

SPRAWOZDANIE Z REALIZACJI ZADANIA nr 14: **Badanie typów odporności na fuzariozę kłosów u pszenżyta ozimego za pomocą markerów fenotypowych i metabolicznych, 2017r.**

Halina Wiśniewska, Tomasz Góral, Piotr Ochodzki, Maciej Majka, Jolanta Belter, Dorota Walentyn-Góral oraz 6 pracowników pomocniczych

WPROWADZENIE

Fuzarioza kłosów jest chorobą zbóż powodowaną przez grzyby patogeniczne z rodzaju *Fusarium*, która może prowadzić do obniżenia plonu ziarna jak również jakości ziarna poprzez skażenie ziarna mikotoksynami takimi jak deoksyniwalenol, niwalenol, zearalenon, które są związkami niezwykle stabilnymi, nie ulegają metabolizowaniu i są szkodliwe dla człowieka i zwierząt. Czynnikiem sprzyjającym rozwojowi fuzariozy są wysoka wilgotność powietrza, wiatr i opady deszczu.

Patogeneza fuzariozy kłosów jest złożona i wyróżnia się kilka typów odporności: typ I - na infekcję pierwotną, typ II - na rozprzestrzenianie się patogena wzdłuż osadki kłosowej, typ III - odporność na uszkodzenie ziarniaków, typ IV - tolerancja, czyli odporność na obniżkę plonu, typ V - odporność na kumulację i degradację toksyn fuzaryjnych w ziarniakach. Odporność na fuzariozę kłosa ma charakter złożony i jest cechą wielogenową. Kilka lub kilkanaście QTLs zapewnia roślinom zadawalającą odporność polową. Każdy z genów determinuje stosunkowo mały tzw. efekt ilościowy, a efekty poszczególnych genów sumują się. W związku z tym ekspresja cech warunkowana takimi genami podlega dużemu wpływowi środowiska. 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. Ponadto, dobrze scharakteryzowany jest inny QTL - *Fhb2*, znajdujący się na krótkim ramieniu chromosomu 6B. Ma on jednak znacznie mniejszy wpływ na całkowitą odporność na fuzariozę kłosa.

Liczne nowe odmiany pszenżyta okazują się podatne na fuzariozę kłosów na poziomie zbliżonym do pszenicy. Pojawiają się doniesienia, że w ziarnie pszenżyta akumulowana może być ilość mikotoksyn zbliżona lub nawet wyższa od tej notowanej u pszenicy, pomimo mniejszego nasilenia objawów fuzariozy na kłosach i ziarniakach. Przyczyną podatności części puli genetycznej pszenżyta (głównie jarego) może być to, że formy pierwotne zostały uzyskane z krzyżowań żyta z pszenicą twardą wykazującą bardzo dużą podatność na fuzariozę kłosów. Ponadto pszenżyto, jako forma sztuczna, zagrożone jest zawężeniem bazy genetycznej odmian, jeżeli nie prowadzi się krzyżowań z gatunkami macierzystymi. Może to prowadzić do spadku odporności tego gatunku na patogeny, w tym *Fusarium* spp. Podejmowane są próby poszerzenia zmienności pszenżyta przez wprowadzanie genów z gatunków oddalonych.

Najbardziej skutecznym sposobem redukcji strat powodowanych przez fuzariozę kłosów zbóż może być uprawa odmian odpornych. Odmiany takie, o stabilnej odporności, charakteryzują się brakiem lub bardzo niską akumulacją DON-u w ziarnie.

MATERIAŁ BADAWCZY, CEL I METODYKA BADAŃ

Materiał badawczy: 171 genotypów pszenżyta ozimego i 3 formy wzorcowe (Trefl, Fredro i Meloman)

Tematy badawcze:

1. Testy inokulacyjne *in vivo* w IHAR Radzików i IGR Poznań z genotypami pszenżyta ozimego (wybrane o podwyższonej odporności z badań 2014-16 oraz wytworzone w latach 2014-2016 w wyniku różnorodnych krzyżowań).
2. Doświadczenia infekcyjne w dodatkowych lokalizacjach i kolejne krzyżowania pszenżyta ze stwierdzonymi źródłami odporności zarówno pszenżyta jak i pszenicy celem piramidyzacji genów odporności.

3. Analiza zebranego materiału pod kątem fenotypowej oceny odporności na uszkodzenie ziarniaków (typ III)
4. Analiza zawartości toksyn fuzaryjnych w ziarnie, kumulacja/degradacja toksyn (typ V odporności)

Cel badań:

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 analiza molekularna mieszańców BC₁ uzyskanych z krzyżowania w 2016 mieszańców F₁ pszenżyta z formami pszenicy posiadającymi gen odporności na *Fusarium* (*Fhb1*) uzyskanymi w 2016 roku.
3. Ocena odporności na uszkodzenie ziarna oraz tolerancji genotypów pszenżyta celem wyboru form odpornych.
4. Określenie u pszenżyta ozimego odporności typu V - kumulacja/degradacja toksyn.

Metodyka badań:

- Odporność na fuzariozę kłosów testowano metodą inokulacji punktowej w warunkach szklarniowych (typ II odporności). Metoda ta pozwala na oszacowanie odporności typu II i pozwala na precyzyjne śledzenie rozprzestrzeniania się patogena w kłosie i przez oprysk w warunkach polowych w IHAR PIB Radzików oraz w IGR PAN w Poznaniu (typ I i II odporności).
- Do produkcji inokulum zastosowano 3 izolaty *Fusarium culmorum* wytwarzające deoksyniwalenol, niwalenol oraz zearalenon. Zawiesiny ze wszystkich izolatów mieszano i ustalano stężenie zarodników na około 100 000 (IGR Poznań) lub 500 000 (IHAR Radzików) zarodników/ml (zar./ml) w równych proporcjach. Inokulacja była prowadzona w czasie kwitnienia genotypów. Po inokulacji rośliny w lokalizacji Cerekwica były zamgławiane, natomiast w Radzikowie inokulacje prowadzone były w godzinach wieczornych.
- Nasilenie fuzariozy kłosów określano 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) według wzoru:

$$\text{IFK (\%)} = \frac{(\% \text{ porażenia kłosa} \times \% \text{ kłosów porażonych na poletku})}{100\%}$$
- Proporcję ziarniaków uszkodzonych przez *Fusarium* (typ odporności III) określano wizualnie poprzez podział próby na ziarniaki zdrowe (HLK - ang. *healthy looking kernels*) i ziarniaki z objawami porażenia przez *Fusarium* (FDK - ang. *Fusarium damaged kernels*). Określano również redukcję komponentów plonu ziarna w odniesieniu do prób kontrolnych (masę ziarna z kłosa, liczbę ziarniaków w kłosie, masę tysiąca ziarniaków).
- W badaniach dotyczących identyfikacji genu *Fhb1* wykorzystano marker *UMN10*.
- W badaniach cytogenetycznych wykorzystano metodę GISH.
- 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).
- Zawartość ergosterolu określona była metodą wysokosprawnej chromatografii cieczowej. Zawartość trichotecenów z grupy B (deoksyniwalenol, niwalenol) analizowano techniką chromatografii gazowej. Zawartość zearalenonu (ZEA) oznaczana była za pomocą ilościowego testu immunoenzymatycznego (ELISA) AgraQuant® ZON 40/1000 (LOD 10 ppb).

Temat badawczy nr 1: Testy inokulacyjne *in vivo* w IHAR Radzików i IGR Poznań z genotypami pszenżyta ozimego (wybrane o podwyższonej odporności z badań 2014-16 oraz wytworzone w latach 2014 2016 w wyniku różnorodnych krzyżowań)

1a. Badanie odporności na fuzariozę kłosów typu I i II genotypów pszenżyta ozimego

Do badań odporności typu I+II wykorzystano: **45** nowo uzyskanych genotypów pszenżyta ozimego o zróżnicowanym podłożu genetycznym, **66** genotypów o stwierdzonej podwyższonej odporności w poprzednich latach realizacji projektu oraz **3** odmiany wzorcowe (Kasyno, Meloman, Fredro) oraz **40** genotypów pszenżyta z introgresją chromatyny *Triticum monococcum* i substytucjami genomu D pszenicy odm. Panda. Wyżej wymienione genotypy testowano metodą inokulacji (oprysk) w warunkach polowych w dwóch lokalizacjach w IHAR Radzików oraz w IGR PAN w Poznaniu.

Przeprowadzono również inokulację punktową dla **20** genotypów pszenżyta z introgresją chromatyny *Aegilops* ssp. uzyskanych w IGR PAN w Poznaniu, która pozwoliła na określenie odporności genotypów na rozprzestrzenienia się patogena wzdłuż osadki kłosowej (typ II odporności). Doświadczenie zostało wykonane w IGR PAN w Poznaniu.

W celu określenia odporności typu I kłosa pszenżyta opryskiwano zawiesiną zarodników *Fusarium*. Metoda ta pozwala na określenie odporności na infekcję pierwotną przez dostarczenie inokulum do wszystkich kwiatków w kłosie i następnie ocenę liczby kwiatków (kłosków), w których zaszła infekcja. Po 7-10 dniach od inokulacji oceniano liczbę punktów infekcji.

Wyniki tematu nr 1

1a. Badanie odporności na fuzariozę kłosów typu I i II dla 114 genotypów pszenżyta ozimego

➤ **Badanie odporności w warunkach polowych nowo uzyskanych (45) genotypów pszenżyta ozimego**

W lokalizacji Poznań -Cerekwica porażenie kłosów pszenżyta (IFK%*C*) było zróżnicowane i średnio dla genotypów inokulowanych w Cerekwicy wynosiło 17,9% i wahało się od 10,5 do 30,0%. W Radzikowie natomiast średnie porażenie było niższe i wynosiło 16,9% i wahało się od 6,0 do 32%. Biorąc pod uwagę dwie lokalizacje prowadzenia doświadczenia inokulacyjnego stwierdzono, że porażenie kłosów kształtowało się średnio dla dwóch lokalizacji od 9,0 % do 30,0%. Biorąc pod uwagę średnie porażenie z dwóch lokalizacji najniższe porażenie kłosa IFK 9,0% odnotowano u genotypu MAH 34580-1. Niskie porażenie do 12,0% obserwowano również u 5 genotypów (MAH 35081-1, BOH 2027-1, BOH 18-23-2, MAHD 35262-1 i MAHD34964-2).

Największe porażenie kłosa odnotowano u genotypu MAH 34823-2 (21,7%) oraz genotypu Danko 8 (22,1%), który w obu lokalizacjach wykazywał duże porażenie.

Warunki pogodowe w obu lokalizacjach różniły się, szczególnie pod względem opadów po inokulacji. Wysoka suma opadów w Radzikowie w czerwcu wynikała jednakże z bardzo wysokiego jednorazowego opadu (73 mm) w dniu 28 czerwca, a więc około 3 tygodni po inokulacji.

Nie stwierdzono korelacji pomiędzy indeksem fuzariozy (IFK%) dla nowo uzyskanych genotypów pszenżyta. Zaobserwowano, że genotypy porażające się w niewielkim stopniu były stabilne w obu lokalizacjach. Natomiast duże wahania odporności w dwóch lokalizacjach obserwowano szczególnie u form pszenżyta ozimego z silnym porażeniem.

➤ **Badanie odporności w warunkach polowych genotypów pszenżyta ozimego o stwierdzonej podwyższonej odporności (66) w poprzednich latach realizacji projektu**

W 2017 roku wysiano również **66** genotypów o stwierdzonej podwyższonej odporności w poprzednich latach realizacji projektu. Przeprowadzono podobne inokulacje w Poznaniu i Radzikowie. Średnie porażenie z dwóch lokalizacji wynosiło od 8,0 do 25%. Wzorce

podatności od 25,0 do 37,4%. Niskie porażenie do 10% odnotowano u 8 genotypów (MAH 33544-3, DS.9, MAH 33544-4, Danko 21 (2015), MAH 33881-1/3, DL 593/07, Danko 22 i BOHD 1025-2). Genotyp DS.9 również w tym roku wykazywał niewielkie porażenie.

➤ **Badanie odporności w warunkach polowych genotypów pszenżyta z introgresją chromatyny *Triticum monococcum* i substytucjami genomu D pszenicy odmiany Panda (40)**

W lokalizacji Poznań-Cerekwica w warunkach polowych testowano również 40 genotypów pszenżyta z introgresją chromatyny *Triticum monococcum* i substytucjami genomu D pszenicy odmiany Panda.

Średnie porażenie kłosów badanych linii wynosiło IFK=9,9 % i kształtowało się w zakresie od 4,5 do 18,0%. Niewielkie porażenie do 5% odnotowano u 4 genotypów (49BW, 52BW, 18BW i 21BW). Natomiast najwyższe porażenie 18,0% odnotowano u genotypu 4BW.

1b. Badanie odporności typu I (odporność na infekcję) i II (odporność na rozprzestrzenianie się *Fusarium* w kłosie)

➤ **Badanie typu II odporności (na rozprzestrzenianie się patogena wzdłuż osadki kłosowej) w liniach pszenżyta ozimego z introgresją chromatyny *Aegilops***

Przeprowadzono badania w szklarni IGR PAN Poznań na 20 liniach podwojonych haploidów (DH) pszenżyta z introgresją chromatyny *Aegilops* oraz 3 odmian pszenżyta ozimego.

- BC₁F₄ Sekundo × (*Ae. kotschyi* × *S. cereale*) (1) (42 chromosomy pszenżyta oraz 2 chromosomy 2S *Aegilops kotschyi*)
- F₃ Moreno × (*Ae. ovata* × *S. cereale*) (19) (40 chromosomy pszenżyta oraz 2 chromosomy 4M (*Aegilops ovata*))

Doświadczenie przeprowadzono w warunkach szklarniowych, z użyciem *F. culmorum* KF 846. Zastosowano inokulację punktową kłosów dla 10 roślin DH z każdej linii. Stężenie zarodników 50 000 zar./ml. Ocenę rozprzestrzeniania się patogena wzdłuż osadki kłosowej (Typ II odporności) przeprowadzono po 10 i 21 dniach od inokulacji. Liczono porażone kłoski (LPK). Linie DH wykazywały zróżnicowany typ II odporności na rozprzestrzenianie się patogena wzdłuż osadki kłosowej. Średnia liczba porażonych kłosków (LPK) linii pszenżyta z introgresją chromatyny *Aegilops* po 10 dniach wynosiła 1,55 i wahała się w badanych liniach (od 1,00 do 2,00). Natomiast po 21 dniach 1,85 (od 1,00 do 2,65).

U czterech linii DH - DH 378, DH 359, DH 361 oraz DH 358 porażenie było niewielkie od 1,00 do 1,10 LPK. Największe porażenie odnotowano u linii DH 379, odpowiednio po 10 dniach 2,00 LPK oraz 2,65 LPK po 21 dniach.

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

Do badań odporności typu I i II na fuzariozę kłosów wykorzystano 66 genotypów pszenżyta ozimego o stwierdzonej podwyższonej odporności w poprzednich latach realizacji projektu oraz 40 genotypów pszenżyta ozimego z introgresją chromatyny *Triticum monococcum* i substytucjami genomu D pszenicy. Badania prowadzone były w warunkach częściowo kontrolowanych w Radzikowie w 2 tunelach foliowych z instalacją zraszającą (2 doświadczenia). Zastosowana została metoda inokulacji punktowej kłosów. Kłosy inokulowano w fazie pełni kwitnienia poprzez umieszczanie kropli (ok. 50 µl) zawiesiny zarodników dwóch izolatów *Fusarium culmorum* wynosiło 50 x 10⁵ zar./ml. Każdym izolatem inokulowano 5 kłosów danego genotypu. Po inokulacji w tunelu utrzymywana była wysoka wilgotność powietrza stymulująca rozwój choroby. Nasilenie fuzariozy kłosów oceniano po 21 dniach od inokulacji poprzez określanie liczby kłosków z objawami choroby.

W celu określenia odporności typu I kłosa pszenżyta opryskiwano zawiesiną zarodników *Fusarium*. Po 7-10 dniach od inokulacji oceniano liczbę punktów infekcji (LPI). Odporność Typu I i Typu II istotnie korelowała ze średnim indeksem fuzariozy kłosów w dwóch lokalizacjach (IFK).

W Radzikowie przeprowadzono również badanie odporności typu I i II dla 40 genotypów pszenżyta ozimego z introgresją chromatyny *Triticum monococcum* i substytucjami genomu D pszenicy. Badania prowadzone były w warunkach częściowo kontrolowanych w 2 tunelach foliowych z instalacją zraszającą (2 doświadczenia). Typ I odporności istotnie korelował z IFK oraz typy odporności I i II istotnie korelowały ze średnią odporności Typu I i Typu II.

Temat badawczy 2: Doświadczenia infekcyjne w dodatkowych lokalizacjach. Kolejne krzyżowania pszenżyta z stwierdzonymi źródłami odporności zarówno pszenżyta jak i pszenicy celem piramidyzacji genów odporności

W ramach usługi badawczej prowadzone były **doświadczenia infekcyjne** w 4 punktach doświadczalnych (Borowo, Dębina, Małyszyn, Szelejewo). Odporność na fuzariozę kłosów 49 genotypów pszenżyta ozimego testowana była w warunkach polowych z użyciem tych samych izolatów *F. culmorum*, co w lokalizacji IGR PAN w Poznaniu i IHAR PIB w Radzikowie. Dodatkowo prowadzono **obserwację naturalnego** występowania fuzariozy kłosów na tych samych 49 obiektach na poletkach bez inokulacji (kontrolnych).

W uzyskanych w 2016r. w ramach tego projektu formach BC₁, pochodzących z przekrzyżowań wstecznych [(pszenżyto x formy pszenicy z genem *Fhb1*) x pszenżyto] prowadzono identyfikację molekularną markera *UMN 10* dla genu warunkującego podwyższoną odporność na fuzariozę kłosów. Uzyskane rośliny pokolenia wstecznego BC₁ zostały poddane kolejnym przekrzyżowaniom wstecznym z pszenżytem i wolnemu zapyleńiu.

WYNIKI dla tematu 2

a) Doświadczenie infekcyjne w dodatkowych lokalizacjach

Porażenie kłosów (IFK%) po inokulacji pszenżyta 3 szczepami *F. culmorum* przeprowadzone w dodatkowych lokalizacjach wykazało duże zróżnicowanie. Najmniejsze średnie porażenie odnotowano w Szelejewie IFK=8,2%. Niskie porażenie obserwowano także w Strzelcach – IFK=12,9%. W pozostałych trzech lokalizacjach porażenie było wyższe i wynosiło od 19,2 do 34,4%. Porażenie kłosów w lokalizacji Poznań korelowało z porażeniem kłosa w Dębiniu ($r=0,496$), Strzelcach ($r=0,450$) i Małyszynie ($r=0,370$).

b) Porażenie genotypów pszenżyta w naturalnej infekcji w dodatkowych lokalizacjach

W 4 badanych lokalizacjach (Strzelce, Szelejewo, Małyszyn, Dębina) obserwowano niewielkie porażenie kłosów pszenżyta w naturalnej infekcji, średnio od 7,2 -średnia w Małyszynie i 8,1 w Strzelcach. W lokalizacji Szelejewo naturalne porażenie kłosów było niewielkie i nie różnicowało genotypów, a w Dębiniu bardzo wcześnie wystąpiło wyleganie pszenżyta, co uniemożliwiło obserwację naturalnej infekcji przez *Fusarium* jak również innych patogenów pszenżyta.

c) Identyfikacja molekularna markera *UMN10* dla genu warunkującego podwyższoną odporność na fuzariozę kłosów w uzyskanach roślinach pokolenia wstecznego BC₁ przeznaczonych do krzyżowań wstecznych i wolnego zapyleńia

W 320 mieszańcach BC₁ (8 kombinacjach krzyżówkowych) pokolenia wstecznego BC₁ przeznaczonych do krzyżowań wstecznych (po 20 roślin każdej kombinacji, razem 160) i do

wolnego zapylenia (po roślin 20 każdej kombinacji, razem 160, przeprowadzono identyfikację molekularną markera *UMN10* dla genu *Fhb1* (pochodzącego z odmiany Sumai3). Uzyskano w sumie 74 rośliny z genem *Fhb1*. Rośliny te wysadzono do doniczek i poddano jaryzacji i będą przedmiotem dalszych badań i przekrzyżowań wstecznych.

d) kolejne przekrzyżowania wsteczne w celu uzyskania pokolenia BC₂

W roku 2017 wykonano kolejne krzyżowania wsteczne z formami pszenżyta (Twingo i MAH 7314) będącymi komponentami matecznymi badanych mieszańców, uwzględniając tylko te rośliny, u których zidentyfikowano molekularnie marker *UMN10* dla genu warunkującego podwyższoną odporność na fuzariozę kłosów. Uzyskano 24 rośliny z genem *Fhb1*.

e) Analizy cytogenetyczne roślin pokolenia BC₁ przeznaczonych do krzyżowań wstecznych i wolnego zapylenia

Analizom cytogenetycznym poddano 160 roślin mieszańcowych pokolenia BC₁ pochodzących z 8 kombinacji krzyżówkowych pszenżyto × pszenica z genem *Fhb1*. Genomowa hybrydyzacja *in situ* (GISH) została użyta, celem potwierdzenia mieszańcowego charakteru roślin pokolenia F₁, tj. identyfikacji genomów pszenicy (AABBDD) oraz pszenżyta (AABBRR).

Badane rośliny charakteryzowały się zróżnicowaną liczbą chromosomów w przedziale od 38 do 47. Średnio rośliny mieszańcowe posiadały ok. 45 chromosomów. W wyniku krzyżowań wstecznych roślin pokolenia F₁, (których kariotyp składał się z 14 chromosomów genomu A, 14 chromosomów genomu B oraz 7 chromosomów genomu R i 7 chromosomów genomu D, poprzez zapylenie pyłkiem pszenżyta, nastąpiła eliminacja chromosomów genomu D, pochodzących z pszenicy. Specyficzne wzory sygnałów sekwencji powtarzalnych pozwoliły na identyfikację poszczególnych chromosomów. Zakres chromosomów genomu D pszenicy wynosił od 0 do 5 chromosomów, wskazując na różne tempo eliminacji tychże chromosomów. Najczęściej obserwowanym chromosomem był 7D (0,85) a najrzadziej 2D (0,09). Chromosomy genomu D występowały w jednej kopii.

Temat badawczy 3: Analiza zebranego materiału pod kątem fenotypowej oceny odporności na uszkodzenie ziarniaków (typ III)

W czasie żniw zbierano ręcznie z polowych doświadczeń inokulacyjnych w Cerekwicy i Radzikowie po 20 kłosów dla każdego ze 114 genotypów z 3 poletek inokulowanych i z poletka kontrolnego. Kłosa młócono ręcznie lub laboratoryjną młocarnią o słabym nawiewie dla zapobiegania utracie lekkich porażonych ziarniaków. Proporcję ziarniaków uszkodzonych przez *Fusarium* (typ odporności III), określano wizualnie poprzez podział próby ziarniaków na ziarniaki zdrowe i ziarniaki z objawami porażenia przez *Fusarium*. Określono redukcję komponentów plonu ziarna w odniesieniu do prób kontrolnych (typ odporności IV). Oznaczono następujące komponenty: masa ziarna z kłosa, liczba ziarniaków w kłosie, masa tysiąca ziarniaków.

Wyniki dla tematu nr 3

Określenie odporności typu III (odporność na zasiedlanie ziarniaków przez Fusarium)

Typ III odporności związany z porażeniem ziarniaków - procent ziarniaków z wyraźnymi objawami fuzariozy (%FDK m =z masy) oraz (%FDK l =z liczby) w 2017 roku badany był w 75 genotypach pszenżyta ozimego o zróżnicowanym podłożu genetycznym, pochodzących z różnych kombinacji krzyżowań odmian i genotypów o poznanej podwyższonej odporności oraz trzech form kontrolnych (Kasyno, Meloman, Fredro).

Procent ziarniaków w wyraźnymi objawami fuzariozy (%FDK m) wahał się od 13,7 do 53,6%, średnio 33,3%, a liczba porażonego ziarna (FDK L) wahała się od 16,2 do 55,6%, średnio 36,6%. Najniższą masę porażonego ziarna (FDK m) odnotowano u genotypu MAH 33544, a liczbę porażonego ziarna (FDK L) u genotypu BOHD 1025-2. Genotyp ten wykazywał

niskie porażenie ziarna również w roku ubiegłym. Genotyp DS.9 wykazywał również niską masę i liczbę porażonego ziarna oraz niski stopień porażenia kłosów (IFK 5,7%) w 2017 roku jak i w poprzednich latach badań.

Najwyższą masę i liczbę porażonego ziarna stwierdzono u genotypu DANKO17 (2014), (FDK m = 53,6%, FDK L = 55,6), mimo że porażenie kłosów wykazywało średnio w dwóch lokalizacjach jedynie 13,3% .

U wszystkich genotypów badanych w testach inokulacyjnych obserwowano obniżkę parametrów struktury plonu: masy ziarna z kłosa (RMZK), liczby ziarna z kłosa (RLZK) i masy tysiąca ziarniaków (RMTZ) w porównaniu z genotypami bez inokulacji (kontrolnymi). Obniżka masy ziarna z kłosa (RMZK) wynosiła średnio 33,4% i wahała się od 11,8% u genotypu MAH 34964-2 do 53,8% u genotypu DANKO 13/16. Redukcja liczby ziarna z kłosa średnio wynosiła 24,4% i wahała się od 7,0% u MAH 34964-2 do 45,5% u genotypu DANKO 6 (2014). Spośród trzech badanych parametrów struktury plonu po inokulacji redukcja masy tysiąca ziarniaków (RMTZ) była najniższa i średnio wynosiła dla badanych genotypów 15,5%. Najniższą redukcję wszystkich badanych parametrów struktury plonu odnotowano u genotypu MAH 34964-2.

Odnotowano wysoką korelację pomiędzy masą i liczbą porażonego ziarna $r=0,988$. Indeks fuzariozy kłosów korelował istotnie z uszkodzeniem ziarniaków oraz redukcją masy ziarna z kłosa, jednakże współczynniki były niskie. Ponadto redukcja masy tysiąca ziarniaków (RMTZ) korelowała z masą (FDK m) i liczbą porażonego ziarna (FDK L).

Temat badawczy 4: Analiza w badanym materiale zawartości toksyn fuzaryjnych w ziarnie, kumulacja/degradacja toksyn (typ V odporności)

Ziarno z form o najwyższej odporności i niewielkiej obniżce parametrów plonotwórczych analizowane było pod względem zawartości toksyn fuzaryjnych – deoksyniwalenolu, niwalenolu, zearalenonu oraz ergosterolu – wskaźnika zawartości grzybni *Fusarium* w ziarnie.

Zawartość trichotecenów z grupy B w ziarnie (deoksyniwalenol [DON] i pochodna 3-acetyl deoksyniwalenol [3AcDON], niwalenol [NIV]) była analizowana przy wykorzystaniu techniki chromatografii gazowej.

Zawartość zearalenonu (ZEN) oznaczano za pomocą ilościowego testu immunoenzymatycznego (ELISA) AgraQuant® ZON 40/1000 (LOD 10 ppb) (Romer Laboratories).

Zawartość ergosterolu określono 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 został rozpuszczony w metanolu i rozdzielony 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).

Wyniki dla tematu 4

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*.

Zawartość DON wynosiła średnio 17,765 mg/kg i wahała się od 3,920 mg/kg (MAH 34964-2) do 43,808 mg/kg (MAH 33116-7/1). Niską zawartość DON, poniżej 8 mg/kg odnotowano u siedmiu genotypów: MAH 34964-2, BOH 1025-2, DANKO 21 (2015), BOH 534-4, MAH 33544-3, MAHD 35262-1, MAH 33544-4. Genotypy MAH 33544-3, MAH 33544-4, DANKO 21 (2015) i BOH 1025-2 wykazywały niski średni IFK=8-9% i niską masę i liczbę porażonego ziarna po inokulacji, odpowiednio FDK m = 22-39% i FDK L = 27-41%.

Najwięcej DON-u powyżej 27 mg/kg stwierdzono u genotypów DANKO 8/15, DANKO 6 (2014) oraz wzorców podatnych DANKO 1 2014, DANKO 17 (2014), MAH 3070-3/1, MAH 33116-7/1. Z tej grupy genotyp MAH 33070-3/1 wykazywał duże porażenie kłosów (IFK=34%), a DANKO 1 (2014) znaczną masę i liczbę porażonego ziarna (FDK_m=83,8% i FDK_L=87,7%).

Podobnie jak w roku ubiegłym dwa genotypy: BOHD 1025-2 i DS.9 wykazały niewielką ilość DON i pochodnych jak również najmniejsze porażenie kłosów i porażenie ziarna.

Średnia zawartość ZEN w 2017r. w ziarnie genotypów pszenżyta ozimego była o 50% wyższa niż w roku ubiegłym i wynosiła średnio dla wszystkich badanych genotypów 2100 mg/kg. Zawartość tej toksyny wahała się od 588 mg/kg do 6613 mg/kg (BOH 1273-1).

Najmniej ZEN stwierdzono w ziarnie genotypu DANKO 3/15 (588 mg/kg). Bardzo dużą zawartość toksyny ZEN powyżej 3500 mg/kg odnotowano jeszcze u odmiany Kasyno i wzorców podatnych MAH 33116-7/1, DANKO 1 2014, MAH 33070-3/1. Genotypy MAH 33116-7/1 i MAH 33070-3/1 wykazywały w 2017r. wysokie porażenie kłosa, odpowiednio 25,0 i 34,0%. Genotyp MAH 33070-3/1 wykazywał bardzo wysokie porażenie kłosa i ziarna również w 2016r.

Średnia zawartość NIV w 2017r. była ponad 2-krotnie wyższa niż w 2016 roku i wynosiła 10,450 mg/kg. Zawartość NIV wahała się od 2,956 mg/kg do 27,365 mg/kg. Najmniejszą ilość NIV stwierdzono u genotypu DANKO 3/15 (2,956 mg/kg). Najwyższą ilość NIV (27,365 mg/kg) odnotowano dla genotypu DANKO 17 (2014).

W próbach ziarna z Radzikowa zawartość DON była prawie 4-krotnie wyższa niż w próbach z Poznania. Natomiast zawartość NIV w próbach ziarna z Poznania była ponad 8-krotnie wyższa niż w próbach z Radzikowa.

W przypadku ZEN jego zawartość w próbach ziarna z Poznania była bardzo wysoka (do maks. 13030 mg/kg), natomiast w próbach z Radzikowa bardzo niska (do maks. 399 mg/kg).

Zawartość ergosterolu w ziarnie pszenżyta ozimego z doświadczeń w Radzikowie i Poznaniu była zbliżona i wynosiła odpowiednio 8,33 mg/kg (1,75-37,18 mg/kg) oraz 9,01 mg/kg (1,56-42,47 mg/kg). Średnio najmniej ERG stwierdzono w ziarnie genotypów DANKO 21 (2015), BOHD 1025-2, MAH 34964-2, DANKO 3/15 i MAHD 35262-1. Najwięcej ERG było w ziarnie wzorców podatnych MAH 33070-3/1, DANKO 1 2014, MAH 33116-7/1, DANKO 17 (2014).

Określono również współczynniki korelacji pomiędzy indeksami fuzariozy kłosów (IFK), uszkodzeniem ziarniaków (FDK) oraz zawartością toksyn i ergosterolu w ziarnie pszenżyta ozimego w Poznaniu i Radzikowie. Wszystkie współczynniki korelacji były istotne statystycznie. Najwyższe wartości przyjmowały współczynniki korelacji:

- IFK z zawartościami DON, sumy trichotecenów i ZEN
- masa i liczba porażonego ziarna (FDK_m P i FDK_L P) z zawartościami ERG, DON i sumy trichotecenów
- zawartość ZEN – istotnie korelowała z porażeniem kłosa (IFK) oraz masą i liczbą ziarna z objawami fuzariozy (FDK_m P i FDK_L P).
- zawartość ERG z zawartością DON, NIV i sumy trichotecenów.

PODSUMOWANIE

Badając w 2017 genotypy pszenżyta ozimego pod kątem odporności Typu I (odporność na infekcję), Typu II (odporność na rozprzestrzenienia się patogena wzdłuż osadki kłosowej), Typu III (odporność na zasiedlanie ziarniaków), Typu V (odporność na kumulacje toksyn fuzaryjnych w ziarnie) z uwzględnieniem dwóch lokalizacji Poznań–Cerekwica i Radzików oraz przeprowadzając analizę wielocechową (PCA), zidentyfikowano genotypy o najniższej zawartości toksyn fuzaryjnych (trichotecenów i zearalenonu) i ergosterolu w ziarnie w obu lokalizacjach: **MAH 34964-2, BOHD 1025-2, DANKO 21 (2015), DANKO 3/15, MAH 33544-4, DS.9, MAHD 35262-1, BOH 534-4, MAH 33544-3, LD 121/08, BOHD 898-1, BOH 1439-4**. Trzy z nich (**MAH 34964-2, MAHD 35262-1, BOH 1439-4**) należały do grupy nowych genotypów, wprowadzonych do badań w roku 2017.

