oraz zawartością ergosterolu (ERG), zearalenonu (ZEN) i trichotecenów z grupy B (DON, 3AcDON, NIV) w ziarnie. Wektory wskazują kierunek wzrostu wartości zmiennych.

## 7



1. Badane genotypy pszenicy wykazały zróżnicowaną odporność typu 5 oraz zidentyfikowano genotypy wykazujące podwyższoną odporność tego typu.
2. Indeks fuzariozy kłosów i stopień uszkodzenia ziarniaków korelowały istotnie z zawartością trichotecenów w ziarnie.
3. Korelacja indeksu fuzariozy kłosów, stopnia uszkodzenia ziarniaków była w przypadku zearalenonu zbliżona do obserwowanej dla trichotecenów.
4. Zidentyfikowano genotypy łączące podwyższony poziom odporności różnego typu.



Rys. 2. Częściowa mapa molekularna krótkiego ramienia chromosomu pszenicy 3B zawierająca marker centralny (ozn. kolorem czarnym) blisko sprzężony z genem *Fhb1* i flankujące (ozn. kolorem zielonym i niebieskim) (Somers i in. 2004, Liu i in. 2008, Paux i in. 2008, GrainGenes 2012).

**4. 4. Temat badawczy 4:** MAS dla co najmniej 470 roślin  $F_1BC_2$  oraz uzyskanie pokolenia  $F_2BC_2$  dla 5 kombinacji.

#### *Cel tematu badawczego 4*

Celem tematu było uzyskanie pokolenia  $F_2BC_2$  pięciu kombinacji krzyżówkowych pszenicy ozimej po wcześniejszej selekcji molekularnej osobników pokolenia  $F_1BC_2$  na obecność genu *Fhb1* odporności na fuzariozę kłosa. Cel został w pełni zrealizowany.

#### *Materiały i metody*

##### **Selekcja wspomagana markerami molekularnymi (MAS).**

Do analiz wykorzystano łącznie 600 roślin pokolenia  $F_1BC_2$  pochodzących z pięciu kombinacji krzyżówkowych (po 120 dla każdej kombinacji), w których dawcą odporności na fuzariozę kłosów (genu *Fhb1*) była linia AIII62, a biorcami linie SMH8527, DL414/10, STH1178, MIB11262 i NAD10041. Ze wszystkich roślin  $F_1BC_2$  i form rodzicielskich wyizolowano DNA przy zastosowaniu zestawu DNeasy Plant Mini Kit (QIAGEN GmbH, 140724 Hilden, Niemcy) lub zestawu Nucleo Mag 96 (Macherey-Nagel GmbH & Co. KG, 52355 Düren, Niemcy) ze zmianami (Czembor i in. 2014) przy pomocy zautomatyzowanej stacji roboczej Freedom Evo (Tecan Group Ltd., Seestrasse 103, CH 8708 Männedorf, Szwajcaria).

Analizy molekularne roślin składały się z dwóch zasadniczych etapów: testowania markera centralnego i markerów flankujących (rys. 2) (Röder i in. 1998, Somers i in. 2004, Song i in. 2005, Paux i in. 2008, Liu i in. 2008, Buerstmayr i in. 2009, GrainGenes 2012). Początkowo, każda próbka DNA była analizowana pod kątem występowania w locus markera centralnego allelu związanego z występowaniem genu odporności *Fhb1* na chromosomie 3B pszenicy – identyfikacja heterozygot. Zasadniczo testowano locus markera centralnego UMN10, ale w przypadku trudności z jego typowaniem zastosowano dodatkowe markery centralne cfb6033 i cfb6012 (rys. 8). Wspomniane trzy markery znajdują się na kontigu 954 chromosomu 3B (w obrębie fragmentu DNA długości 2236 Kpz), który zawiera gen *Fhb1* (Hao i in. 2010, 2012). W drugim etapie, już w pomniejszonej puli roślin (tylko heterozygot dla locus markera centralnego) badano polimorfizm DNA w loci markerów flankujących dystalnie i proksymalnie gen *Fhb1*. Analizowano markery proksymalne cfp1274 i gpw3248 oraz markery dystalne gwm389 i barc238 (rys. 2).

Reakcję PCR amplifikacji markerów molekularnych (gwm389 i UMN10) dla badanych próbek DNA przeprowadzono w objętości 8µl, która zawierała następujące komponenty: 60ng matrycy DNA, 1U Taq polimerazy (Fermentas GmbH, Niemcy), 1 × PCR bufor z domieszką  $(NH_4)_2SO_4$  (Fermentas), 2,5mM  $MgCl_2$  (Fermentas), 200µM każdego z deoksynukleotydów (Fermentas) oraz po 0,5µM każdego z pary starterów (przy czym jeden z pary starterów był znakowany barwnikiem fluorescencyjnym). Przygotowanie reakcji PCR wykonywano „ręcznie” (tradycyjne pipety mechaniczne) lub przy pomocy zautomatyzowanej stacji roboczej Freedom Evo (Tecan). Amplifikacja prowadzona była według programu: 94°C/3min. wstępna denaturacja, 10 cykli składających się z etapów 94°C/30s, 60°C/30s i 72°C/1min. oraz 30 cykli przy obniżonej temperaturze denaturacji do 90°C. Reakcja kończyła się inkubacją 72°C/5min.



W przypadku markerów cfp1274, cfb6012, cfb6033, gpw3248 i barc238 zastosowano system amplifikacji PCR typu 'M13' (Rampling i in 2001). W odróżnieniu od wcześniej opisanego układu reakcji, dodany jest starter M13 w stężeniu 0,5μM (5'-CACGACGTTGTAAAACGAC-3'), który jest znakowany na końcu 5' barwnikiem fluorescencyjnym (nie są znakowane pozostałe startery 'forward' i 'reverse'). Ponadto, starter 'forward' na końcu 5' ma dołączoną sekwencję M13 (nieznakowaną), który występuje w stężeniu 0,1μM, a starter 'reverse' 0,5μM. Amplifikacja prowadzona była według programu: 94°C/3min.; (94°C/30s, 65↓51°C/30s, 72°C /1min.); (94°C/30s, 50°C/30s., 72°C/1min.) × 30 cykli, przy czym podany w formule symbol ↓ oznacza obniżenie temperatury przyłączania starterów z każdym cyklem o 1°C we wskazanym przedziale temperatur (Rampling i in. 2001).

Rozdział i analizę znakowanych produktów PCR prowadzono przy użyciu analizatora DNA ABI377XL (Applied Biosystems, Foster City, USA) wspomaganego oprogramowaniem GeneScan 3.1 (Applied Biosystems), stosując 4.5% denaturujący żel poliakrylamidowy (Long Ranger, Cambrex Bio Science, USA). Do nanoszenia mieszaniny poreakcyjnej na żel poliakrylamidowy stosowano grzebienie membranowe (100 zębów) zgodnie z zaleceniem producenta (Web Scientific Ltd., W. Brytania).

Ocena występowania alleli w badanych loci markerów molekularnych sprowadzała się do identyfikacji osobników o właściwym układzie alleli, tzn. heterozygoty w locus markera centralnego (UMN10 lub cfb6033 lub cfb6012) oraz homozygoty (w typie rodzica wypierającego) w locus przynajmniej jednego markera flankującego (cfp1274 oraz gpw3248 lub/i gwm389 oraz barc238).

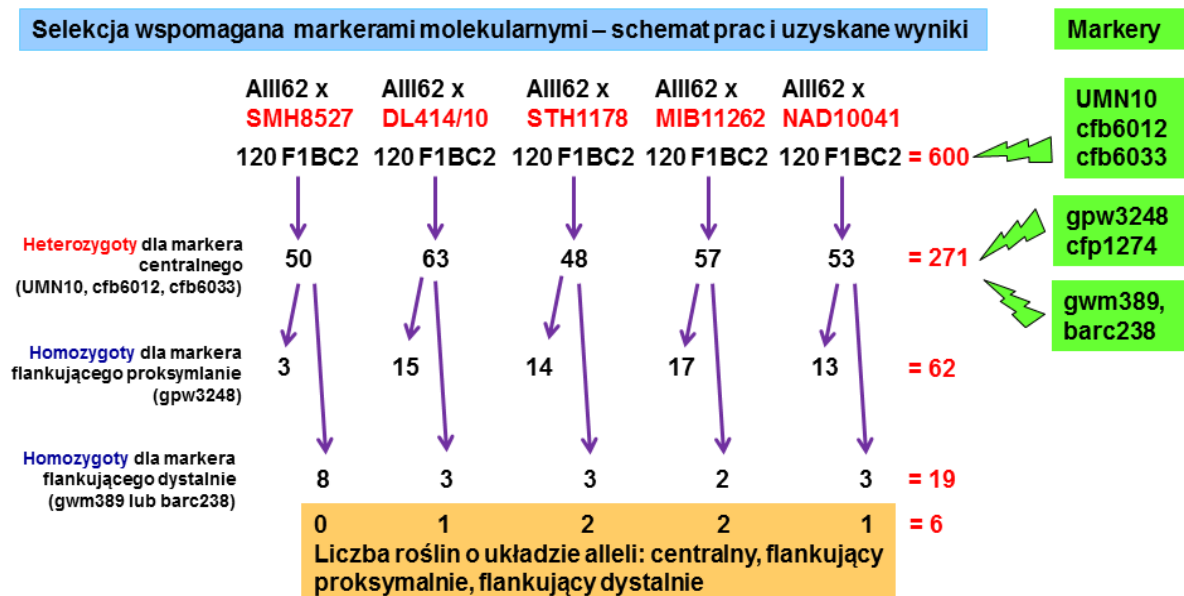
### Uzyskanie F<sub>2</sub>BC<sub>2</sub> dla 5 kombinacji.

Po analizach molekularnych rośliny pokolenia F<sub>1</sub>BC<sub>2</sub> o pożądanym układzie alleli w regionie występowania genu *Fhb1* zostały wykorzystane do uzyskania pokolenia F<sub>2</sub>BC<sub>2</sub>. Po jarowizacji (8 tygodni w temp. 4°C) rośliny były prowadzone w kontrolowanych warunkach komory klimatycznej: 16 godzin światła/22°C oraz 8 godzin ciemności/18°C, aby uzyskać w każdej kombinacji co najmniej 200 ziarniaków pokolenia F<sub>2</sub>BC<sub>2</sub>.

### Wyniki

Badano pięć populacji pokolenia F<sub>1</sub>BC<sub>2</sub>, każda licząca po 120 roślin. Wyniki analiz, w których zastosowano wybrane markery molekularne przedstawiono na rys. 3.

Końcowym wynikiem przeprowadzonych analiz MAS było uzyskanie w każdej populacji 3 – 17 osobników o pożądanym układzie alleli (**pierwsza grupa roślin**), tzn. heterozygoty w locus markera centralnego (UMN10 lub cfb6012 lub cfb6033) i homozygoty (w typie rodzica wypierającego) w locus markera flankującego proksymalnie gpw3248. Łącznie zidentyfikowano **62 osobniki** o pożądanym układzie alleli. Wykonano również analizę w poszukiwaniu homozygot (w typie rodzica wypierającego) w locus drugiego markera flankującego (dystalnie) gwm389 oraz barc238 (**druga grupa roślin**), która umożliwiła identyfikację 2 – 8 poświadanych roślin dla każdej z badanych kombinacji (rys. 2). Łącznie zidentyfikowano **19 osobników** będących heterozygotami w locus markera centralnego i homozygotami w locus markera flankującego dystalnie. Wytypowano również **6 roślin (trzecia grupa roślin)**, które były heterozygotami w locus markera centralnego (UMN10 lub cfb6012 lub cfb6033) i homozygotami (w typie rodzica wypierającego) w locus markera flankującego proksymalnie gpw3248 oraz homozygotami (w typie rodzica wypierającego) w locus markera flankującego dystalnie (gwm389 oraz barc238) (po jednej w populacjach: DL414/10 × AIII62 i NAD10041 × AIII62 oraz po dwie w populacjach: STH1178 × AIII62 i MIB11262 × AIII62).



Rys. 3. Schemat prac i liczba osobników w poszczególnych populacjach na kolejnych etapach selekcji markerami molekularnymi.

Po analizie MAS wybrane rośliny z każdej populacji posłużyły do uzyskania kolejnego pokolenia. Liczbę nasion pokolenia F<sub>2</sub>BC<sub>2</sub> zebranych z poszczególnych kombinacji przedstawiono w tabeli 9.

### Wnioski

1. Markery molekularne użyte w badaniach potwierdziły swoją przydatność w selekcji pożądanych genotypów.
2. Otrzymana liczba nasion w poszczególnych kombinacjach krzyżówkowych pokolenia F<sub>2</sub>BC<sub>2</sub> zapewnia wykonanie koniecznych analiz molekularnych w następnym roku realizacji tematu.