

PSZENŻYTO

Wiśniewska^{1*} Halina, Twardawska¹ Adriana, Góral² Tomasz, Ochodzki² Piotr, Majka¹ Maciej, Walentyn-Góral² Dorota, Belter¹ Jolanta

¹ Instytut Genetyki Roślin, Polska Akademia Nauk, Poznań

² Instytut Hodowli i Aklimatyzacji Roślin, Państwowy Instytut Badawczy, Radzików

*Halina Wiśniewska: hwis@igr.poznan.pl, 662 044 293

Prace zostały wykonane w ramach badań podstawowych na rzecz postępu biologicznego w produkcji roślinnej na podstawie decyzji: nr decyzji (HOR.hn.802.2.2019), **Zadanie nr 14.**

Badanie typów odporności na fuzariozę kłosów u pszenżyta ozimego za pomocą markerów fenotypowych i metabolicznych

Evaluation of Fusarium head blight resistance types in winter triticale using phenotypic and metabolic markers

Słowa kluczowe: fuzarioza kłosów, gen *Fhb1*, pszenżyto, mykotoksyny

Wprowadzenie

Pszenżyto jako całkowicie syntetyczny gatunek należący do zbóż, jest bardzo szeroko wykorzystywane w współczesnym rolnictwie. Ten rodzaj zboża stosowany jest głównie do produkcji pasz, ze względu na obecność dobrze stawianych białek i wysoką plenność. Nowe odmiany pszenżyta wykazują podatność na fuzariozę kłosów, a także na kumulację toksyn fuzaryjnych. Patogeneza fuzariozy kłosów jest złożona i wyróżnia się kilka typów odporności. Szczególnym problemem związanym z fuzariozą kłosów jest skażenie ziarna mykotoksynami (miedzy innymi deoksyniwalenol, niwalenol, zearalenon), które stanowią duże zagrożenie dla zdrowia ludzi oraz zwierząt.

Odporność na grzyby patogeniczne z rodzaju *Fusarium* warunkowana jest przez wiele *locus* cech ilościowych (QTL), przy czym główne źródło stanowi *locus* genu *Fhb1* zlokalizowany w krótkim ramieniu chromosomu 3B. Jest to główny QTL odpowiadający za bardzo wysoką i stabilną odporność na fuzariozę, który obecny jest w odmianie pszenicy Sumai3. Aktualnie poszukiwane są nowe źródła odporności np. QTL genu *Fhb2*, znajdujący się na krótkim ramieniu chromosomu 6B.

Ma on jednak znacznie mniejszy wpływ na całkowitą odporność na fuzariozę kłosów. W związku z załamaniem odporności pszenżyta na patogeny z rodzaju *Fusarium*, przeprowadzane są krzyżowania oddalone w celu poszerzenia zmienności genetycznej tego zboża. Nowe geny wprowadzane są z gatunków *Triticum monococcum* oraz *Aegilops* spp.

Cele projektu:

1. Badanie odporności typu I i II na fuzariozę kłosów u wybranych genotypów pszenżyta ozimego w dwóch lokalizacjach z wykorzystaniem markerów fenotypowych.
2. Fenotypowanie porażenia kłosów wybranych genotypów pszenżyta w doświadczeniach infekcyjnych w dodatkowych lokalizacjach oraz kolejne krzyżowania wsteczne i analiza molekularna mieszańców uzyskanych z przekrzyżowań.
3. Ocena odporności na uszkodzenie ziarna (typ III odporności) oraz określenie redukcji parametrów struktury plonu w testowanych genotypach po inokulacji (typ IV odporności).
4. Określenie u pszenżyta ozimego odporności typu V, kumulacja/degradacja toksyn.

Materialy i metody

Material badawczy w 2019 roku

1. Pszenżyto ozime o zróżnicowanym podłożu genetycznym – **temat badawczy 1, 2, 3 i 4**
2. Genotypy pszenżyta z introgresją chromatyny *Triticum monococcum* i substytucjami genomu D pszenicy (BW) - **temat badawczy nr 1 i 2**
3. Formy przekrzyżowań wstecznych pokolenia BC₄/BC₅; linie pszenżyta ozimego posiadające gen *Fhb1*; linie DH pszenżyta ozimego cechujące się obecnością genów odporności na rdzę brunatną oraz żółtą; wysokoplonujące linie pszenżyta ozimego – **temat badawczy 2**

Metody badawcze:

Badanie a odporności genotypów pszenżyta wykonano metodą inokulacji poprzez oprysk (Typ I i Typ II odporności) w warunkach polowych w dwóch lokalizacjach oraz metodą inokulacji punktowej (typ II odporności, rozprzestrzenianie się patogenu wzdłuż osadki kłosowej) w IHAR Radzików - **temat badawczy nr 1**; identyfikacja genu odporności *Fhb1* warunkującego podwyższoną odporność na fuzariozę, w uzyskanych mieszańcach BC₄ i BC₅ z wykorzystaniem markera *UMN_10* oraz na jego podstawie nowo zaprojektowanych starterów- **temat badawczy nr 2**; analiza typu III odporności (na uszkodzenie ziarniaków przez *Fusarium*) poprzez wizualną ocenę proporcji ziarniaków uszkodzonych przez *Fusarium* (FDK) i ziarniaków wyglądających zdrowo (HLK). Analiza redukcji komponentów struktury plonu ziarna u badanych genotypów po inokulacji:

masy ziarna z kłosa (MZK), liczby ziarniaków w kłosie (LZK), masy tysiąca ziarniaków (MTZ) w odniesieniu do prób kontrolnych (typ odporności IV)- **temat badawczy nr 3**; analiza odporności na kumulację/degradację toksyn fuzaryjnych (deoksyniwalenolu, niwalenolu, zearalenonu) w ziarniakach (typ V odporności) przy wykorzystaniu spektrometrii mas HPLC u genotypów o najwyższej odporności i najniższej obniżce plonu- **temat badawczy nr 4**.

WYNIKI

Temat badawczy nr 1

Doświadczenia infekcyjne w IHAR-PIB Radzików i IGR PAN Poznań z genotypami pszenżyta ozimego

Porażenie kłosów przez *Fusarium* w teście inokulacyjnym polowym w lokalizacji Cerekwica-Poznań było niskie, pomimo zastosowania mikrozaszania. Wynikało to z niewielkich opadów w okresie kwitnienia pszenżyta w tej lokalizacji Poznań. Średnie porażenie kłosów (IFK%) u pszenżyta ozimego o zróżnicowanym podłożu genetycznym było wyższe w Radzikowie (11,6%) niż w Poznaniu (3,1%) i wahało się odpowiednio od 1,7% do 34,7% w Radzikowie oraz od 0,1% do 14% w a Poznaniu. Porażenie badanych genotypów w obu lokalizacjach było zróżnicowane., natomiast średnia wynosiła 7,4% w zakresie of 1,0% do 19,6%. Najniższe porażenie (<2%) obserwowano u trzech genotypów (BOH 15W0005, DANKO 20/18 i MAH_33097-1).

Prowadzono również inokulacje 50 genotypów o podwyższonej odporności stwierdzonej w poprzednich latach realizacji projektu. Średnio w obu lokalizacjach porażenie kłosów pszenżyta (IFK%) wynosiło 3,3% i wahało się od 0,9% do 12,1%. Współczynnik korelacji pomiędzy indeksami fuzariozy kłosów w obu lokalizacjach był istotny, jednakże niski i wynosił $r = 0,388$. Analiza składowych głównych wykazuje, że większość genotypów wybranych w latach poprzednich wykazała oporność na porażenie kłosa w obu środowiskach.

Dodatkowo w lokalizacji Poznań-Cerekwica w warunkach polowych testowano również 40 genotypów pszenżyta z introgresją chromatyny *Triticum monococcum* i substytucjami genomu D pszenicy odmiany Panda. Oceniając porażenie kłosa (%IFK) u tych linii stwierdzono średnio dla wszystkich linii niewielkie porażenie IFK = 2,7% w zakresie od 0 do 4,8 %.

W doświadczeniach w IHAR Radzików badano odporność typu I i II u genotypów pszenżyta z introgresją chromatyny *Triticum monococcum* i substytucjami genomu D pszenicy (BW) oraz pszenżyta o podwyższonej odporności na *Fusarium*. Średnia odporność typu I i II wyniosła 2,2, zakres reakcji od 1,1 do 3,5 . Indeks fuzariozy kłosów wyniósł IFK = 46,3%, zakres zmienności od 30,0% do 70,0%. Najwyższą odporność wszystkich badanych typów, na poziomie linii z *Fhb1*,

wykazały linie 207 W 2/1 i 224 W 2/3. Linia 224 W 2/3 wykazała również bardzo niskie porażenie w doświadczeniu polowym w Poznaniu. Średnia odporność typu I i II u genotypów pszenżyta z lat poprzednich wyniosła 1,8, zakres reakcji od 1,1 do 2,9. Indeks fuzariozy kłosów wyniósł IFK(%) = 35,3 zakres zmienności od 20,0% do 60,0%. Wyznaczając współczynniki korelacji stwierdzono, że średnia odporność typu I i II korelowała istotnie z IFK w w Radzikowie oraz ze średnim IFK z obu lokalizacji. Odporność typu I korelowała istotnie z IFK genotypów badanych w Radzikowie. Odporność typu II nie korelowała z IFK w warunkach polowych. Najwyższą odporność wszystkich badanych typów odporności oraz odporność w doświadczeniach polowych wykazały genotypy: DANKO 20/16, DS. 9, DL 446/08, DANKO 21 (2015), DS 1238, MAH 33115-4/1, BOHD 1025-2.

Temat badawczy nr 2

Doświadczenia infekcyjne w dodatkowych lokalizacjach. Krzyżowanie wybranych genotypów pszenżyta, rozmnażanie uzyskanych mieszańców

Inokulację kłosów pszenżyta 3 szczepami *Fusarium culmorum* przeprowadzono w dodatkowych lokalizacjach (Dębina, Borowo, Małyszyn, Szelejewo). Objawy fuzariozy kłosów wystąpiły jedynie w Dębinie. Indeksy fuzariozy kłosów z Radzikowa, Poznania, obu tych lokalizacji oraz z Dębiny korelowały istotnie, jednakże miały niskie wartości. Były one wyższe niż w roku 2018, kiedy to nie stwierdzono korelacji IFK obserwowanego w Poznaniu i Radzikowie. Najwyższą wartość przyjął współczynnik korelacji średniego IFK z Poznania i Radzikowa z IFK obserwowanym w Dębinie. Zidentyfikowano genotypy o niskiej podatności na fuzariozę kłosów, których reakcja była stabilna w 3 lokalizacjach doświadczalnych. Były to genotypy: BOH 15W0005, DANKO 25/18, MAH_33097-1, DANKO 4/18, DANKO 13/18, BOH 15L0012, BOH 2176-1/1, MAH_35108-18. Średni IFK dla nowych genotypów wynosił 7,4%, natomiast dla odpornych 2,8%.

W 2019 roku wykonano przekrzyżowania wsteczne form BC₃ i BC₄ (z odmianą Twingo lub linią MAH 7314). Uzyskano 116 ziarniaków pokolenia BC₄ oraz 546 ziarniaków pokolenia BC₅. Spośród nich 3 formy BC₄ oraz 24 formy BC₅ charakteryzowały się obecnością genu *Fhb1*. W 2019 roku dla porzerzenia zmienności pszenżyta wykorzystano również linie pszenżyta ozimego z genem odporności na fuzariozę kłosów (*Fhb1*) oraz linie DH pszenżyta posiadające geny odporności na rdzę brunatną oraz żółtą oraz wysokoplonujące linie pszenżyta ozimego. Linie stanowiące komponenty krzyżówkowe przeanalizowano pod kątem obecnością genu *Fhb1*. W wyniku krzyżowań uzyskano 56 form krzyżówkowych pokolenia F1 oraz 1407 ziarniaków.

Temat badawczy nr 3

Analiza zebranego materiału pod kątem oceny odporności na uszkodzenie ziarniaków (typ III odporności)

Obserwowano różnice w wartościach parametrów struktury plonu dla genotypów pszenżyta inokulowanego szczepami *F. culmorum* w Poznaniu. W 2019 roku w lokalizacji Poznań stwierdzono niewielkie porażenie ziarna (średnio 2,72 % FDK m) w zakresie od 0,48 % (DANKO 3/17) do 7,77% FDK (BOH 15L0026). U siedmiu genotypów pszenżyta odnotowano niewielkie, do 1% porażenie ziarna. Natomiast u 7 genotypów stwierdzono porażenie ziarna powyżej 5 % FDK. W lokalizacji Radzików średnie porażenie ziarna było wyższe i wyniosło FDK m = 4,94%. Wahało się w granicach od 0,74% do 10,54%. Procent ziarna z objawami fuzariozy (%FDK liczba) po inokulacji w Poznaniu wynosił średnio 5,53 % (FDK l) i wahał się od 1,32 % do 13,97%. U 13 genotypów pszenżyta odnotowano bardzo niewielkie porażenie ziarna do 3% FDK l. Badany w ubiegłych latach genotyp DANKO 3/17, w tym roku wykazywał najniższą masę i liczbę porażonego ziarna.

Procent ziarna z objawami fuzariozy (%FDK liczba) po inokulacji w Radzikowie wynosił średnio 6,49 % (FDK l) i wahał się od 1,26 % do 14,21%. Średnio uszkodzenie ziarniaków w obu lokalizacjach wynosiło FDK m = 3,83% i FDK L = 6,01%. Najslabiej porażone ziarno wykazano u genotypów DS. 9, DANKO 3/17, MAH 33097-1 i MAH 35108-18. Średnia masa tysiąca ziarniaków dla genotypów po inokulacji w Poznaniu wynosiła 41,14g i wahała się od 34,86g do 58,69g. W Radzikowie było to 41,23g, od 31,88 g do 50,79 g, natomiast średnia MTZ w obu lokalizacjach wynosiła 42,69g. IFK% w Poznaniu i Radzikowie korelowały z wartościami FDK uzyskanymi w tych lokalizacjach.

Średnia obniżka parametrów struktury plonu po inokulacji dla genotypów pszenżyta ozimego w lokalizacji Poznań wynosiła w stosunku do kontroli: 9,6% dla masy ziarna, 7,2% dla liczby ziarna, a dla masy tysiąca ziarniaków 6,1. W Radzikowie było to odpowiednio 4,5%, 3,4% oraz 2,9%.

Średnio redukcja masy ziarna z kłosa wyniosła 7,0%, zakres zmienności od 0 do 22,6%. Redukcja liczby ziarniaków w kłosie wynosiła 5,3%, zakres zmienności od 0 do 14,2%. Redukcja masy tysiąca ziarniaków wyniosła średnio 4,5%, zakres zmienności od 0 do 16,1%.

Redukcje parametrów struktury plonu korelowały istotnie z indeksem fuzariozy kłosów. Najwyższy był współczynnik dla redukcji MZK. Wyższe były współczynniki korelacji uszkodzenia ziarniaków z redukcjami MZK i LZK. Natomiast dla MTZ współczynniki były nieistotne.

Najniższe redukcje parametrów plonu w połączeniu z słabym porażeniem kłosa i małym uszkodzeniem ziarniaków wykazały genotypy DS. 9, DANKO 3/17, DC 03326/06/2, BOHD 898-1, MAH 34359-1, MAH_34752-1, DANKO 21 (2015), BOH 537-2, BOH 1622-9 oraz BOH 15W0005, DANKO 20/18, BOH 15L0013 z DW 2018/2019.

Temat badawczy nr 4

Analiza zawartości toksyn fuzaryjnych w ziarnie, kumulacja/degradacja toksyn (typ V odporności)

Badano akumulację toksyn fuzaryjnych: deoksyniwalenol (DON) i pochodne acetylowe, niwalenol (NIV) oraz zearalenon (ZEN) w ziarnie genotypów pszenżyta ozimego po inokulacji trzema szczepami *F. culmorum*. We wszystkich próbach stwierdzono obecność DON i NIV. Brak było pochodnej 15Ac-DON. Pochodna 3Ac-DON występowała w ilościach śladowych, nie została więc uwzględniona w przedstawianych wynikach.

Zawartość trichotecenów w ziarnie pszenżyta w roku 2019 była niska i wynosiła średnio DON 0,660 mg/kg, NIV 0,270 mg/kg, suma trichotecenów 0,929 mg/kg. W Poznaniu zawartość mykotoksyn była kilkukrotnie wyższa. Sumaryczna zawartość trichotecenów wyniosła w Poznaniu 1,584 mg/kg, natomiast w Radzikowie 0,274 mg/kg. Zakres zmienności w Poznaniu wyniósł 0,170 – 6,153 mg/kg, w Radzikowie 0,021 – 1,082 mg/kg.

Najniższe zawartości DON stwierdzono u genotypów DANKO 3/17, MAH 33097-1, BOHD 898-1, DANKO 2/17, DS. 9. Natomiast najniższe zawartości NIV stwierdzono u genotypów DANKO 3/17, DS. 9, BOHD 898-1, BOHD 1025-2. Sumarycznie najmniej trichotecenów B było w ziarnie genotypów DANKO 3/17, MAH 33097-1, DS. 9, BOHD 898-1. Najwięcej trichotecenów B było w ziarnie genotypów Porto, MAH 33116-7/1 (S), MAH 34068-5 (S).

Zawartość ZEN była bardzo niska i tylko w jednej próbie ziarna była powyżej limitu detekcji LOD = 0,020 mg/kg.

IFK oraz FDK m i FDK L korelowały istotnie z zawartością DON, NIV i sumaryczną zawartością trichotecenów B. Najwyższe były współczynniki korelacji pomiędzy FDK L i zawartościami trichotecenów B w ziarnie.

Podsumowanie

Analiza wieloczynnikowa pozwoliła na zidentyfikowanie genotypów łączących odporności różnych typów. Są to DS. 9, BOHD 898-1, DANKO 3/17, MAH 33097-1, BOHD 1025-2, BOH 537-2, MAH35108-18, BOH 15W0005. Trzy z nich to nowe genotypy pochodzące w Doświadczenia Wstępnego 2018/2019 .