# SPRAWOZDANIE MERYTORYCZNE

# z realizacji zadania na rzecz postępu biologicznego w produkcji roślinnej w 2018. roku

1. Tytuł zadania: **Poszukiwanie oraz wykorzystanie markerów fenotypowych, metabolicznych i molekularnych do badania typów odporności na fuzariozę kłosów u form pszenicy o o zróżnicowanej podatnośc**i
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. Celem tematu jest uzyskanie pokolenia F3BC2 pięciu kombinacji krzyżówkowych pszenicy ozimej po wcześniejszej selekcji molekularnej osobników pokolenia F2BC2 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 2017 i w latach wcześniejszych (105) oraz nowe niebadane dotychczas genotypy (155). 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 281 obiektów w 2 lokalizacjach.

Doświadczenia polowe zostały założone w układzie losowanych bloków. Pszenica wysiane była na poletkach o powierzchni 0,5 lub 1m2 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 18oC. Ziarno skolonizowane przez *F. culmorum* było następnie suszone i przechowywane w lodówce w temperaturze 4oC 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 105 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). Kłosy pszenicy w fazie kwitnienia opryskiwano zawiesiną zarodników w ilości około 100 ml zawiesiny na 1 m-2. 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 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):

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 kłosy pszenicy opryskiwane były zawiesiną zarodników *F. culmorum* o stężeniu 105 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. Metoda ta jest używana do szacowania odporności typu 2 i pozwala na precyzyjne śledzenie rozprzestrzeniania się patogena w kłosie. Kłosy inkulowane 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 103 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 162 genotypy 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 IHAR Radzików i IGR PAN. Metodyka doświadczenia była podobna.

***Wyniki***

Warunki pogodowe w roku 2018 były niesprzyjające dla rozwoju fuzariozy kłosów. W Cerekwicy brak było opadów w trzeciej dekadzie maja i były bardzo niskie w pierwszej dekadzie czerwca. Był to okres kwitnienia pszenicy oraz inokulacji kłosów (25 – 30 maja). W czerwcu opady w Radzikowie były bardzo niskie. Po 2 czerwca do końca drugiej dekady opady były bardzo niskie (1,6 mm) i wystąpiły bardzo wysokie temperatury powietrza (do 33,8 oC).

Średni IFK dla 116 genotypów w Cerekwicy wyniósł 6,9 %, natomiast w Radzikowie 9,0%. Średnie wartości IFK różniły się istotnie. Podobnie istotne były różnice pomiędzy wzorcami genotypami a wzorcami odpornymi i podatnymi. Zmienność IFK w obu lokalizacjach był zbliżona i wynosiła 0 – 33,0% w Cerekwicy oraz 0,5 – 30,0 % w Radzikowie.

Spośród genotypów badanych w obu lokalizacjach najwyższą odporność (IFK < 2,4% = średnia 17,9 – odchylenie standardowe 5,5) wykazały wzorce odporne: A40-19-1-2, S 10 [Fhb1+], S 11 [Fhb1+], S 12 [Fhb1+], S 13 [Fhb1+], S 30 [Fhb1+], S 32 [Fhb1+] oraz genotypy: KBP 04.164, KBP 05.284, NAD 13014, NAD 13015, NAD 13016, NAD 13017, POB 0316, POB 457/07, POB 759/04, STH 9059.

Najwyższą podatność (IFK > 3,4% = średnia 7,9 + odch. standardowe 5,5) wykazały wzorce podatne: KBP 14 16, SMH 8816, SMH 8694, DL 325/11/3, NAD 10079 oraz genotypy: AND 1055/02, AND 245/13, AND 260/10, DD 548/09, DM 3873/10, KOH 275, POB 0212, POB 0816, SMH 9278, STH 5275, STH 8515.

Indeksy fuzariozy kłosów w Radzikowie i Poznaniu (Cerekwicy) korelowały istotnie jednakże współczynnik był bardzo niski. Termin kwitnienia pszenicy korelował z nasileniem fuzariozy kłosów w Radzikowie oraz ze średnim nasileniem z obu lokalizacji. Kwitnienie wcześniejszych genotypów w Radzikowie przypadło na 3 dni bez opadów i wysokimi temperaturami. Podczas kwitnienia późniejszych wystąpiły opady i nastąpił kilkudniowy spadek temperatury.

Mimo niekorzystny warunków w roku 2018 współczynnik korelacji indeksów fuzariozy kłosów dla 95 genotypów odpornych badanych w latach 2017 i 2018 w Radzikowie i Poznaniu był istotny (r = 0,602). Stabilną odporność na porażenie kłosa wykazały genotypy (nie licząc większości wzorców odpornych): NAD 13016, NAD 13017, AND 4023/14, SMH 7983, NAD 13015, NAD 13014, POB 0114. Liczne genotypy wykazały wyższe porażenie w roku 2018 niż w roku 2017, w którym panowały warunki korzystnie dla rozwoju fuzariozy kłosów. Część genotypów wykazała znacznie słabsze porażenie niż w roku 2017 np. S 30 [Fhb1+], STH 9059, POB 457/07, KBP 05.284.

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 wzorzec 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).

Odporności typu I dla 3 grup genotypów były zbliżone. W przypadku odporności typu II była ona najwyższa u wzorców odpornych (większość z genem *Fhb1*), a najniższa dla wzorców podatnych.

Średnia odporność typu 2 wyniosła 1,89 porażonych kłosków (pk), zakres zmienności od 0 pk do 6,71 pk. Najwyższą odporność typu 2 (pk <0,76) wykazał 10 wzorców odpornych oraz genotypy STH 032 i KOH 275. Najniższa odporność (pi > 3,03) została stwierdzona u wzorców podatnych oraz genotypów: NAD 13024, DED 389/06, POB 0616, DC 332/09-3, KBP 05.284.

Najwyższą średnią odporność obu typów (< 1,16) wykazało 9 wzorców odpornych; natomiast najniższą (> 3,05) wzorce podatne i KBP 05.284. Wysoka była również odporność następujących genotypów: STH 2041, NAD 13016, POB 0514, NAD 13017.

Współczynnik korelacji obu typów odporności był niski r = 0,237. Odporność typu 2 korelowała istotnie z IFK warunkach polowych w Radzikowie (r=0,334) i Poznaniu (r=0,483). Odporność typu I korelowała jedynie z IFK w Radzikowie (r=0,365). Współczynnik korelacji dla średniej odporności obu typów ze średnim IFK warunkach polowych wyniósł r=0,632.

W doświadczeniach w 5 dodatkowych lokalizacjach badano odporność na fuzariozę kłosów 162 genotypów i 3 odmian wzorcowych (Artist, Patras, RGT Kilimanjaro). W Smolicach i Strzelcach na skutek niekorzystnych warunków pogodowych wystąpiło bardzo słabe porażenie kłosów oraz przedwczesne zasychanie roślin. Z tego względu nie uwzględniono tych 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. Znaleziono 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) 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.

**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 kłosów z poletka w doświadczeniach polowych – dla około 100 wybranych genotypów, wykazujących odporność na fuzariozę kłosów, z 3 poletek inokulowanych i z poletka kontrolnego. Kłosy 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.

W wybranych próbach ziarna pszenicy z doświadczeń z roku 2017 analizowana była zawartość DNA *F. culmorum*. Wykorzystano technikę real-time PCR. Izolowano DNA z porażonego ziarna pszenicy. Wyznaczono krzywe standardowe dla gatunku *F. culmorum* wykorzystując DNA uzyskane z czystej kultury grzyba Przeprowadzono analizę ilościowa DNA roślinnego (starter specyficzny dla genu EF1α) oraz grzybowego (starter specyficzny dla *F. culmorum*). Wyliczono względną zawartość DNA *F. culmorum* w stosunku do DNA pszenicy (pg/g).

***Wyniki***

Średnie uszkodzenie ziarniaków przez *Fusarium* wyniosło FDK masa = 14,3% oraz FDK liczba = 21,1%. Zakres zmienności wynosił dla FDK masa od 2,6 do 43,2% oraz dla FDK liczba od 3,7 do 52,4%. Najniższe uszkodzenie ziarniaków (FDK liczba < 10,7% = średnia – odchylenie standardowe) miało 21 genotypów w tym 7 wzorców odpornych. Były to np. STH 9059, NAD 13014, NAD 13017, POB 170/04, NAD 14008, STH 5261, STH 5316 Najwyższe uszkodzenie (FDK liczba > 31,6% = średnia + odchylenie standardowe) odnotowano u 21 genotypów w tym 3 wzorców podatnych. Były to np. odmiany Artist i Patras, genotypy z 2017 AND 245/13 i POB 0416, pozostałe były to genotypy z DW 17/18.

Indeks fuzariozy kłosów korelował istotnie z uszkodzeniem ziarniaków. Współczynniki były jednakże niskie.

Redukcja plonu ziarna z kłosa (RMZK) na skutek porażenia kosów przez *Fusarium* wyniosła średnio 45,6%.. Zakres zmienności cechy 0 – 86,4%. Liczba ziarniaków w kłosie (LZK) została zredukowana średnio o 33,2%. Zakres zmienności cechy 0 – 81,5%. Masa tysiąca ziarniaków (MTZ) została zredukowana średnio o 20,9%. Zakres zmienności cechy 0 – 54,9%.

Najniższą redukcję masy ziarna z kłosa w odniesieniu do kontroli (RMZK < 28,2%) odnotowano u 7 wzorców odpornych, odmiany Artist oraz 11 genotypów. Najniższa RMZK była u AND 82/11/50, STH 9059, POB 0316. Odmiany Artist i Fregata oraz NAD 15109 miały wysoki stopień uszkodzenia ziarniaków. Najsilniejszej redukcji uległ plon ziarna z kłosa u genotypów u 2 wzorców podatnych NAD 10079 (S) i SMH 8816 (S), odmiany Kilimanjaro i 16 genotypów, w tym 11 z DW 17/18.

Średni indeks fuzariozy kłosów (Poznań + Radzików) korelował z redukcjami masy ziarna z kłosa i liczby ziarniaków w kłosie. Współczynniki miały niskie wartości. Nieco wyższe były współczynniki korelacji uszkodzenia ziarniaków FDK z redukcjami komponentów plonu.

Zidentyfikowano genotypy łączące odporność na porażenie kłosa (typ 1+2), uszkodzenie ziarniaków (typ 3) oraz niską redukcję plonu ziarna (typ 4). Były to: STH 9059, POB 0316, NAD 13014, KBP 1629, STH 5261 oraz część wzorców odpornych.

Przeanalizowano zawartość DNA *F. culmorum* w ziarnie wybranych 24 genotypów pszenicy z doświadczeń z roku 2017. Próby pochodziły z Cerekwicy i Radzikowa.

Koncentracja DNA *F. culmorum* wyniosła średnio 28034 pg na 1 g DNA pszenicy. Zakres zmienności wynosił od 3475 pg/g (S 38 [Fhb1-]) do 88020 pg/g (DL 358 /13/4 – wzorzec podatny). W próbach z Cerekwicy zwartość DNA *F. culmorum* (39117 pg/g) była ponad dwukrotnie wyższa niż z Radzikowa (16952 pg/g).

Zawartość DNA korelowała istotnie z innymi miernikami oceny odporności pszenicy na fuzariozę kłosów. Bardzo wysokie były współczynniki korelacji z indeksem fuzariozy kłosów (IFK) i ze stopniem uszkodzenia ziarniaków (FDK). Niższe były współczynniki korelacji z redukcjami komponentów plonu.

Jeżeli chodzi o metabolity *Fusarium*, to najwyższe były współczynniki korelacji DNA z zawartością NIV, ZEN i 3AcDON. Niższe były współczynniki korelacji z zawartością ergosterolu i DON. Wartości tych współczynników wynikały z nietypowej reakcji genotypu C 3779/10, w którego ziarnie stwierdzono wysokie zawartości ERG i DON mimo niskiej koncentracji DNA *F. culmorum*.

.**Wnioski**

1. Badane genotypy wykazały zróżnicowaną odporność na uszkodzenie ziarniaków przez *Fusarium* (typ 3).
2. Indeks fuzariozy kłosów istotnie korelował z uszkodzeniem ziarniaków pszenicy, jednakże współczynniki miały niskie wartości.
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, jednakże współczynniki miały niskie wartości
5. Zidentyfikowano genotypy o łączące typy odporności 1+2, 3 i 4.
6. Zawartość biomasy *F. culmorum* korelowała istotnie z innymi miernikami oceny odporności pszenicy na fuzariozę kłosów.

**3. 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 zmydlaniu 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 -1, 5 min.), a ekstrakt oczyszczony na kolumience 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 znana 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 1495 g/kg). Zakres zmienności od 58 (NAD 15105) do 7726 g/kg (1115). W próbach z Poznania zawartość DON była bardzo niska i wyniosła 595 g/kg (23 – 8300 g/kg). W Radzikowie natomiast była 4-krotnie wyższa i wynosiła 2395 g/kg (0 – 13825 g/kg).

Stwierdzono obecność w ziarnie pszenicy pochodnych acetylowych DON – 3AcDON i 15AcDON. Zawartości tych toksyn były bardzo niskie. Zawartość 3AcDON wyniosła średnio 246 g/kg, zakres zmienności od 0 do 165 g/kg. Zawartość 15AcDON wyniosła średnio 43 g/kg, zakres zmienności od 0 do 178 g/kg.

Średnia zawartość niwalenolu (NIV) w ziarnie badanych genotypów była wyższa niż zawartość DON i wynosiła 2778 g/kg. Zakres zmienności od 353 (STH 9059) do 8173 g/kg (POB 0416). W próbach z Radzikowa zawartość NIV była bardzo niska i wyniosła 67 g/kg (0 – 375 g/kg). W Poznaniu natomiast była bardzo wysoka i wynosiła 5488 g/kg (680 – 16295 g/kg).

Średnia sumaryczna zawartość trichotecenów z grupy B w ziarnie genotypów pszenicy wynosiła 4338 g/kg. Zakres zmienności od 840 (S 10 [Fhb1+]) do 14465 g/kg (POB 0416).

Zawartość ZEN w ziarnie była niska i wynosiła średnio 45 g/kg. Zakres zmienności 0 – 454 g/kg. W próbach ziarna z Poznania stwierdzono jedynie średnio 17 g/kg ZEN, natomiast w próbach z Radzikowa zwartość ZEN wynosiła 73 g/kg.

Ze względu na znaczne różnice w porażeniu kłosów genotypów badanych w dwóch doświadczeniach z Radzikowie, analizowano ich wyniki oddzielnie. Obiekty w doświadczeniu wstępnym (DW) zostały w większym stopniu dotknięte suszą niż obiekty z doświadczenia „odporne” mimo iż oba pola znajdowały się w odległości około 100m.

W grupie genotypów z DW najmniej DON stwierdzono w ziarnie genotypów: NAD 15105, STH 6167, STH 5347, POB 0717, STH 6116, STH 6151, STH 6177; najwięcej DON było akumulowane w ziarnie genotypów: DD 464/14, STH 4567, AND 538/15, KBP 166, KBP 1656.

W grupie genotypów odpornych najmniej DON stwierdzono w ziarnie wzorców S 12 [Fhb1+], S 10 [Fhb1+] i S 11 [Fhb1+], S 32 [Fhb1+], S 13 [Fhb1+] oraz genotypów AND 4019/14, POB 0114. Najwięcej DON było akumulowane w ziarnie genotypów: POB 0416, NAD 13016, 1115; wzorców podatnych DL325/11/3 (S), KBP 14 16 (S) i odmiany Fregata.

W grupie genotypów z DW najmniej NIV stwierdzono w ziarnie genotypów: STH 6151, STH 5347, STH 6130, STH 5261, POB 0517, STH 6116; najwięcej NIV było akumulowane w ziarnie genotypów: STH 6166, KBP 1656 oraz odmian Patras i Artist.

W grupie genotypów odpornych najmniej NIV stwierdzono w ziarnie wzorców S 12 [Fhb1+], S 10 [Fhb1+] i S 30 [Fhb1+], S 32 [Fhb1+], S 13 [Fhb1+] oraz genotypów STH 9059, NAD 13014 i NAD 13024. Najwięcej NIV było akumulowane w ziarnie genotypów: 1115, STH 5485, POB 0416 oraz pięciu wzorców podatnych.

W grupie genotypów z DW najmniej ZEN stwierdzono w ziarnie genotypów: STH 6151, STH 6130, STH 6116, NAD 15105, NAD 15115; najwięcej ZEN było akumulowane w ziarnie genotypów: KBP 1633, AND 538/15, KBP 166, KBP 1656.

W grupie genotypów odpornych najmniej ZEN stwierdzono w ziarnie wzorców S 12 [Fhb1+], S 32 [Fhb1+], 20828, A40-19-1-2 oraz genotypów NAD 13014 i NAD 13016. Najwięcej ZEN było akumulowane w ziarnie genotypów: POB 170/04 i POB 0514 oraz wzorców podatnych DL325/11/3 (S), SMH 8694 (S) i KBP 14 16 (S).



Rysunek 1. Układ współrzędnych dwóch składowych głównych dla 43 genotypów pszenicy ozimej z grupy ‘odporne’. Składowe wyjaśniają 69,06% zmienności odporności akumulację zearalenonu (ZEN) i trichotecenów z grupy B (DON, 3AcDON, NIV) w ziarnie. Wektory wskazują kierunek wzrostu wartości zmiennych.



Rysunek 2. Układ współrzędnych dwóch składowych głównych dla 30 genotypów pszenicy ozimej z grupy ‘DW. Składowe wyjaśniają 69,60% zmienności odporności akumulację zearalenonu (ZEN) i trichotecenów z grupy B (DON, 3AcDON, NIV) w ziarnie. Wektory wskazują kierunek wzrostu wartości zmiennych

Analiza wieloczynnikowa wykazała, że w grupie odpornych najniższą akumulację różnych grup toksyn stwierdzono u wzorców odpornych (z wyjątkiem Ariny i Fregaty) oraz u genotypów POB 0114, NAD 13014, STH 9059, NAD 13024 i AND 82/11/50 (Rys. 1). W grupie DW najniższą akumulację różnych grup toksyn stwierdzono u genotypów STH 6151, STH 5347, STH 6130, NAD 15105, STH 6116, STH 6167, STH 6177 (Rys. 2)

Indeks fuzariozy kłosów korelował istotnie z zwartością trichotecenów oraz zearalenonu. Najniższy był współczynnik korelacji z 15AcDON, najwyższy dla ZEN. Uszkodzenie ziarniaków nie korelowało z zawartością DON, natomiast wysokie były współczynniki korelacji z zawartościami NIV i ZEN.

Stężenie DON nie korelowało istotnie z zwartością NIV. Istotny lecz niski był współczynnik korelacji ze stężeniem ZEN.

***Wnioski***

1. Badane genotypy pszenicy wykazały zróżnicowaną odporność typu 5 oraz zidentyfikowano genotypy wykazujące podwyższoną odporność tego typu.
2. Stwierdzono bardzo duże różnice pomiędzy lokalizacjami jeżeli chodzi o akumulację DON i NIV w ziarnie.
3. Indeks fuzariozy kłosów i stopień uszkodzenia ziarniaków korelowały istotnie z zawartością trichotecenów w ziarnie.
4. Współczynniki korelacji dla DON były znacznie niższa niż dla NIV.
5. Korelacja indeksu fuzariozy kłosów, stopnia uszkodzenia ziarniaków była w przypadku zearalenonu wyższa niż dla trichotecenów.
6. Zidentyfikowano genotypy łączące podwyższony poziom odporności różnego typu.

**4. 4. Temat badawczy 4**

***Cel tematu badawczego 4***

Celem tematu było uzyskanie pokolenia F3BC2 pięciu kombinacji krzyżówkowych pszenicy ozimej, homozygotycznego pod względem genu odporności na fuzariozę kłosa *Fhb1*, po wcześniejszej selekcji molekularnej osobników pokolenia F2BC2. Cel został zrealizowany.

***Materiały i metody***

**Selekcja wspomagana markerami molekularnymi (MAS).** Materiałem wykorzystanym w badaniach były rośliny pokolenia F2BC2 pochodzące z pięciu kombinacji krzyżówkowych. Dawcą genu odporności na fuzariozę była linia AIII62/1, natomiast biorcami – linie SMH8527, DL414/10, STH1178, MIB11262 oraz NAD10041. W ramach tematu przeanalizowano łącznie 600 roślin – po 120 z każdej kombinacji. Do badań wykorzystano DNA wyizolowane z roślin pokolenia F2BC2 oraz form rodzicielskich. DNA izolowano stosując zestaw Nucleo Mag 96 ze zmianami przy pomocy zautomatyzowanej stacji roboczej Freedom Evo. DNA nie było rozcieńczone po izolacji, a jego stężenie wynosiło ok. 100-200 ng/µl.

W pierwszym etapie selekcji rośliny pokolenia F2BC2 testowano w poszukiwaniu osobników homozygotycznych pod względem genu odporności *Fhb1* (w typie rodzica-dawcy), na podstawie analizy polimorfizmu markerów SSR sprzężonych z genem. Testowano głównie locus markera UMN10, jednak w przypadku wystąpienia trudności w jego typowaniu, dodatkowo stosowano marker cfb6033. Polimorfizm badano również w loci markerów flankujących dystalnie (gwm389) i proksymalnie (gpw3248), mając na celu selekcję homozygot w typie rodzica wypierającego. Po tym etapie zawężono pulę roślin do osobników, które były homozygotami pod względem genu odporności *Fhb1* (w typie rodzica-dawcy) oraz (w miarę możliwości) homozygotami w typie rodzica wypierającego pod względem loci markerów flankujących.

W celu potwierdzenia wyników selekcji przetestowano ponownie loci wymienionych wcześniej markerów oraz dodatkowo zbadano polimorfizm kolejnych dwóch markerów flankujących tj., gwm493 i barc12, położonych bliżej genu *Fhb1*.

Reakcję PCR dla markerów UMN10, gwm389 i gwm493 prowadzono w objętości 8μl, stosując *następujące* ilości poszczególnych komponentów: 1 × PCR bufor z domieszką (NH4)2SO4, 2,5mM MgCl2, po 200μM każdego z deoksynukleotydów, 1U Taq polimerazy oraz po 0,5μM każdego ze starterów, przy czym starter forward znakowany był barwnikiem fluorescencyjnym TET lub HEX. W przypadku markera UMN10 zawartość magnezu została obniżona do 1,5 mM. Reakcję amplifikacji prowadzono według programu: 94°C/3min, (94°C/30s, 60°C/30s, 72°C/1min) × 10, (90°C/30s, 60°C/30s, 72°C/1min) × 30, 72°C/5min.

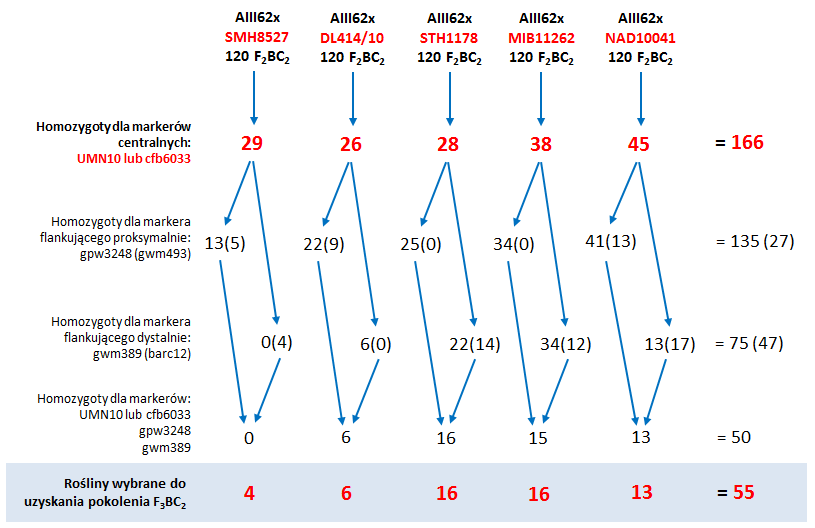
Natomiast w przypadku markerów gwm3248, barc12 i cfb6033 zastosowano system amplifikacji PCR typu M13. W przeciwieństwie do układu reakcji opisanego powyżej, startery ‘forward’ nie były znakowane fluorescencyjnie, ale na końcu 5’ wprowadzono sekwencję M13 (5’-CACGACGTTGTAAAACGAC-3’). Ponadto, do reakcji dodawano uniwersalny starter M13 znakowany na końcu 5’ barwnikiem HEX lub TET w stężeniu 0,5μM, o sekwencji identycznej z sekwencją dołączoną do starterów ‘forward’. Stężenia starterów ‘reverse’ i ‘forward’ wynosiły odpowiednio 0,5 i 0,1μM. Reakcja PCR prowadzona była według programu: 94°C/3min.; (94°C/30s, 65↓51°C/30s, 72C° /1min.); (94°C/30s, 50°C/30s., 72°C/1min.) × 30 cykli. Symbol ↓ oznacza obniżenie temperatury przyłączania starterów z każdym cyklem o 1°C we wskazanym przedziale temperatur.

Rozdział i detekcję produktów PCR prowadzono na 4,75% denaturującym żelu poliakrylamidowym przy użyciu analizatora DNA ABI PRISM 377XL DNA Sequencer wspomaganego oprogramowaniem ABI PrismTM 377-96 Collection. Do nanoszenia mieszaniny poreakcyjnej wykorzystano grzebienie membranowe zgodnie z instrukcją producenta.

**Uzyskanie F2BC2 dla 5 kombinacji**

Po zakończeniu analiz molekularnych wybrane rośliny pokolenia F2BC2 zostały wykorzystane do uzyskania pokolenia F3BC2. Rośliny zostały poddane jarowizacji (8 tygodni w temp. 4°C), a następnie prowadzono je w warunkach szklarniowych.

***Wyniki***

Uzyskane wyniki przedstawiono na rysunku zamieszczonym poniżej (Rys. 3)

Rysunek 3. Wynik selekcji wspomaganej markerami molekularnymi (MAS) dla pięciu kombinacji pokolenia F2BC2. W nawiasach podano liczbę roślin homozygotycznych w loci markerów gwm493 i barc12, położonych bliżej genu *Fhb1.*

W wyniku selekcji we wszystkich populacjach zidentyfikowano łącznie ***166 osobników*** homozygotycznych w loci markerów centralnych (UMN10 lub cfb6033) sprzężonych z genem odporności na fuzariozę kłosa *Fhb1*. Wśród tej grupy znalazło się ***135 roślin*** homozygotycznych (w typie rodzica wypierającego) w locus flankującego proksymalnie markera gpw3248 (27 w locus markera gwm493) oraz ***75 osobników*** homozygotycznych w locus markera flankującego dystalnie - gwm389 (47 w locus markera barc12). Najbardziej pożądanym układem alleli był natomiast układ: homozygota w typie rodzica dawcy w locus markera centralnego oraz homozygoty w typie rodzica wypierającego w loci markerów flankujących.

Po zakończeniu analiz wybrano ***55 roślin***, które posłużyły do uzyskania pokolenia F3BC2. Każdą z kombinacji potraktowano indywidulanie pod względem kryteriów selekcji osobników do dalszego rozmnażania, wybierając (w miarę możliwości) te o wcześniej wspomnianej najlepszej kombinacji alleli. Dodatkowo, w każdej kombinacji zebrano nasiona z ośmiu roślin homozygotycznych w typie rodzica wypierającego zarówno w locus markera centralnego, jak i w loci markerów flankujących. Rośliny te będą stanowić grupę kontrolną w przyszłych doświadczeniach infekcyjnych.

***Wnioski***

1. Wykorzystanie markerów molekularnych w badaniach znacznie ułatwiło selekcję pożądanych genotypów.
2. Wykorzystanie dodatkowych markerów flankujących pozwoliło na znaczne zmniejszenie rozmiarów fragmentu chromosomu zawierającego gen *Fhb1* w tle genetycznym odmian/linii elitarnych, co może się przyczynić do ograniczenia wystąpienia niepożądanych cech dawcy w wybranych roślinach.