

SPRAWOZDANIE MERYTORYCZNE

z realizacji zadania na rzecz postępu biologicznego w produkcji roślinnej w 2016. 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 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

Wykonawcy:

| | | |
|---------------------------|-------------------------|-------------------|
| Halina Wiśniewska | prof. dr hab. | IGR PAN Poznań |
| Paweł Czembor | dr hab., prof. IHAR PIB | IHAR-PIB Radzików |
| Piotr Ochodźki | 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 I i II.
- 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 F₁BC₂ pięciu kombinacji krzyżówkowych pszenicy ozimej po wcześniejszej selekcji molekularnej osobników pokolenia F₁BC₁ 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 I i II)

Cel tematu

Ocena stopnia porażenia kłosów przez *Fusarium* celem wyboru form odpornych pod względem odporności typu I i II. 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 2015 i w latach wcześniejszych (113) oraz nowe niebadane dotychczas genotypy (42). Dodatkowo badane były linie (55) uzyskane z krzyżowań z odmianą Sumai 3 (z genem *Fhb1* lub bez tego genu) oraz formy wzorcowe (odmiany odporne - 20828, A40-19-1-2, Arina, Bizel, Fregata, Olivin, Petrus, Piko, Tonacja, UNG 136.6.1.1). W sumie wysiano 220 obiektów w 2 lokalizacjach.

Doświadczenia polowe zostały założone w układzie losowanych bloków. Pszenica wysiane była na poletkach o powierzchni 0,5 - 1m² w trzech powtórzeniach oraz w kombinacji kontrolnej (nieinokulowanej).



Fot. 1. Izolat *F. culmorum* na pożywce PDA oraz zarodnikowanie *F. culmorum* na ziarnie pszenicy w szklanych kolbach..

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 (Fot. 1). 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 5×10^5 zar./ml za pomocą hematokrytu. Zawiesiny ze wszystkich izolatów były mieszane w równych proporcjach.

Zastosowano technikę inokulacji przez opryskiwanie (Fot. 2). Pozwoliło to na określenie połączonych typów odporności I (odporność na infekcję) oraz II (odp. na rozprzestrzenianie się patogena w tkankach). Kłosa pszenicy w fazie kwitnienia opryskiwano zawiesiną zarodników w ilości około 100 ml zawiesiny na 1 m². 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 kłosek w kłosie (tylko w kłosach z objawami choroby) oraz proporcji kłosów porażonych na poletku. Z tych wartości został wyliczony indeks fuzariozy kłosów (IFK):

$$IFK = (\% \text{ porażenia kłosa} \times \% \text{ kłosów porażonych na poletku}) / 100$$



Fot. 2. Inokulacja kłosów pszenicy ozimej (z lewej) oraz mikrozaszczep (z prawej) na polu doświadczalnym w Cerekwicy (IGR PAN Poznań).

Badanie odporności typu I (odporność na infekcję) i II (odporność na rozprzestrzenianie się Fusarium w kłosie):

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 kłosy 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 (Fot. 3).



Fot. 3. Kłosy pszenicy z objawami fuzariozy kłosów po opryskaniu zawiesiną zarodników *F. culmorum* w celu oceny odporności na infekcję



Fot 4. Inokulacja punktowa kłosów pszenicy w tunelu doświadczalnym w IHAR-PIB Radzików w celu oceny odporności na rozprzestrzenianie się *Fusarium* w kłosie

Dla określenia odporności typu II zastosowana była metoda inokulacji punktowej kłosów (Fot. 4). Metoda ta jest używana do szacowania odporności typu II i pozwala na precyzyjne śledzenie rozprzestrzeniania się patogena w kłosie (Buerstmayr i in. 2002, Miedaner i in. 2003). Kłosy inokulowane były w fazie pełni kwitnienia poprzez umieszczanie kropli (ok. 50 mcl) zawiesiny zarodników *Fusarium* w środkowym kwiatusku wybranych kłosów za pomocą samo napełniającej się strzykawki. Stężenie zawiesiny wynosiło 50×10^3 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 utrzymywano wysoką wilgotność powietrza stymulującą rozwój choroby.

Buerstmayr H., Lemmens M., Fedak G. and Ruckebauer P. 1999. Back-cross reciprocal monosomic analysis of *Fusarium* head blight resistance in wheat (*Triticum aestivum* L.). *Theor. Appl. Genet.* 98: 76-85.

Buerstmayr H., Lemmens M., Hartl L., Doldi L., Steiner B., Stierschneider M. and Ruckebauer P. 2002. Molecular mapping of QTLs for *Fusarium* head blight resistance in spring wheat. I. Resistance to fungal spread (Type II resistance). *Theor. Appl. Genet.* 104: 84-91.

- Buerstmayr H., Steiner B., Hartl L., Griesser M., Angerer N., Lengauer D., Miedaner T., Schneider B., Lemmens M. 2003. Molecular mapping of QTLs for Fusarium head blight resistance in spring wheat. II. Resistance to fungal penetration and spread. *Theor. Appl. Genet.* 107: 503-508.
- Bushnell W.R. 2001. What is known about infection pathways in Fusarium head blight? In S. Canty et al. (ed.) *Proceedings of the 2001 National Fusarium Head Blight Forum*. Kinko's, Okemos, MI.
- Kubo, K., Kawada, N., Fujita, M. 2013b. Evaluation of Fusarium head blight resistance in wheat and the development of a new variety by integrating type I and II resistance. *Jircas. Affrc. Go. Jp.* 47: 9–19.
- Miedaner T., Moldovan M., Ittu M. 2003. Comparison of spray and point inoculation to assess resistance to Fusarium head blight in multienvironment wheat trial. *Phytopathology* 93: 1068-1072.

W ramach usługi badawczej prowadzone były doświadczenia infekcyjne w 5 punktach doświadczalnych. W doświadczeniach tych wysiano 153 genotypy. Były to nowe genotypy, których odporność nie był a dotychczas badana. Do inokulacji zastosowano te same izolaty *F. culmorum*, co w IHAR Radzików i IGR PAN. Metodyka doświadczenia była podobna.

Genotypy pszenicy ozimej o korzystnych cechach agronomicznych krzyżowane były z liniami ozimymi z wprowadzonymi genami odporności na fuzariozę kłosów.

- Van Ginkel M., Gilchrist L. 2002. How to make intelligent crosses to accumulate Fusarium head blight resistance genes based on knowledge of the underlying resistance mechanisms. In Ward R.W. et al. in. (ed.) *Proc. of the 2002 National Fusarium Head Blight Forum*, Erlanger, KY. 7-9 Dec. 2002. Michigan State University, East Lansing, MI, USA.

Wyniki

Bardzo niskie temperatury w styczniu 2016 w połączeniu z brakiem pokrywy śnieżnej spowodowały silne wymarzanie pszenicy w Radzikowie. Spośród 123 genotypów odpornych najmniejszą zimotrwałość wykazały wzorce odporne (A40-19-1-2, Bizel, UNG 136.6.1.1). Niską zimotrwałość na poziomie 2-3 miało jedynie 16 genotypów. W przypadku większości genotypów wystąpiła wiosenna regeneracja roślin i możliwe było przeprowadzenie inokulacji i obserwacji nasilenia fuzariozy kłosów. Bardzo silnie wymarzły 42 genotypy wprowadzone do badań w 2016r. wysiane w innej części pól doświadczalnych IHAR. Z tego względu plantacja została zlikwidowana i nie prowadzono dalszych prac na tych obiektach. Niską zimotrwałość wykazały linie S. Zimotrwałość na poziomie 1 wykazało 23 linii. Dobra zimotrwałość (powyżej 5) wykazało 14 linii. Najlepiej zimowały linie uzyskane z krzyżówki Begra x Sumai 3, najslabiej z krzyżówki Korweta x Sumai 3. Nie było zależności pomiędzy zimotrwałością a obecnością genu *Fhb1*. Część linii zregenerowała i inokulacja oraz obserwacje nasilenia fuzariozy kłosów przeprowadzono na 45 liniach. W sumie oceniono odporność 220 obiektów w Poznaniu (Cerekwica) oraz 168 obiektów w Radzikowie.

Spośród 80 genotypów wysianych w 2 doświadczeniach wysianych w Radzikowie w celu oceny odporności typów 1 i 2 wymarzło całkowicie 5 genotypów. Ocenę odporności wykonano dla 75 genotypów.



Fot. 5. Porównanie genotypów pszenicy ozimej o niskiej (z lewej) i wysokiej zimotrwałości (z prawej) w lutym 2016.

Warunki pogodowe Radzikowie i Cerekwicy w roku 2016 były sprzyjające dla rozwoju fuzariozy kłosów (tabela poniżej). W Radzikowie w okresie przed kwitnieniem oraz w czasie kwitnienia pszenicy (3-7 czerwca) opady występowały codziennie. Duża częstotliwość opadów utrzymywała się do końca drugiej dekady lipca. W Poznaniu (Cerekwicy) warunki w czerwcu były zbliżone. W lipcu opady były znacznie wyższe niż w Radzikowie.

Tabela 1. Średnia temperatura i suma opadów w czerwcu, lipcu i sierpniu 2016 w dwóch punktach doświadczalnych (Poznań, Radzików)

| Miesiąc | Poznań/Cerekwica | | Radzików | |
|---------------|------------------|----------------|------------------|----------------|
| | Suma opadów (mm) | Temperatura °C | Suma opadów (mm) | Temperatura °C |
| Maj 2016 | 32,2 | 21,0 | 31,6 | 16,0 |
| Czerwiec 2016 | 49,4 | 24,0 | 54,6 | 19,5 |
| Lipiec 2016 | 130,0 | 23,5 | 89,8 | 19,8 |
| Sierpień 2016 | 14,1 | 23,0 | 46,0 | 18,9 |

W doświadczeniach infekcyjnych w Cerekwicy i Radzikowie analizowano odporność na fuzariozę kłosów 158 genotypów pszenicy ozimej oraz 10 odmian/linii wzorcowych. Średni IFK w Cerekwicy wyniósł 12,9 %, natomiast w Radzikowie 14,3%. Średnie wartości IFK nie różniły się istotnie, natomiast w Radzikowie zmienność IFK był wyższa (0 – 48,0%) niż w Cerekwicy (3,8 – 32,3%). Spośród genotypów badanych w obu lokalizacjach najwyższą odporność (IFK < 10%) wykazały linie S (41 linii), wzorce odporne – UNG 136.6.1.1 [Fhb1+], A40-19-1-2, 20828 [Fhb1–], Fregata, a także genotypy: POB 679/03, STH 105, KBP 05.271, KBP 05.284, DL 423/11/2, AND 400/05, POB 0514, POB 0211, STH 2041 oraz DD 557/07

Najwyższą podatność wykazały wzorce podatne: DL 325/11/3, SMH 8694, SMH 8816, NAD 10079, SMH 8694, SMH 8816 oraz genotypy: AND 4056/13 i DD 548/09 (tox). Ten ostatni w poprzednich latach, charakteryzował się wysoką akumulacją mikotoksyn w ziarnie.

Wysokość roślin istotnie korelowała z IFK w Cerekwicy, jednakże współczynnik był bardzo niski. Podobnie niski był współczynnik korelacji ze średnim IFK dla obu lokalizacji. Wynikało to z małej wysokości większości genotypów (średnio 86,4 cm, zakres 67,3 – 104,0 cm) związanej w warunkami pogodowymi w roku bieżącym. Termin kwitnienia pszenicy nie korelował z nasileniem fuzariozy kłosów w obu lokalizacjach.

Średnie indeksy fuzariozy kłosów dla 72 genotypów badanych w doświadczeniach w latach 2014, 2015 i 2016 korelowały istotnie. Zidentyfikowano genotypy o stabilnej reakcji we wszystkich 4 środowiskach np. odporne: UNG 136.6.1.1 (VR), A40-19-1-2 (R), POB 679/03, 20828 (R), POB 0111, Arina (MR), STH 2041, POB 170/04, STH 9059; podatne: DD 548/09 (tox), NAD 10079 (S), SMH 8694 (S), SMH 8816 (S).

W dwóch doświadczeniach w warunkach kontrolowanych przebadano odporność typu I i typu II u 75 genotypów. Średnia odporność typu I wyniosła 1,66 punktów infekcji (pi), zakres zmienności od 1 pi do 2,50 pi. Najwyższą odporność typu I wykazały genotypy: 20828 (R), MOB WB 612006, AND 444/07, NAD 08161, MIB 08 166. Najniższa odporność została stwierdzona u genotypów STH 3016, KBH 12.21, NAD 11086, HRSM 889, HRSM 880.

Średnia odporność typu II wyniosła 1,64 porażonych kłosek (pk), zakres zmienności od 1,00 pk do 3,30 pk. Najwyższą odporność typu II wykazały genotypy: 20828 (R), KBP 10 58, DC 332/09-3, SMH 8874, POB 0212, MOB ZB 301206, STH 105. Najniższa odporność została stwierdzona u genotypów: STH 008, AND 1055/02, DL 423/11/2, MIB 08 166, STH 3016, STH 2078.

Najwyższą średnią odporność obu typów wykazały genotypy: 20828 (R), KBP 10 58, DD 64/09, DC 332/09-3, STH 2041, SMH 8874; natomiast najniższą genotypy: DL 423/11/2, NAD 11086, HRSM 880, STH 2078, STH 3016.

Brak było korelacji obu typów odporności. Odporność typu II korelowała istotnie z IFK warunkach polowych w Radzikowie. Wyższą wartość miał współczynnik korelacji dla średniej odporności obu typów. Za pomocą analizy składowych głównych podzielono genotypy na grupy o wysokiej odporności obu typów oraz wysokiej odporności tylko jednego typu (Załącznik 3: Rys. 7).

W doświadczeniach w 5 dodatkowych lokalizacjach przebadano odporność na fuzariozę kłosów 150 genotypów i 3 odmian wzorcowych (Artist, KWS Ozon, Patras). Wymarzenie wystąpiło w Dębiniu (wymarzło 17 genotypów) i Strzelcach (wymarzło 26 genotypów).

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 Smolicach. Największa była zgodność wyników uzyskanych w NAGRADOWICACH I DĘBINIE.

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.: NAD 13015, NAD 13017, NAD 13014, 1115, NAD 13016, AND 4019/14, AND 4023/14, AND 4012/14. Znaleziono również genotypy podatne we wszystkich środowiskach. Były to np.: SMH 9204, DL 336/12/1, AND 836/11, DL 344/12/4, KBP 14 16. Najwyższą odporność spośród wzorców wykazała odmiana Patras.

Dyskusja

Odporności typu I i typu II nie korelowały ze sobą, co wynika z różnych mechanizmów tych odporności. Odporność na rozprzestrzenianie się *Fusarium* w obrębie kłosa (typ II) jest głównie związana z odpornością na deoksynivalenol i inne trichoteceny B. Podczas patogenazy fuzariozy trichoteceny są produkowane przez *Fusarium* powodują nekrozę tkanki pszenicy, która następnie jest kolonizowana przez grzybnie *Fusarium* (Gunnaiah i in., 2012). Główny gen odporności na fuzariozę *Fhb1* wyjaśniający 60% zmienności odporności typu II jest również odpowiedzialny za obniżenie akumulacji deoksynivalenolu, a także niwalenolu (Lemmens i in., 2008; Buerstmayr i in., 2009). Odporności obu typów determinowane są przez inne geny. Spośród zmapowanych genów odporności o dużym efekcie dwa (*Fhb1*, *Fhb2*) związane są z odpornością na rozprzestrzenianie się *Fusarium* w kłosie (Cuthbert i in., 2006, 2007), dwa kolejne (*Fhb4*, *Fhb5*) przede wszystkim z odpornością na penetrację (Xue i in., 2010, 2011).

Rozbieżności rezultatów uzyskanych w różnych lokalizacjach mogły wynikać z wystąpienia w niektórych regionach bardzo niskich temperatur w styczniu poprzedzonych dłuższym okresem dodatnich temperatur. Spowodowały one wymarzanie najmniej odpornych genotypów w niektórych miejscowościach. Miały także wpływ na rozwój bardziej odpornych genotypów i spowodowały zmiany fenotypowe takie jak zmniejszenie wysokości i opóźnienie kwitnienia. Badania własne i publikowane wyniki pokazały istotny wpływ cech fenotypowych na nasilenie fuzariozy kłosów (Miedaner i in. 2008, Yan i in. 2011).

Znaczny wpływ warunków pogodowych na rozwój fuzariozy kłosów wskazuje na konieczność przeprowadzania doświadczeń infekcyjnych w co najmniej kilku środowiskach (lokalizacje, lata). Jak pokazują wyniki z lat 2014 – 2016 najbardziej stabilne są genotypy o bardzo wysokiej odporności (w tym z genami o dużym efekcie np. *Fhb1*) lub bardzo podatne. Reakcja genotypów średnio odpornych zmienia się w dość szerokim zakresie (Mesterhazy 2002, Mesterhazy i in. 2006).

- Buerstmayr, H., Steiner, B., Lemmens, M., Ruckebauer, P., 2000. Resistance to *Fusarium* head blight in winter wheat: heritability and trait associations. *Crop Sci.* 40, 1012–1018.
- Buerstmayr, H., Ban, T., i Anderson, J. A. 2009. QTL mapping and marker-assisted selection for *Fusarium* head blight resistance in wheat: A review. *Plant Breed.* 128: 1–26.
- Gunnaiah, R., Kushalappa, A.C., Duggavathi, R., Fox, S., Somers, D.J. 2012. Integrated metabolite-proteomic approach to decipher the mechanisms by which wheat QTL (*Fhb1*) contributes to resistance against *Fusarium graminearum*. 7(7): e40695. doi:10.1371/journal.pone.0040695.
- Kollers, S., Rodemann, B., Ling, J., Korzun, V., Ebmeyer, E., Argillier, O., Hinze, M., Plieske, J., Kulosa, D., Ganal, M.W., Röder, M.S., 2013. Whole genome association mapping of *Fusarium* head blight resistance in European winter wheat (*Triticum aestivum* L.). *PLoS ONE* 8, e57500. doi:10.1371/journal.pone.0057500
- Kubo, K., Kawada, N., Fujita, M., 2013. Evaluation of *Fusarium* head blight resistance in wheat and the development of a new variety by integrating type I and II resistance. *JARQ* 47, 9–19.
- Lemmens, M., Koutnik, A., Steiner, B., Buerstmayr, H., Berthiller, F., Schuhmacher, R., Maier, F., Schäfer, W. 2008. Investigations on the ability of *Fhb1* to protect wheat against nivalenol and deoxynivalenol. *Cereal Res. Commun.* 36: 429–435
- Mesterhazy, A., 1995. Types and components of resistance to *Fusarium* head blight of wheat. *Plant Breeding* 114, 377–386.
- Mesterhazy, A., 2002. Theory and practice of the breeding for *Fusarium* head blight resistance in wheat. *Journal of Applied Genetics* 43A, 289–302.
- Mesterhazy, A., Toth, B., Kaszonyi, G., 2006. Sources of “environmental interactions” in phenotyping and resistance evaluation; Ways to neutralize them. In: Ban T., Lewis J.M., Phipps E.E. (Eds.), *The global Fusarium initiative for international collaboration – strategic planning workshop held at CIMMYT: El Batan, Mexico, 14–17 March 2006.* pp 84–92.
- Mesterházy, A., Tóth, B., Bartók, T., Varga, M., 2008. Breeding strategies against FHB in winter wheat and their relation to type I resistance. *Cereal Research Communications* 36, 37–43.
- Miedaner, T., Voss, H.-H., 2008. Effect of dwarfing genes on *Fusarium* head blight resistance in two sets of near-isogenic lines of wheat and check cultivars. *Crop Science* 48, 2115–2122.

- Snijders, C. H. A. (1990). Diallel analysis of resistance to head blight caused by *Fusarium culmorum* in winter wheat. *Euphytica*, 50(1), 1–9
- Yan, W., Li, H.B., Cai, S.B., Ma, H.X., Rebetzke, G.J., Liu, C.J., 2011. Effects of plant height on type I and type II resistance to *Fusarium* head blight in wheat. *Plant Pathology* 60, 506–512.

Wnioski

1. Potwierdzono odporność na fuzariozę kłosów warunkach polowych (typ odporności I+II) większości genotypów z kolekcji form odpornych.
2. Uzyskano wysokie wartości (0,613 – 0,775) współczynników korelacji indeksów FK dla genotypów odpornych badanych w latach 2014–2016.
3. Nie było istotnej zależności pomiędzy odpornością typu I i typu II.
4. Odporności typu I i II słabo korelowały z indeksem fuzariozy kłosów z doświadczenia polowego, wyższe były współczynniki korelacji IFK ze średnią odpornością obu typów.
5. Doświadczenia infekcyjne prowadzone w 5 lokalizacjach pokazały silny wpływ środowiska na nasilenie fuzariozy kłosów, jednakże zidentyfikowano genotypy o stabilnej reakcji (odporne, podatne) w różnych środowiskach.

4. 2. Temat badawczy 2: Analiza zebranego materiału pod kątem oceny odporności na zasiedlanie ziarniaków (typ III odporności) i redukcję elementów struktury plonu (typ IV 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 20-30 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 III) 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* wyniosło FDK masa = 11,0% oraz FDK liczba = 14,1%. Zakres zmienności wynosił dla FDK masa od 2,5 do 23,7% oraz dla FDK liczba od 3,3 do 30,1%. Uszkodzenie ziarniaków w Radzikowie było wyższe niż w Poznaniu.

Najniższe uszkodzenie ziarniaków (FDK liczba < 10%) miało 12 linii S, wzorce odporne: A40-19-1-2, UNG 136.6.1.1, Fregata, Petrus oraz genotypy: KBP 04.164, POB 679/03, SMH 7983, STH 9059, DED 389/06, POB 759/04, POB 170/04, KBP 05.284, LAD 463/05, POB 262/07. Najwyższe uszkodzenie (FDK liczba > 20%) odnotowano u genotypów: C 3779/10, Piko, NAD 06133, NAD 11017, KBP 10 30, POB 0813, AND 405613, DCh 4763/07, DM 2728/09 (tox), NAD 13024, DL 325/11/3 (S), DM 3131/10, DM 3873/10 (tox), SMH 9005, STH 102, SMH 8816 (S), SMH 8694 (S).

Indeks fuzariozy kłosów korelował wysoko istotnie z uszkodzeniem ziarniaków ($r=0,834$).



Fot. 6. Słabe uszkodzenie ziarniaków przez *Fusarium* u wysoko odpornej odmiany pszenicy ozimej Fregata. FDK = 8,8%



Fot. 7. Ziarniaki pszenicy silnie uszkodzone przez *Fusarium culmorum*.

Średni plonu ziarna z kłosa (MZK) został zredukowany przez *Fusarium* o około 28%. Wartość MZK w odniesieniu do kontroli wyniosła 71,9%. Zakres zmienności cechy 45,4 – 99,6%. Liczba ziarniaków w kłosie (LZK) została zredukowana średnio o około 16%. Wartość LZK w odniesieniu do kontroli wyniosła 83,7%. Zakres zmienności cechy 60,8 – 100,9%. Masa tysiąca ziarniaków (MTZ) została zredukowana średnio o 8%. Wartość MTZ w odniesieniu do kontroli wyniosła 81,8%. Zakres zmienności cechy 68,6 – 102,8%.

Najwyższą masę ziarna z kłosa w odniesieniu do kontroli odnotowano u genotypów: DC 548/11, A40-19-1-2 (R), S 39 [Fhb1+], S 33 [Fhb1+], S 57 [Fhb1+], POB 0514, S 38 [Fhb1-], DL 423/11/2, Petrus (MR), KBP 05.284, POB 0212, KBP 08 13, S 32 [Fhb1+], 20828 (R), AND 4008/10, S 50

[Fhb1+]. Najsilniejszej redukcji uległ plon ziarna z kłosa u genotypów: SMH 8816 (S), DED 316/06, C 41/10, POB 0911, STH 102, AND 340/06-1, NAD 11100, POB 170/04, DD 548/09 (tox), STH 2170, DM 3873/10. Podatny genotyp DL 325/11/3 (S) charakteryzował się średnią redukcją MZK. Średnią redukcję MZK miały również takie odporne genotypy jak: UNG 136.6.1.1 (VR), Olivin (R), Arina (MR) i Bizel (R).

Indeks fuzariozy kłosów korelował istotnie z redukcją komponentów plonu. Najwyższą wartość miał współczynnik korelacji z względną wartością MTZ ($r=0,595$). Stopień uszkodzenia ziarniaków korelował istotnie z względnymi wartościami komponentów plonu. Najwyższy był współczynnik korelacji z FDK liczba z względną wartością MTZ ($r=0,604$).

Zidentyfikowano genotypy łączące odporność na porażenie kłosa (typ I+II), uszkodzenie ziarniaków (typ III) oraz niską redukcję plonu ziarna (typ IV). Były to: A40-19-1-2 (R), S 39 [Fhb1+], S 33 [Fhb1+], S 57 [Fhb1+], S 38 [Fhb1-], S 32 [Fhb1+], S 50 [Fhb1+], KBP 05.284, POB 0514, DL 423/11/2, Petrus (MR), POB 759/04, POB 679/03, 20828 (R).

Obserwowano również genotypy o niskiej odporności na porażenie kłosa i małej redukcji plonu np. POB 0212, KBP 10 30, AND 405613, DL 325/11/3 (S), DM 3131/10. Genotypy te wykazały tolerancję na infekcję kłosa przez *Fusarium* czyli miały silne porażenia kłosa, duży procent uszkodzonych ziarniaków natomiast wykazały niską redukcję plonu ziarna.

Dyskusja

Jednym z efektów fuzariozy kłosów jest uszkodzenie ziarniaków objawiające się obniżeniem ich masy, pomarszczeniem, przebarwieniami, a w skrajnych przypadkach całkowitym przerośnięciem grzybnia *Fusarium* (Bechtel i in. 1985, Argyris i in. 2003). Ziarniaki porażone mają obniżoną siłę kiełkowania lub mają całkowicie uszkodzone zarodki oraz mogą zawierać toksyny fuzaryjne (Neuhof i in. 2008). Fuzarioza kłosów może powodować również redukcję plonu ziarna w przypadku bardzo silnej infekcji kłosów powodującej całkowite zahamowanie rozwoju ziarniaków lub silną redukcję ich masy (Yoshida i Nakajima 2010). W przeprowadzonych badaniach stwierdzono istotne zależności pomiędzy nasileniem porażenia kłosa a uszkodzeniem ziarniaków i redukcją plonu ziarna. W porównaniu z rokiem 2015 współczynnik korelacji miały wyższe wartości, co mogło wynikać z niekorzystnych warunków dla rozwoju fuzariozy kłosów w roku 2015 spowodowanych suszą.

Silne porażenie kłosa w większości przypadków skutkowało silnym uszkodzeniem ziarniaków i redukcją plonu. Część genotypów miała podwyższoną odporność typu III, co jest zjawiskiem korzystnym ponieważ porażenie kłosa nie prowadzi do silnego uszkodzania ziarna. Tolerancja wobec fuzariozę kłosów (dokładnie: tolerancja wobec fuzariozy kłosów lub trichotecenów) nie jest natomiast korzystna (Foroud i Eudes 2009). Prowadzi ona do uzyskania niezredukowanego plonu pozornie słabo uszkodzonych ziarniaków, które mogą być skażone mikotoksynami.

- Argyris J., Van Sanford D., TeKrony D. 2003. *Fusarium graminearum* infection during wheat seed development and its effect on seed quality. *Crop Sci* 43:1782–1788.
- Bechtel, D. B., Kaleikau, L. A., Gaines, R. L., and Seitz, L. M. 1985. The effects of *Fusarium graminearum* infection on wheat kernels. *Cereal Chem.* 62:191-197.
- Foroud, N. A., Eudes F. 2009. Trichothecenes in cereal grains. *Int. J. Mol. Sci.* 10:147-173.
- Mesterházy, A., 2002. Theory and practice of the breeding for *Fusarium* head blight resistance in wheat. *Journal of Applied Genetics* 43A, 289-302.
- Mesterházy, A., Tóth, B., Bartók, T., Varga, M., 2008. Breeding strategies against FHB in winter wheat and their relation to type I resistance. *Cereal Research Communications* 36, 37–43.
- Neuhof, T., Koch, M., Rasenko, T., Nehls, I., 2008. Distribution of trichothecenes, zearalenone, and ergosterol in a fractionated wheat harvest lot. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 56, 7566–7571.
- Yoshida, M., and Nakajima, T. 2010. Deoxynivalenol and nivalenol accumulation in wheat infected with *Fusarium graminearum* during grain development. *Phytopathology* 100:763-773.

Wnioski

1. Badane genotypy wykazały zróżnicowaną odporność na uszkodzenie ziarniaków przez *Fusarium* (typ III).
2. Indeks fuzariozy kłosów wysoko istotnie korelował z uszkodzeniem ziarniaków pszenicy.
3. Fuzarioza kłosów powodowała redukcję plonu ziarna z kłosa (typ IV odporności).
4. Stwierdzono istotne korelacje indeksu fuzariozy kłosów i uszkodzenia ziarniaków z redukcją plonu ziarna.
5. Zidentyfikowano genotypy o łączące typy odporności I+II, III i V.

4. 3. Temat badawczy 3: Analiza akumulacji/degradacji toksyn fuzaryjnych (typ V odporności)

Cel tematu

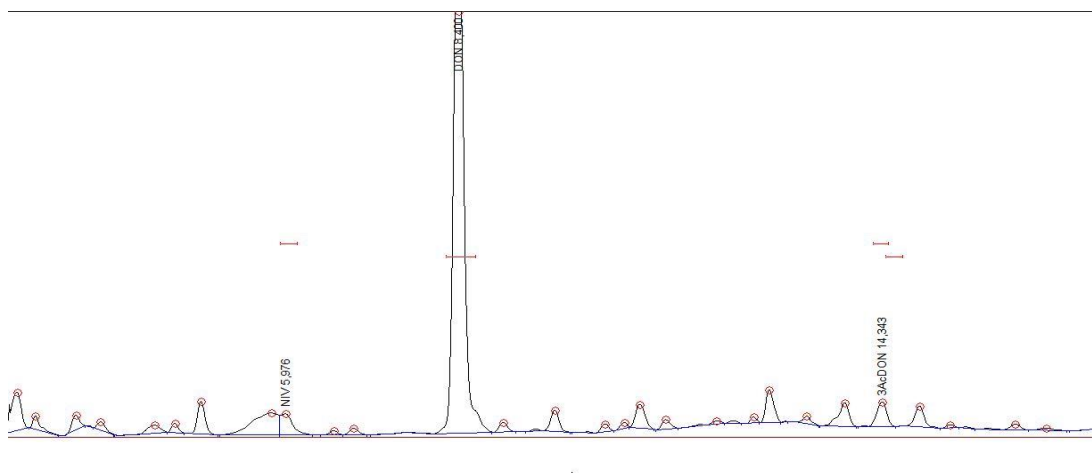
Określenie zawartości ergosterolu (wskaźnik zawartości grzybni) oraz toksyn fuzaryjnych – deoksyniwalenolu i pochodnych, niwalenolu i zearalenonu w ziarnie wybranych genotypów pszenicy wykazujących podwyższoną odporność na porażenie kłosa i uszkodzenie ziarniaków przez *Fusarium*.

Materialy 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 V 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).



Rysunek 1. Chromatogram deoksyniwalenolu (DON), niwalenolu (NIV) i 3-acetyl deoksyniwalenolu (3AcDON) w ziarnie pszenicy.

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 (rys. 1). Mikotoksyny 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 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.

- Bottalico A, Perrone G, 2002. Toxigenic *Fusarium* species and mycotoxins associated with head blight in small-grain cereals in Europe. *Eur. J. Plant Pathol.* 108: 998–1003.
- Mesterhazy A, Bartok T., Mirocha C.G., Komoroczy R. 1999. Nature of wheat resistance to *Fusarium* head blight and the role of deoxynivalenol for breeding. *Plant Breeding* 118: 97–110
- Perkowski, J., Wiwart, M., Buśko, M., Laskowska, M., Berthiller, A., Kandler, S., Krska, R., 2007. *Fusarium* toxins and total fungal biomass indicators in naturally contaminated wheat samples from north-eastern Poland in 2003. *Food Additiv Contam.* 24(11), 1292–1298.
- Perkowski, J., Buśko, M., Stuper, K., Kostecki, M., Matysiak, A., Sz wajkowska-Michałek, L., 2008. Concentration of ergosterol in small-grained naturally contaminated and inoculated cereals. *Biologia.* 63(4), 542–547.

Wyniki

Średnia zawartość deoksyniwalenolu (DON) w ziarnie genotypów odpornych pszenicy wynosiła 4,972 mg/kg. Zakres zmienności od 3,220 do 7,800 mg/kg. Dla wzorców odpornych było to 3,444 mg/kg (2,023 – 5,952 mg/kg), dla wzorców podatnych 8,757 mg/kg (8,072 – 9,430 mg/kg) oraz dla wzorców o wysokiej akumulacji toksyn 8,095 mg/kg (7,948 – 8,318 mg/kg). W Poznaniu zawartość DON wyniosła 4,043 mg/kg i była niższa niż w Radzikowie (5,902 mg/kg). Najmniej DON stwierdzono w ziarnie genotypów S 10 [Fhb1+], UNG 136.6.1.1 (VR), S 32 [Fhb1+], STH 2041, STH 9059, LAD 463/05, KBP 08 13, KBP 05.284; najwięcej DON było akumulowane w ziarnie genotypów DM 3873/10 (tox), DM 2728/09 (tox), SMH 8694 (S), DD 548/09 (tox), SMH 8816 (S), NAD 10079 (S) oraz DL 325/11/3 (S).

Stwierdzono obecność w ziarnie pszenicy pochodnej acetylowej DON – 3AcDON oraz niwalenolu (NIV). Brak było pochodnej acetylowej 15AcDON. Zawartość 3AcDON wyniosła średnio 0,195 mg/kg, zakres zmienności od 0,080 do 0,380 mg/kg. Wzorce odporne akumulowały średnio 0,150 mg/kg 3AcDON, wzorce podatne 0,398 mg/kg oraz wzorce o wysokiej akumulacji toksyn 0,333 mg/kg. Średnia zawartość NIV wyniosła 2,826 mg/kg, zakres zmienności od 1,060 do 4,595 mg/kg. Wzorce odporne akumulowały średnio 2,166 mg/kg NIV, wzorce podatne 5,402 mg/kg oraz wzorce o wysokiej akumulacji toksyn 5,445 mg/kg. Zawartość NIV w Poznaniu (4,353 mg/kg) była około 3-krotnie wyższa niż w Radzikowie (1,299 mg/kg).

Średnia sumaryczna zawartość trichotecenów z grupy B w ziarnie genotypów odpornych pszenicy wynosiła 7,993 mg/kg. Zakres zmienności od 4,911 do 12,615 mg/kg. Dla wzorców odpornych było to 5,760 mg/kg (3,472 – 9,194 mg/kg), dla wzorców podatnych 14,557 mg/kg (13,322 – 16,040 mg/kg) oraz dla wzorców o wysokiej akumulacji toksyn 13,873 mg/kg (13,254 – 14,378 mg/kg). W Poznaniu zawartość trichotecenów B wyniosła 8,549 mg/kg i była niższa niż w Radzikowie (7,437 mg/kg). Najmniej trichotecenów B stwierdzono w ziarnie genotypów S 10 [Fhb1+], S 32 [Fhb1+], UNG 136.6.1.1 (VR), POB 679/03, POB 0514, A40-19-1-2 (R), KBP 05.284, KBP 04.164, KBP 08 13, POB 759/04, STH 2041; najwięcej w ziarnie genotypów SMH 8980, NAD 11017, DM 2728/09 (tox), SMH 8694 (S), DM 3873/10 (tox), NAD 10079 (S), DD 548/09 (tox), SMH 8816 (S) oraz DL 325/11/3 (S).

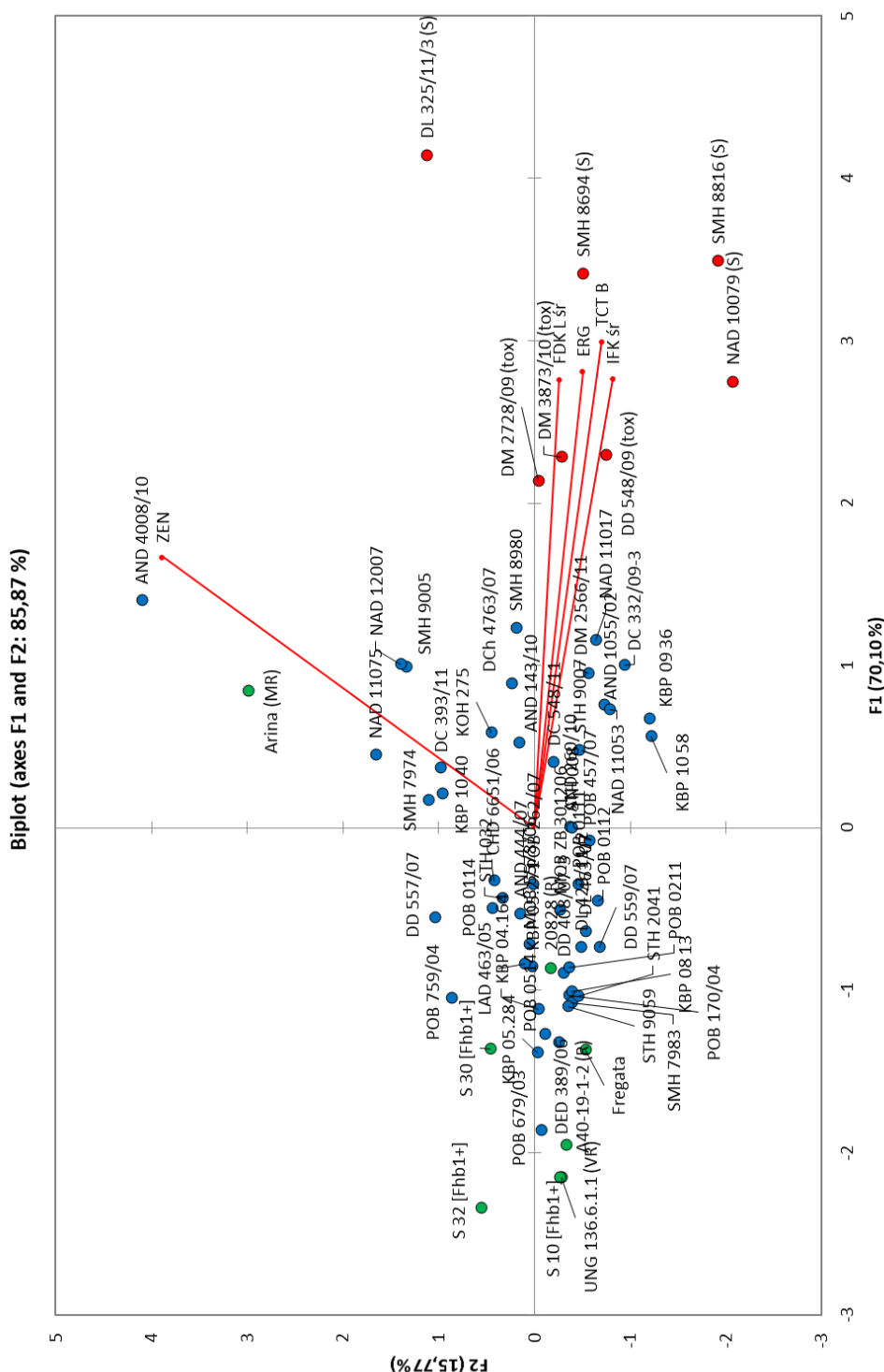
Zawartość zearalenonu (ZEN) w ziarnie pszenicy była niska i wynosiła średnio 263 µg/kg. Zakres zmienności od 38 do 1164 263 µg/kg. W Poznaniu zawartość ZEN była około 13-krotnie wyższa niż w Radzikowie, odpowiednio 488 i 37 µg/kg. Najmniej ZEN stwierdzono w ziarnie genotypów UNG 136.6.1.1 [Fhb1+], S 10 [Fhb1+], A40-19-1-2, Fregata, KBP 10 58, DD 559/07, STH 2041 oraz KBP 09 36; najwięcej w ziarnie genotypów SMH 9005, NAD 12007, NAD 11075, DL 325/11/3 (S), Arina (MR) oraz AND 4008/10.

Zawartość ergosterolu (ERG) w ziarnie pszenicy wynosiła średnio 18,0 mg/kg. Zakres zmienności od 6,7 do 35,1 mg/kg. W Poznaniu zawartość ERG była około 2-krotnie wyższa niż w Radzikowie, odpowiednio 23,1 mg/kg i 13,0 mg/kg. Najmniej ERG stwierdzono w ziarnie genotypów S 32 [Fhb1+], POB 679/03, UNG 136.6.1.1 [Fhb1+], S 10 [Fhb1+], A40-19-1-2 (R), KBP 08 13 oraz DED 389/06; najwięcej w ziarnie genotypów NAD 10079 (S), NAD 11053, DD 548/09 (tox), SMH 8816 (S), DL 325/11/3 (S).

Indeks fuzariozy kłosów korelował istotnie z zawartością trichotecenów oraz zearalenonu w ziarnie). Najniższy był współczynnik korelacji dla ZEN, najwyższy dla DON ($r=0,468$, $r=0,782$). Uszkodzenie ziarniaków korelowało istotnie z zawartościami wszystkich toksyn. Najwyższy był

współczynnik dla sumy trichotecenów, najniższy dla ZEN ($r=0,497$, $r=0,808$). Zawartość ergosterolu (miernik ilości grzybnii w ziarnie) korelowała istotnie z porażeniem kłosa, uszkodzeniem ziarniaków i zawartościami toksyn. Najwyższy był współczynnik dla sumy trichotecenów i DON, najniższy dla ZEN ($r=0,869$, $r=0,448$).

Za pomocą analizy składowych głównych zidentyfikowano genotypy łączące odporności różnych typów, czyli: typy I+II – indeks fuzariozy kłosów, typ III – uszkodzenie ziarniaków i zawartość ERG, typ IV – zawartość toksyn DON i ZEA; typ V – redukcja plonu ziarna (Rys. 2). Były to genotypy: S 32 [Fhb1+], UNG 136.6.1.1 [Fhb1+], S 10 [Fhb1+], A40-19-1-2 (R), POB 679/03, KBP 05.284, Fregata (R), S 30 [Fhb1+], DED 389/06, POB 0514, KBP 04.164, STH 9059, SMH 7983, STH 2041, POB 170/04, KBP 08 13.



Rysunek 2. Układ współrzędnych dwóch składowych głównych dla 66 genotypów pszenicy ozimej. Składowe wyjaśniają 70,10% zmienności odporności na fuzariozę kłosów mierzonej indeksem fuzariozy kłosów (IFK), uszkodzeniem ziarniaków (FDK L) oraz zawartością ergosterolu (ERG), zearalenonu (ZEN) i trichotecenów z grupy B (TCT B) w ziarnie w Radzikowie i Cerekwicy. Wektory wskazują kierunek wzrostu wartości zmiennych

Dyskusja

W roku bieżącym warunki były sprzyjające dla rozwoju fuzariozy kłosów obu lokalizacjach, na co wskazują wartości poszczególnych zmiennych charakteryzujących odporność na fuzariozę kłosów. Porażenie kłosa i ziarniaków było nieco niższe w Poznaniu niż w Radzikowie mimo stosowania systemu zamgławiania.

Zawartość ergosterolu w Radzikowie była około 6-krotnie wyższa niż w roku 2015, co wynikało ze bardziej sprzyjających warunków pogodowych dla rozwoju fuzariozy kłosów (Perkowski i in. 2008). Zawartość zearalenonu była wyższa 4-krotnie niż w roku 2015. W większości zawartość tej toksyny była powyżej limitu 100 µg/kg

Zawartość DON była o 50% wyższa w ziarnie pszenicy Radzikowa niż z Cerekwicy. Podobnie wyższa była zawartość pochodnej DON – 3AcDON. Natomiast zawartość niwalenolu była wyższa 3-krotnie w ziarnie pochodzącym z Poznania w porównaniu do ziarna z Radzikowa. Sumaryczne zawartości trichotecenów z grupy B były zbliżone w obu miejscowościach. Średnia zawartość trichotecenów była około 50% niższa niż w roku 2015, z tym, że w Radzikowie było 10-krotnie wyższa, natomiast w Cerekwicy (Poznaniu) około 3-krotnie niższa. Wyniki te pokazują bardzo silny wpływ warunków pogodowych na zawartość toksyn w ziarnie, zarówno tych w okresie kwitnienia i dojrzewania pszenicy, ale także warunków w podczas zimy, które w roku 2016 bardzo silnie wpłynęły na część genotypów o niższej zimotrwałości (Musa i in. 2007, Xu i in. 2007, van der Fels-Klerks i in. 2012).

W badaniach jako wzorce wykorzystano cztery linie z zidentyfikowaną obecnością genu odporności *Fhb1*. Trzy z tych linii wykazały wysoką odporność na fuzariozę kłosów oraz niską akumulację trichotecenów w ziarnie. Czwarta S32 [*Fhb1*+] wykazała równie niskie porażenia kłosa i ziarniaków jednakże około dwukrotnie wyższą akumulację trichotecenów. Pokazuje to, że nie w każdym przypadku obecność genu odporności przekłada się na jego ekspresję i ograniczanie zawartości trichotecenów.

Uzyskane wyniki pokazały, że w badanej populacji pszenicy ozimej pochodzącej z programów hodowlanych polskich hodowli istnieje zmienność odporności na akumulację toksyn fuzaryjnych w ziarnie. Dotyczy to zarówno trichotecenów, mających związek z agresywnością izolatów *Fusarium*, jak i zearalenonu (Lemmens i in. 2004, 2008, Cowger i Arellano 2013). Jest to ważne w przypadku zearalenonu, który kumuluje się w późniejszym etapie rozwoju fuzariozy kłosów niż trichoteceny. Toksyna ta szczególnie niebezpieczna dla zwierząt hodowlanych ze względu na działanie estrogenne (Minervini i Dell'Aquila 2008). Stwierdzono, że istotne były zależności pomiędzy porażeniem kłosa, uszkodzeniem ziarniaków a zawartością toksyn w ziarnie. Silniejsze zależności wystąpiły dla trichotecenów, słabsze dla zearalenonu. Przykładem są genotypy o niskiej akumulacji trichotecenów i dość wysokiej zawartości zearalenonu w ziarnie np. S 32 [*Fhb1*], POB 759/04, DD 557/07.

Dzięki stwierdzonym silnym zależnościom typów odporności możliwe jest wyselekcjonowanie genotypów łączących te odporności (Tamburic-Illincic i in. 2011). Genotypy takie są stabilne w różnych warunkach pogodowych i wykazują odporność zarówno na spadki plonu ziarna jak i skażenie ziarna przez toksyny powodowane przez fuzariozę kłosów (Burlakoti i in. 2010).

- Burlakoti, R.R., Mergoum, M., Kianian, S.F., Adhikari, T.B., 2010. Combining different resistance components enhances resistance to *Fusarium* head blight in spring wheat. *Euphytica* 172, 197–205.
- Cowger, C., Arellano, C., 2013. *Fusarium* graminearum infection and deoxynivalenol concentrations during development of wheat spikes. *Phytopathology* 103, 460–471.
- Lemmens, M., Buerstmayr, H., Krska, R., Schuhmacher, R., Grausgruber, H., Ruckebauer, P., 2004. The effect of inoculation treatment and long-term application of moisture on *Fusarium* head blight symptoms and deoxynivalenol contamination in wheat grains. *European Journal of Plant Pathology* 110, 299–308.
- Lemmens, M., Koutnik, A., Steiner, B., Buerstmayr, H., Berthiller, F., Schumacher, R., Maier, F., Schafer, W., 2008. Investigations on the ability of *Fhb1* to protect wheat against nivalenol and deoxynivalenol. *Cereal Research Communications* 36(B), 429–436.
- Minervini, F., Dell'Aquila, M. E. (2008). Zearalenone and reproductive function in farm animals. *International Journal of Molecular Sciences*, 9(12), 2570–84.
- Musa, T., Hecker, A., Vogelgsang, S. & Forrer, H.R. (2007) Forecasting of *Fusarium* head blight and deoxynivalenol content in winter wheat with FusaProg. *EPPO Bulletin* 37: 283–289.
- Neuhof, T., Koch, M., Rasenko, T., Nehls, I., 2008. Distribution of trichothecenes, zearalenone, and ergosterol in a fractionated wheat harvest lot. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 56, 7566–7571.
- Perkowski J, Buśko M, Stuper K, Kostecki M, Matysiak A, Sz wajkowska-Michałek L (2008) Concentration of ergosterol in small-grained naturally contaminated and inoculated cereals. *Biologia (Bratisl)* 63:542–547

- Tamburic-Ilincic, L., Falk, D.E., Schaafsma, A., 2011. *Fusarium* ratings in Ontario Winter Wheat Performance Trial (OWWPT) using an index that combines *Fusarium* head blight symptoms and deoxynivalenol levels. *Czech Journal of Genetics and Plant Breeding* 47, 115–122.
- van der Fels-Klerx, H.J., Olesen, J.E., Madsen, M.S. & Goedhart, P.W. (2012) Climate change increases deoxynivalenol contamination of wheat in north-western Europe. *Food additives & contaminants. Part A, Chemistry, analysis, control, exposure & risk assessment*, 29, 1593–604.
- Xu, X.-M., Monger, W., Ritieni, A., Nicholson, P., 2007. Effect of temperature and duration of wetness during initial infection periods on disease development, fungal biomass and mycotoxin concentrations on wheat inoculated with single, or combinations of, *Fusarium* species. *Plant Pathol.* 56, 943–956

Wnioski

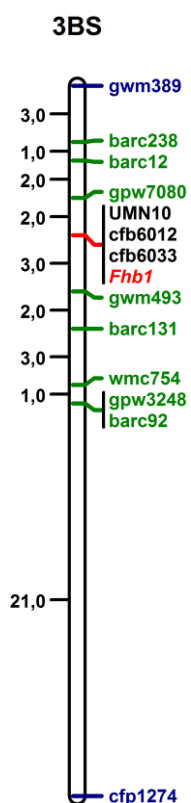
1. Badane genotypy wykazały zróżnicowaną odporność typu IV.
2. Zidentyfikowano genotypy pszenicy wykazujące odporność typu IV.
3. Indeks fuzariozy kłosów, stopień uszkodzenia ziarniaków oraz zawartość ergosterolu korelowały wysoko istotnie z zawartością trichotecenów w ziarnie.
4. Korelacja indeksu fuzariozy kłosów, stopnia uszkodzenia ziarniaków oraz zawartości ergosterolu była słabsza w przypadku zearalenonu.
5. Zidentyfikowano genotypy łączące podwyższony poziom odporności różnego typu.

4. 4. Temat badawczy 4

Cel tematu badawczego 4

Celem tematu było uzyskanie pokolenia F_1BC_2 pięciu kombinacji krzyżówkowych pszenicy ozimej po wcześniejszej selekcji molekularnej osobników pokolenia F_1BC_1 na obecność genu *Fhb1* odporności na fuzariozę kłosa. Cel został w pełni zrealizowany.

Materialy i metody



Rysunek 3. 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).

Selekcja wspomagana markerami molekularnymi (MAS). Do analiz wykorzystano łącznie 600 roślin pokolenia F_1BC_1 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_1 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. 3) (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. 3). 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*. Początkowo analizowano marker proksymalny cfp1274. Następnie, osobniki homozygotyczne w locus markera cfp1274 (w typie rodzica wypierającego) badano markerem dystalnym gwm389 (rys. 3).

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 (NH₄)₂SO₄ (Fermentas), 2,5mM MgCl₂ (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 i cfb6033 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 lub/i gwm389).

Krzyżowanie wsteczne i uzyskanie F₁BC₂ dla 5 kombinacji.

Po analizach molekularnych rośliny pokolenia F₁BC₁ o pożądanym układzie alleli w regionie występowania genu *Fhb1* były wykorzystane do krzyżowań wstecznych z odpowiednim rodzicem wypierającym: SMH8527, DL414/10, STH1178, MIB11262 lub NAD10041. 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. Wybrane formy rodzicielskie, w odpowiedniej fazie rozwojowej kłosa (przed kwitnieniem), były krzyżowane ze sobą tak, aby uzyskać w każdej kombinacji co najmniej 200 ziarniaków pokolenia F₁BC₂.

Wyniki

Badano pięć populacji pokolenia F₁BC₁, każda licząca po 120 roślin. Wyniki analiz, w których zastosowano wybrane markery molekularne przedstawiono na rys. 4.

| Populacje | | | | | Markery |
|--|---|------------------------------------|------------------------------------|------------------------------------|-----------------------------|
| AIII62 x SMH8527 | AIII62 x DL414/10 | AIII62 x STH1178 | AIII62 x MIB11262 | AIII62 x NAD10041 | UMN10 cfb6012 cfb6033 |
| 120 F ₁ BC ₁ | 120 F ₁ BC ₁ | 120 F ₁ BC ₁ | 120 F ₁ BC ₁ | 120 F ₁ BC ₁ | = 600 |
| ↓ | ↓ | ↓ | ↓ | ↓ | ⚡ |
| Heterozygoty dla markera centralnego (UMN10, cfb6012, cfb6033) | 54 | 56 | 55 | 66 | 70 |
| | | | | | = 301 |
| ↓ | ↓ | ↓ | ↓ | ↓ | ⚡ |
| Homozygoty dla markera flankującego proksymalnie (cfp1274) | 8 | 9 | 15 | 9 | 12 |
| | | | | | = 53 |
| ↓ | ↓ | ↓ | ↓ | ↓ | ⚡ |
| Homozygoty dla markera flankującego dystalnie (gwm389) | 1 | 1 | 1 | 0 | 0 |
| | | | | | = 3 |
| | 8 | 9 | 15 | 9 | 12 |
| | Liczba roślin o pożądanym układzie alleli (formy rodzicielskie do krzyżowań wstecznych) | | | | |

Rysunek 4. Schemat prac i liczba osobników w poszczególnych populacjach na kolejnych etapach selekcji markerami molekularnymi.

Końcowym wynikiem przeprowadzonych analiz MAS jest uzyskanie w każdej populacji 8 – 12 osobników o pożądanym układzie alleli, tzn. heterozygoty w locus markera centralnego (UMN10 lub cfb6012 lub cfb6033) i homozygoty (w typie rodzica wypierającego) w locus markera flankującego proksymalnie cfp1274. Łącznie zidentyfikowano 53 osobniki o pożądanym układzie alleli. Wśród tych osobników wykonano również analizę w poszukiwaniu homozygot (w typie rodzica wypierającego) w locus drugiego markera flankującego (dystalnie) gwm389, która umożliwiła identyfikację 3 poświadanych roślin (po jednej w populacjach: SMH8527 × AIII62, DL414/10 × AIII62 i STH1178 × AIII62) (rys. 4).

Po analizie MAS wybrane rośliny z każdej populacji posłużyły do krzyżowania wstecznego z odpowiednim rodzicem wypierającym: SMH8527, DL414/10, STH1178, MIB11262 i NAD10041. Liczbę nasion pokolenia F₁BC₂ zebranych z poszczególnych kombinacji krzyżówkowych przedstawiono w tabeli 2.

Tabela 2. Liczba nasion pokolenia F₁BC₂ zebranych po skrzyżowaniu F₁BC₂ i biorcy genu *Fhb1* w poszczególnych kombinacjach.

| L.p. | Kombinacja | Liczba nasion |
|------|---|---------------|
| 1. | ((SMH8527 × AIII62) × SMH8527) × SMH8527 | 186 |
| 2. | ((DL414/10 × AIII62) × DL414/10) × DL414/10 | 213 |
| 3. | ((STH1178 × AIII62) × STH1178) × STH1178 | 307 |
| 4. | ((MIB11262 × AIII62) × MIB11262) × MIB11262 | 262 |
| 5. | ((NAD10041 × AIII62) × NAD10041) × NAD10041 | 235 |

Dyskusja

W hodowli roślin krzyżowania wsteczne (wypierające) są szeroko stosowaną metodą wprowadzania jednej lub kilku cech jednocześnie do genotypów o wysokiej wartości użytkowej (biorca), które tych cech są pozbawione (Michalik 2010). Zazwyczaj źródłem korzystnych cech (o które chcemy ulepszyć nasze materiały) są odmiany/linie (dawcy), które dodatkowo zawierają bardzo wiele niepoświadanych cech. Stąd wynika konieczność wykonania wielu cykli krzyżowań wstecznych i selekcji, które w ostatecznym rozrachunku pozwalają uzyskać nowy, ulepszony o wprowadzaną cechę genotyp, który jest zbliżony genetycznie do rodzica wypierającego.

Wykorzystanie markerów molekularnych w krzyżowaniach wstecznych (ang. Marker Assisted Backcrossing, MABC) (Collard i Mackill 2008) zdecydowanie zwiększyło efektywność selekcji poświadanych genotypów. W roszczerzonej wersji MABC, poza selekcją roślin w populacji mieszańcowej, które zawierają marker molekularny sprzężony z wprowadzanym (docelowym) genem (ang. Foreground Selection, FS), dodatkowo poszukuje się obiektów dla których doszło do rekombinacji pomiędzy markerem flankującym i wprowadzanym genem, tzw. selekcja rekombinantów (ang. Recombinant Selection, RS). Zasadniczym celem tak pomyślanej selekcji jest zmniejszenie rozmiarów segmentu chromosomu dawcy zawierającego pożądaną gen, co ma zapobiec wprowadzeniu do genomu biorcy wielu niepoświadanych genów, które mogą być z nim sprzężone (Collard i Mackill 2008).

W przypadku badań prowadzonych w ramach niniejszego tematu, gen *Fhb1* jest wprowadzany na drodze dwóch krzyżowań wstecznych. Teoretycznie, aby otrzymać po dwóch krzyżowaniach wstecznych przynajmniej jednego osobnika heterozygotycznego dla markera centralnego i homozygotycznego dla flankujących markerów (gwm389 i cfp1274, chromosom 3B) w typie alleli rodziców wypierających należy w każdym pokoleniu (tj. F₁BC₁ i F₁BC₂) przebadать przynajmniej po 62 osobniki przy poziomie prawdopodobieństwa $P = 0,99$ (Hospital 2001, Hospital i Decoux 2002). W związku z tym, badana łączna liczba 600 osobników wydaje się rozsądnym kompromisem pomiędzy praktycznym aspektem analiz (nakład pracy i koszty) a możliwością osiągnięcia sukcesu, co najmniej (teoretycznie) dwa osobniki na kombinację o właściwym układzie alleli. Co więcej, w naszych badaniach już w pokoleniu F₁BC₁ uzyskano trzy osobniki (na 600 badanych) o pożądanym końcowym układzie alleli. Jest to wynik lepszy od tego jaki przewiduje teoria, ponieważ zakłada one, że przy poziomie prawdopodobieństwa $P=0,99$ otrzymanie przynajmniej jednego osobnika heterozygotycznego dla markera centralnego i homozygotycznego dla flankujących markerów (gwm389 i cfp1274, chromosom 3B) w typie alleli rodziców wypierających (przypadek podwójnego crossing-over) należy w pokoleniu F₁BC₁ przebadать 550 osobników (Hospital 2001, Hospital i Decoux 2002). Wyższą częstość tego zjawiska w naszych analizach (3 na 600 roślin) można przypisać zwiększonej częstości rekombinacji tego regionu chromosomu (dystalny koniec ramienia chromosomu) w porównaniu do jego pozostałej części (Saintenac i in. 2009). W związku z tym,

uzyskane w bieżącym roku liczebności nasion pokolenia F_1BC_2 (186 – 307) w pełni zabezpieczają liczbę roślin, które po selekcji molekularnej (na obecność genu *Fhb1*) będą wykorzystane do uzyskania odpowiedniej liczby osobników w pokoleniu F_2BC_2 o pożądanym układzie alleli w badanych loci markerów molekularnych.

Wnioski

1. Markery molekularne użyte w badaniach potwierdziły swoją przydatność w selekcji pożądaných genotypów.
2. Otrzymana liczba nasion w poszczególnych kombinacjach krzyżówkowych pokolenia F_1BC_2 zapewnia wykonanie koniecznych analiz molekularnych w następnym roku realizacji tematu.

Literatura

- Buerstmayr H., Ban t., Anderson J.A. 2009. QTL mapping and marker-assisted selection for Fusarium head blight resistance in wheat: a review. *Plant Breeding* 128: 1-26.
- Collard B.C.Y., Mackill D.J. 2008. Marker-assisted selection: an approach for precision plant breeding in the twenty-first century. *Phil. Trans. R. Soc. B* (2008) 363: 557–572
- Czembor P.Cz., K. Sejbuk, R. Kleszcz. 2014. Evaluation of a partially-automated magnetic bead-based method for DNA extraction for wheat and barley MAS. *Cereal Research Communications* 42(1): 27–37.
- Hao C., Wang Y., Hou J., Feuillet C., Balfourier F., et al. 2012. Association mapping and haplotype analysis of a 3.1-Mb genomic region involved in fusarium head blight resistance on wheat chromosome 3BS. *PLoS ONE* 7(10): e46444. doi:10.1371/journal.pone.0046444.
- Hao C.Y., Perretant M.R., Choulet F., Wang L.F., Paux E., Sourdille P., Zhang X.Y., Feuillet C., Balfourier F. 2010. Genetic diversity and linkage disequilibrium studies on a 3.1-Mb genomic region of chromosome 3B in European and Asian bread wheat (*Triticum aestivum* L.) populations. *Theor. Appl. Genet.* 121: 1209-1225.
- Hospital F. 2001. Size of donor chromosome segments around introgressed loci and reduction of linkage drag in marker-assisted backcross programs. *Genetics* 158: 1363-1379.
- Hospital F., Decoux G. 2002. Popmin: a program for the numerical optimization of population sizes in marker-assisted backcross programs. *J. Hered.* 93: 383-384.
- Liu S., Pumphrey M.O., Gill B.S., Trick H.N., Zhang J.X., i in. 2008. Toward positional cloning of FHB1, a major QTL for fusarium head blight resistance in wheat. *Cereal Res Commun (Suppl B)* 36: 195–201.
- Michalik B. 2010. Hodowla roślin z elementami genetyki i biotechnologii. PWRiL, wyd. I.
- Paux E., Sourdille P., Salse J., Sautenac C. i in. 2008. A physical map of 1-gigabase bread wheat chromosome 3B. *Science* 322: 101-104.
- Ramplung L. R., Harker N., Shariflou M. R., Morell M. K. 2001. Detection and analysis systems for microsatellite markers in wheat. *Aust. J. Agric. Res.* 52: 1131–1141.
- Röder M.S., Korzun V., Wendehake K., Plaschke J., Tixier M.H., Leroy P. and Ganal M.W. 1998. A microsatellite map of wheat. *Genetics*, 149: 2007-2023.
- Sautenac C., Falque M., Martin O.C., Paux E., Feuillet C., Sourdille P. 2009. Detailed recombination studies along chromosome 3B provide new insights on crossover distribution in wheat (*Triticum aestivum* L.). *Genetics* 181: 393–403.
- Somers D.J., P. Isaac, K. Edwards. 2004. A high density microsatellite consensus map for bread wheat (*Triticum aestivum* L.). *Theor. Appl. Genet.* 109(6):1105-1114.
- Song Q. J., Shi J. R., Singh S., Fickus E. W., Costa J. M., Lewis J., Gill B. S., Ward R., Cregan P. B. 2005. Development and mapping of microsatellite (SSR) markers in wheat. *Theor. Appl. Genet.* 110: 550–560.
- Strona internetowa. GrainGenes: a database for Triticea and Avena, <http://wheat.pw.usda.gov/GG2/index.shtml>. 2012.