

PSZENŻYTO

Wiśniewska^{1*} Halina, Twardawska¹ Adriana, Góral² Tomasz, Ochodzki² Piotr, 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, tel.: 662 044 293

Prace zostały wykonane w ramach badań podstawowych na rzecz postępu biologicznego w produkcji roślinnej na podstawie decyzji: *nr decyzji* ((Znak sprawy: KS.zb.802.2.2020))

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 uprawne heksaploidalne (*X Triticosecale* Wittmack, $2n=6x=42$) jest sztucznie otrzymanym zbożem, powstałym w wyniku skrzyżowania pszenicy (*Triticum aestivum* L.) z żytem (*Secale cereale* L.) zawierającym genomy A i B z rodzaju *Triticum* oraz R z rodzaju *Secale*. W Polsce zainteresowanie tym zbożem jest bardzo duże z powodu dużego udziału gleb lekkich i zakwaszonych w ogólnej puli gruntów ornych. Atrybutami pszenżyta są: duża plenność oraz dobra jakość ziarna przeznaczonego na paszę, charakteryzująca się wysoką zawartością białka o korzystnym składzie aminokwasowym i wysokim współczynnikiem strawności (Arseniuk i Oleksiak, 2002).

Pszenżyto, jako rodzaj całkowicie syntetyczny posiada wąski zakres zmienności genetycznej z racji braku przejścia ewolucji. Liczne nowe odmiany pszenżyta okazują się podatne na fuzariozę kłosów na poziomie zbliżonym do pszenicy. Fuzarioza kłosów może prowadzić do obniżenia plonu ziarna. Jednakże poważniejszym problemem związanym z fuzariozą kłosów jest skażenie ziarna mykotoksynami takimi jak deoksyniwalenol (DON), niwalenol (NIV), zearalenon (ZEA), które są związkami niezwykle stabilnymi, nie ulegają metabolizowaniu i są szkodliwe dla człowieka i zwierząt. Skażenie ziarna mykotoksynami stwierdza się nawet wtedy, kiedy nie obserwuje się obniżki plonu. Najbardziej skutecznym sposobem redukcji strat powodowanych przez fuzariozę kłosów zbóż może być uprawa odmian odpornych. Głównym źródłem odporności jest QTL *Fhb1* zlokalizowany w krótkim ramieniu chromosomu 3B. Jest to główny QTL odpowiadający za bardzo wysoką odporność na fuzariozę, który obecny jest w odmianie pszenicy Sumai 3, stanowiącej wzorzec odporności na tę chorobę.

Cele zadania

1. **Celem tematu badawczego nr 1** było badanie odporności typu 1 i 2 na fuzariozę kłosów u wybranych genotypów pszenżyta ozimego w dwóch lokalizacjach z wykorzystaniem markerów

fenotypowych.

2. **Celem tematu badawczego nr 2** było fenotypowanie porażenia kłosów wybranych genotypów pszenżyta w doświadczeniach infekcyjnych w dodatkowych lokalizacjach oraz kolejne krzyżowania wsteczne i analiza molekularna mieszańców uzyskanych z przekrzyżowań.

3. **Celem tematu badawczego nr 3** była ocena odporności na uszkodzenie ziarna (typ 3 odporności) oraz określenie redukcji parametrów struktury plonu w testowanych genotypach po inokulacji (typ 4 odporności).

4. **Celem tematu badawczego nr 4** było określenie u pszenżyta ozimego odporności typu 5- kumulacja/degradacja toksyn.

Materialy i metody

Material:

1. Pszenżyto ozime o zróżnicowanym podłożu genetycznym – **temat badawczy nr 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 z 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 (uzyskane we wcześniejszych pracach Zespołu); wysokoplonujące linie pszenżyta ozimego – **temat badawczy nr 2**

Metody badawcze:

- badanie odporności genotypów pszenżyta wykonano metodą inokulacji poprzez oprysk (typ 1 i typ 2 odporności) w warunkach polowych w dwóch lokalizacjach oraz metodą inokulacji punktowej (typ 2 odporności – rozprzestrzenianie się patogenu wzdłuż osadki kłosowej) **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 nowo zaprojektowanych na jego podstawie starterów- **temat badawczy nr 2;**
- analiza odporności typu 3 (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 4 odporności) - **temat badawczy nr 3;**
- analiza odporności na kumulację/degradację toksyn fuzaryjnych (deoksyniwalenolu, niwalenolu, zearalenonu) w ziarniakach (typ 5 odporności) przy wykorzystaniu chromatografii 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

Warunki pogodowe w 2020 roku w dwóch lokalizacjach prowadzenia doświadczenia były bardzo zróżnicowane. W lokalizacji Poznań – Cerekwica były niesprzyjające dla infekcji. W czasie inokulacji w ostatniej dekadzie maja odnotowano niskie temperatury w nocy (min 6,8° C, maks 12,7°C). Podobnie w pierwszej dekadzie czerwca (min 8,5°C, maks 22,7°C). Opady były stosunkowo niskie w drugiej dekadzie czerwca (8,6 mm), co nie sprzyjało rozwojowi fuzariozy. W dwóch pierwszych dekadach czerwca opady wynosiły 27,8 mm i były znacznie niższe niż w

Radzikowie.

W lokalizacji Radzików warunki były bardziej sprzyjające. W czasie inokulacji na początku czerwca temperatury były wyższe niż w Cerekwicy. W dwóch pierwszych dekadach czerwca opady wyniosły w sumie 50 mm (w Cerekwicy 27,8 mm). W trzeciej dekadzie suma opadów była niska, jednakże występowały one z dużą częstotliwością. W lipcu natomiast opady były bardzo niskie w porównaniu z Cerekwicą.

W lokalizacji Radzików i Poznań inokulacje przeprowadzono w dniach od 3.06 do 6.06.2020 r. w zależności od kwitnienia badanych genotypów. Genotypy pszenżyta inokulowano dwukrotnie w odstępach trzydniowych. Po około dwóch tygodniach od inokulacji prowadzono oznaczanie indeksu fuzariozy. W 2020 roku w lokalizacji Radzików porażenie kłosów pszenżyta (IFK%) było zróżnicowane i średnio wynosiło 25,6% i wahało się od 12,0% do 45,3%. Natomiast w lokalizacji Poznań odnotowano niewielkie porażenie badanych genotypów pszenżyta ozimego (średnio 4,9%). Porażenie kłosów wahało się od 1,1 do 14,6%. Porażenie kłosów pszenżyta ozimego średnio dla dwóch lokalizacji wynosiło 21,3% i wahało się od 9,5% do 37,9%.

W obu lokalizacjach najbardziej porażone kłosa miały odmiany wzorcowe oraz wzorce podatne. Różnica pomiędzy genotypami odpornymi (wybranymi w latach poprzednich) a nowymi genotypami (DW) była niewielka. Może to wskazywać, że również w dziedzinie odporności pszenżyta nastąpił postęp hodowlany poprzez eliminację najbardziej podatnych genotypów.

Współczynnik korelacji dla średniego porażenia kłosów w Poznaniu i Radzikowie był niski i wynosił $r=0,332$.

Badano również w lokalizacji Cerekwica porażenie kłosów genotypów pszenżyta z genem *Fhb1* uzyskanych z University of Natural Resources and Life Sciences, Department of Agrobiotechnology, Tulln. Odnotowano u nich niski indeks fuzariozy kłosów (%IFK) od 1,6 do 2,1%.

Dodatkowo w lokalizacji Poznań-Cerekwica w warunkach polowych testowano 40 genotypów pszenżyta z introgresją chromatyny *Triticum monococcum* i substytucjami genomu D pszenicy odmiany Panda. Inokulacje prowadzono metodą oprysku z wykorzystaniem trzech izolatów *F. culmorum*, podobnie jak w testach inokulacyjnych innych genotypów pszenżyta badanych w 2020 r. Oceniając porażenie kłosa (%IFK) u tych linii stwierdzono zróżnicowanie odporności genotypów. Średnio dla wszystkich genotypów odnotowano niewielkie porażenie %IFK=5,73%. U 2 genotypów odnotowano porażenie kłosa %IFK poniżej 1. Genotypy te badano przez trzy lata i udało się wskazać genotypy wykazujące średnio we wszystkich latach badań niewielkie porażenie kłosa.

Średni poziom odporności typu 1 dla wszystkich badanych genotypów wyniósł 2,03 punkty infekcji (lpi). Dla poszczególnych grup pszenżyta było to: pszenżyto odporne 2,42 lpi, linie Tm 1,93 lpi, odmiany pszenżyta 2,65 lpi, wzorce podatne pszenżyta 3,33 lpi, wzorce odporne pszenżyta 1,60 lpi. Odporność typu 1 genotypów pszenicy była wyższa od pszenżyta i zbliżone do odporności wzorców odpornych pszenżyta. Zawierała się w granicach 1,65 lpi (wzorce odporne pszenicy) – 1,85 lpi (wzorce podatne pszenicy). Mimo zróżnicowania odporności różnice dla typu 1 nie były istotne statystycznie.

Najwyższą odporność typu 1 wykazały 4 linie z introgresją chromatyny *Triticum monococcum*, w tym 2 nie wykazały objawów infekcji w momencie oceny (7 dni po inokulacji). Odporne było również 5 wzorców odpornych pszenicy (w tym Fregata) i odmiana pszenicy twardej Ceres. Najwyższą podatność wykazało 9 genotypów pszenżyta w tym dwie linie Tm, odmian Witon i jeden wzorzec podatny pszenżyta.

Średni poziom odporności typu 2 dla wszystkich badanych genotypów wyniósł 2,08 porażonych kłosków (lpk). Dla poszczególnych grup pszenżyta było to: pszenżyto odporne 2,04 lpk, linie Tm 2,21 lpk, odmiany pszenżyta 1,75 lpk, wzorce podatne pszenżyta 3,20 lpk, wzorce odporne pszenżyta 1,10 lpk. Odporność typu 2 genotypów pszenicy była zróżnicowana. Zawierała się w granicach 1,09 lpk (wzorce odporne pszenicy) – 5,75 lpk (wzorce podatne pszenicy). Różnice pomiędzy grupami dla typu 2 były istotne statystycznie.

Najwyższą odporność typu 2 wykazało 21 wzorców odpornych pszenicy (większość z genem odporności *Fhb1*), 2 wzorce odporne pszenżyta (z genami *Fhb1* i *Qfhs.ifa-5A*), 1 linia z introgresją chromatyny *Triticum monococcum* oraz genotyp DANKO 3/17. Odporne były również 3 linie z introgresją chromatyny *Triticum monococcum*, genotypy pszenżyta DS.9, BOH 15L0012, DANKO 4/18 oraz odmiana Transfer. Średnio najwyższą odporność obu typów wykazały wzorce odporne obu zbóż. W przypadku pszenżyta było to również 7 linii z introgresją chromatyny *Triticum monococcum* oraz 2 genotypy BOH 15W0005 i MAH 35108-18.

Odporność typu 2 korelowała istotnie z IFK w warunkach polowych, zarówno w Poznaniu, Radzikowie jak i w przypadku średniego IFK. Niższe były współczynniki korelacji odporności typu 1 z IFK. Dla IFK ocenianego w Poznaniu brak było takiej korelacji. Należy dodać, że wyłącznie dla genotypów pszenżyta współczynnik dla typu 1 vs IFK \bar{r} wynosił $r = 0,352$ natomiast dla typu 2 vs IFK \bar{r} wynosił $r = 0,636$. Dla pszenicy było to odpowiednio $r = 0,276$ i $r = 0,972$). Wskazuje to na większy udział odporności typu 1 w ogólnej odporności pszenżyta na fuzariozę kłosów w porównaniu z pszenicą.

Temat badawczy nr 2

Doświadczenia infekcyjne w dodatkowych lokalizacjach oraz identyfikacja genu *Fhb1* w formach pochodzących z przekrzyżowań wstecznych.

Inokulację kłosów pszenżyta 3 szczepami *Fusarium culmorum* przeprowadzona w dodatkowych lokalizacjach (Dębina, Borowo, Małyszyn, Szelejewo). W Borowie mimo inokulacji nie wystąpiły objawy fuzariozy kłosów. W Małyszynie natomiast warunki do rozwoju fuzariozy były również niekorzystne i nie zaobserwowano zróżnicowania genotypów pszenżyta ozimego.

Indeksy fuzariozy kłosów z poszczególnych lokalizacji korelowały istotnie, z wyjątkiem korelacji IFK w Radzikowie z IFK w Dębinie i Szelejewie. Brak tej korelacji wynikał z silnego porażenia części genotypów pszenżyta w Radzikowie, które były słabo porażone w innych lokalizacjach.

Zidentyfikowano genotypy o niskiej podatności na fuzariozę kłosów, których reakcja była stabilna we wszystkich 4 lokalizacjach doświadczalnych. Były to genotypy: BOH 17W0157, MAH 34752-19/1, DS 2607/11-1, MAHD 35827-18/1, BOH 16L0413, MAH 34752-18/2, DL 848/16, DS 2786/16. Najbardziej podatny był genotyp: DC 062. Podatne były również genotypy: BOH 16L0184, DD 196/16, BOH 17W0106, DS 3291/17, DL 1141/16, DS 3290/17 i odmiana Porto.

Wykonano liczne przekrzyżowania mające na celu poszerzenie zmienności genetycznej pszenżyta ozimego. Krzyżowano dobrze plonujące odmiany/linie pszenżyta z liniami pszenżyta z genem *Fhb1* oraz uzyskano linie BC₄ i BC₅ z genami *Fhb1*, które po rozmnożeniu mogą być wykorzystane do dalszych badań. Część linii posłuży do wyprowadzenia podwojonych haploidów i uzyskania stabilnych linii pszenżyta z bardzo pożądanym genem *Fhb1* – jest to główny QTL odpowiadający za bardzo wysoką odporność na fuzariozę, który obecny jest w odmianie pszenicy Sumai 3, stanowiącej wzorzec odporności na tę chorobę.

Temat badawczy nr 3

Analiza zebranego materiału pod kątem oceny odporności na uszkodzenie ziarniaków (typ 3 odporności)

Średnie porażenie ziarniaków wyniosło w Poznaniu FDK M = 14,2 %. W Radzikowie było wyższe i wyniosło FDK M = 24,6 %.

IFK korelował istotnie z uszkodzeniem ziarniaków chociaż współczynniki były niskie dla wartości średnich. Wyższe były współczynniki korelacji w Poznaniu niż w Radzikowie. IFK% korelował również z masą 1000 ziarniaków.

W badanych genotypach pszenżyta ozimego stwierdzono redukcje parametrów struktury plonów (MZK, LZK, MTZ).

W przypadku obu mierników dotyczących uszkodzenia ziarna uzyskanego z kłosów inokulowanych szczepami *Fusarium culmorum* w dwóch lokalizacjach: masy (FDK M) i liczby (FDK L), genotypy wybrane z DW 19/20 wykazały wyższą odporność od genotypów wybranych w latach poprzednich. Podobne wyniki uzyskano dla porażenia kłosów (IFK%). Może to wskazywać, że w pracach związanych z odpornością pszenżyta na fuzariozę nastąpił postęp hodowlany poprzez eliminację najbardziej podatnych genotypów.

Temat badawczy nr 4

Analiza zawartości toksyn fuzaryjnych w ziarnie, kumulacja/degradacja toksyn (typ 5 odporności)

Zawartość ergosterolu w ziarnie z doświadczeń w Poznaniu i Radzikowie była zbliżona i wynosiła odpowiednio 18,3 mg/kg i 18,2 mg/kg. W próbach z grup 'odporne' i 'DW' (genotypy z DW 19/20) zawartość ERG była zbliżona, odpowiednio 19,1 mg/kg i 13,4 mg/kg. Zawartość ta było niższa niż w odmianach wzorcowych (22,5 mg/kg) i podatnych formach (33,2 mg/kg).

Zawartość zearalenonu w ziarnie z doświadczeń w Poznaniu i Radzikowie była zbliżona i wynosiła odpowiednio 468 µg/kg i 378 µg/kg. Średnio zawartość ZEN wynosiła 423 µg/kg.

W próbach z ziarna genotypów z grup 'odporne' i 'DW' (genotypy z DW 19/20) zawartość ZEN była zróżnicowana, odpowiednio 523 µg/kg i 210 µg/kg. Zawartość ZEN w nowych genotypach wybranych na podstawie odporności kłosa i ziarniaków była istotnie niższa niż w genotypach 'odpornych' wybranych w poprzednich latach.

Zawartość DON w ziarnie z Radzikowa była wyższa niż z Poznania i wynosiła odpowiednio 9,209 mg/kg i 5,163 mg/kg. W przypadku NIV jego zawartość była wyższa w próbach ziarna z Poznania (8,904 mg/kg) niż z Radzikowa (1,934 mg/kg). Sumaryczne zawartości trichotecenów B (DON+NV) były zbliżone w obu lokalizacjach i wynosiły 14,067 mg/kg w Poznaniu i 11,152 mg/kg w Radzikowie.

Średnio zawartość trichotecenów B wyniosła 12,609 mg/kg. Najmniej TCT B stwierdzono w ziarnie genotypów BOH 16L0413, MAH_33097-1, DS 2786/16, MAH_35108-19/1 i DS.9. Najwięcej toksyn TCT B było w ziarnie genotypów: DANKO 4/18, DANKO 2/17, DANKO 22/17; wzorców podatnych MAH 34068-5, MAH 33116-7/1 i odmiany Porto.

W próbach z ziarna genotypów z grup 'odporne' i 'DW' (genotypy wybrane z DW 2019/2020) zawartość trichotecenów B była zbliżona i wynosiła odpowiednio 12,406 µg/kg i 9,116 mg/kg. Brak było istotnej różnicy pomiędzy średnimi zawartościami TCT B. Zakres zmienność był wyższy dla 'odpornych' i wynosił 5,070 – 29,111 mg/kg (4,791 – 13,308 mg/kg dla 'DW'). Wynikało to z wysokiej zawartości TCT B w ziarnie 4 genotypów: DANKO 1/17, DANKO 4/18, DANKO 2/17, DANKO 22/17.

Indeks fuzariozy kłosów oraz wartości FDK korelowały istotnie z zawartościami ERG i mykotoksyn. Dla IFK najwyższy był współczynnik korelacji z zawartością TCT B, natomiast dla FDK z zawartością ERG, DON i ZEN. Najwyższą wartość miał współczynnik korelacji średniego FDK z liczbą ze średnią zawartością ERG. Zawartość ERG w ziarnie korelowała istotnie z zawartościami mykotoksyn.

Podsumowanie

Analiza wieloczynnikowa (analiza składowych głównych PCA) pozwoliła na zidentyfikowanie genotypów łączących odporności różnych typów. Były to DS. 9, MAH 33097-1, MAH 34359-1 z grupy 'odpornych' oraz BOH 16L0413, MAH 34752-18/2, MAHD 35827-18/1, DS 2786/16, MAH 34752-19/1, MAH_35108-19/1, DL 848/16 wybrane z Doświadczenia Wstępnego 2019/2020 ('DW').

