

**PROJEKT BADAWCZY MINISTERSTWA ROLNICTWA HOR hn-501-19/15,
Zadanie 88**

Efekty plejotropowe genów *Ppd-H1* i *Ppd-H2* a podatność roślin jęczmienia jarego na fuzariozę kłosów i akumulację mikotoksyn

Kierownik: Anetta Kuczyńska

Wykonawcy: Tadeusz Adamski, Maria Surma, Karolina Krystkowiak, Krzysztof Mikołajczak, Piotr Ogrodowicz, Hanna Ćwiek-Kupczyńska, Kamil Kowalik, Renata Trzeciak, Renata Holewińska, Alina Anioła

Sprawozdanie z realizacji badań w 2017 roku

Temat badawczy 1

Lokalizacja QTL-i oraz wytypowanie genów-kandydatów warunkujących odporność na FHB

Cel tematu badawczego 1

Celem tematu była identyfikacja loci dla cech ilościowych związanych z porażeniem kłosów i ziarna oraz dla zawartości mikotoksyn, a także genów-kandydatów dla zlokalizowanych QTL-i w populacji linii rekombinacyjnych (RIL) jęczmienia jarego. Wysoce zagęszczona mapa genetyczna umożliwiła znalezienie blisko sprzężonych lub wewnątrzgenowych markerów dla cech ilościowych. Pozwoliła ona również, co jest głównym celem projektu, uzyskać informacje o molekularnych podstawach zmienności obserwowanych cech, w szczególności tych, które determinują odporność jęczmienia jarego na fuzariozę kłosów w powiązaniu z efektami genów reakcji fotoperiodycznej.

Materiały i metody

Przeanalizowano rozkład obserwacji dla poszczególnych cech fenotypowych w badanej populacji RIL jęczmienia jarego osobno w serii kontrolnej i inokulowanej. Populacja RIL była obiektem badań w 2016 roku, zaś doświadczenia prowadzono na polach doświadczalnych należących do Poznańskiej Hodowli Roślin zlokalizowanych w Antoninach, Nagradowicach i Tulcach (AND_I - Antoniny, infekcja; AND_K - Antoniny, warunki kontrolne; NAD_I - Nagradowice, infekcja; NAD_K - Nagradowice, warunki kontrolne; TUL_I - Tulce, infekcja; TUL_K - Tulce, warunki kontrolne).

Mapa genetyczna uzyskana w projekcie w 2016 roku oraz dane otrzymane z fenotypowania linii populacji M_{Cam} posłużyły do identyfikacji QTL. Identyfikacja QTL wykonana została według metody opisanej przez Malosetti i zespół (2013), przy użyciu programu Genstat 16 (VSN Int. 2013). Do mapowania QTL wykorzystano linie RIL, dla których brak danych genotypowych nie przekroczył 20%. Identyfikacja loci związanych z odpornością populacji RIL jęczmienia jarego prowadzona była dla cech takich jak: wysokość rośliny (cm), długość kłosa (cm), masa ziarna z kłosa (g), liczba ziaren z kłosa, plon z poletka (g), masa tysiąca ziaren (g) oraz termin kłoszenia (liczba dni od 1 stycznia). Istotność efektów QTL wyznaczono metodą L_i i J_i (2005) na podstawie wartości statystyki $-\log_{10}(P\text{-value})$, oznaczonej symbolem LogP . Procent zmienności wyjaśnionej przez QTL obliczono jako stosunek wariancji dla efektu i wariancji w danym środowisku. Interpretacja QTL przeprowadzona została w oparciu o dostępne zasoby genomowe podobnie jak w badaniach

Cantalpiedra i in. (2015), jak również w oparciu o dostępne wyniki badań oraz dane literaturowe.

Wyniki

Liczbę QTL wyznaczoną dla poszczególnych cech zestawiono w tabeli 3, natomiast ich lokalizację na mapie genetycznej przedstawiono na rysunku 3. Łącznie dla 7 badanych cech oraz dla zawartości deoksyniwalenolu (DON) w ziarnie zidentyfikowano 29 QTL. Największą liczbę QTL zmapowano w obrębie chromosomu 3H (8), natomiast najmniejszą w chromosomie 7H (1). W chromosomie 1H nie wykryto QTL. Największą liczbę QTL zmapowano dla długości kłosa (7), a najmniejszą dla wysokości roślin (2), plonu z poletka (2) oraz koncentracji DON (1). Spośród zidentyfikowanych QTL 55% wykazało interakcję ze środowiskiem.

Zidentyfikowano dwa QTL związane z wysokością roślin w chromosomie 3H i 5H. Interakcję ze środowiskiem stwierdzono w przypadku obu QTL. QTL o najwyższej wartości LogP równej 13,47 wykazywał sprzężenie z markerem SNP SCRI_RS_150063 (3H), a zakres wyjaśnionej wariacji wynosił od 13,27% do 46,24%. Allel pochodzący z formy rodzicielskiej CamB podnosił wartość cechy we wszystkich badanych środowiskach.

Długość kłosa determinowało siedem QTL rozmieszczonych w chromosomach: 2H, 3H, 4H i 5H. Wśród nich odnotowano trzy QTL, których efekty były stabilne we wszystkich eksperymentach, przy czym większą długość kłosa warunkował allel formy rodzicielskiej Maresi dla QTL zlokalizowanych w chromosomie 2H, natomiast dla QTL zlokalizowanego w chromosomie 3H długość kłosa warunkował allel formy rodzicielskiej CamB zwiększając wartość cechy. Największą wartość LogP (10,09) stwierdzono dla QTL sprzężonego z markerem SCRI_RS_144102 (2H), w przypadku którego allel pochodzący z formy rodzicielskiej Maresi podnosił wartość cechy. QTL ten wyjaśniał 5,32-17,14% obserwowanej zmienności.

Zidentyfikowano pięć QTL związanych z masą ziarna z kłosa, zlokalizowanych w chromosomach 2H, 3H, 5H i 6H. Stabilne okazały się trzy QTL, gdzie dla dwóch QTL (w 2H i 6H) obserwowano zwiększony efekt addytywny warunkowany przez allel formy rodzicielskiej Maresi, natomiast dla jednego QTL (6H) zwiększony efekt addytywny warunkowany był przez allel formy rodzicielskiej CamB. Najwyższą wartość LogP równą 5,47 stwierdzono dla QTL w chromosomie 5H sprzężonego z markerem SNP 11_10705. Allel obniżający wartość cechy pochodził z odmiany Maresi, poza danymi z lokalizacji Nagradowice i Tulce (doświadczenia z inokulacją zarodnikami grzybów z rodzaju *Fusarium*), gdzie zwiększona wartość cechy warunkowana była allelem formy rodzicielskiej CamB. QTL ten wyjaśniał od 0,29% (NAD_I) do 8,23% (AND_K) obserwowanej zmienności masy ziarna z kłosa.

Spośród czterech QTL związanych z liczbą ziaren z kłosa wykrytych w chromosomach 2H, 3H, 5H i 6H, jeden (5H) wykazywał interakcję ze środowiskiem. Dla tego QTL stwierdzono najwyższą wartość LogP (13,92) oraz sprzężenie z markerem SNP 11_10705. QTL ten wyjaśniał 0,60-10,35% obserwowanej zmienności; allel pochodzący z odmiany CamB wpływał na zredukowanie liczby ziaren z kłosa w dwóch lokalizacjach Antoniny i Tulce. Inna sytuacja miała miejsce w doświadczeniu prowadzonym zarówno w warunkach naturalnego porażenia jak i z inokulacją w Nagradowicach, gdzie allel pochodzący z odmiany Maresi wpływał na zmniejszenie liczby ziaren w kłosie.

Zidentyfikowano dwa QTL kontrolujące plon z poletka - w chromosomach 2H i 7H. Interakcję ze środowiskiem stwierdzono w przypadku QTL w chromosomie 7H, natomiast jej brak dla QTL w chromosomie 2H. Wyższa wartość LogP, powyżej 4, charakteryzowała QTL w chromosomie 7H wykazujący sprzężenie z markerem SNP 11_10056, a zakres wyjaśnionej wariacji wynosił 0,60-16,53%. Allel zwiększający wartość cechy pochodził z odmiany CamB. W przypadku QTL w chromosomie 2H sprzężonego z markerem SNP 11_10823 procent wyjaśnionej wariacji wahał się od 5,15 do 7,23. Zwiększona wartość cechy była uzależniona od allelu formy rodzicielskiej Maresi.

Masa tysiąca ziaren determinowana była przez cztery QTL zlokalizowane w chromosomach 3H, 5H i 6H. Interakcję ze środowiskiem stwierdzono dla dwóch QTL. Spośród nich QTL w chromosomie 5H, o najwyższej wartości LogP równej 7,80, sprzężony z markerem SNP 11_10705, wyjaśniał od 1,91% do 14,25% wariacji. Allel zwiększający wartość cechy pochodził z formy rodzicielskiej Maresi.

Termin kłoszenia warunkowany był przez cztery QTL zlokalizowane w chromosomach 2H, 3H, i 5H. Interakcję ze środowiskiem wykazały trzy spośród zidentyfikowanych QTL. Najwyższą wartość LogP równą 15,26 stwierdzono dla QTL w chromosomie 3H sprzężonego z markerem SNP 12_30096. Allel determinujący opóźnione kłoszenie pochodził z odmiany Maresi, natomiast wyjaśniona wariacja wynosiła od 18,32 do 32,16%.

Wykryto jeden QTL warunkujący zawartość DON w badanym ziarnie, zlokalizowany w chromosomie 2H i wykazujący interakcję ze środowiskiem. QTL ten (LogP=3,95) związany był z markerem SNP 11_21037. Procent wyjaśnionej wariacji wynosił od 5,74 w warunkach AND_I do 9,53 w warunkach TUL_I, a wzrost wartości cechy w warunkach inokulacji determinował allel pochodzący z formy rodzicielskiej Maresi. W doświadczeniach prowadzonych w warunkach naturalnego porażenia we wszystkich trzech lokalizacjach efekty addytywne tego QTL miały wartości nieistotne

Dzięki zastosowaniu w projekcie markerów SNP z platformy Illumina iSelect 9k, udało się wyznaczyć w obrębie chromosomów kluczowe loci reakcji fotoperiodycznej jęczmienia: *Ppd-H1* i *HvFT4* w chromosomie 2H, *HvFT2* i *HvGI* w chromosomie 3H, *Vrn-H1* i *CBF4* w chromosomie 5H, *Vrn-H3* i *HvCO1* w chromosomie 7H, jak również region *sdw1/denso* w chromosomie 3H, gdzie zmapowano największą liczbę QTL dla analizowanych cech, w tym dla terminu kłoszenia. Locus ten jako silnie związany ze szlakiem giberelinowym znacząco wpływa nie tylko na wysokość rośliny, ale i inne cechy plonu oraz na reakcję fotoperiodyczną. Tym samym uzasadniony jest fakt, że QTL ten w największym stopniu wpływał na kłoszenie (największa wartość LogP) spośród wszystkich zidentyfikowanych loci dla tej cechy. Ko-segregacja licznych QTL w danym regionie chromosomu może sugerować jego plejotropowe działanie na inne cechy. Dostarczyło to informacji o molekularnych podstawach zmienności obserwowanych cech, w szczególności tych, które determinują odporność jęczmienia jarego na fuzariozę kłosów w powiązaniu z efektami genów reakcji fotoperiodycznej odpowiadając celowi projektu.

Temat badawczy 2

Ocena zróżnicowania 60 odmian jęczmienia pod względem odporności na fuzariozę kłosów z zastosowaniem inokulacji zarodnikami grzybów z rodzaju *Fusarium*

Cel tematu badawczego 2

Celem tematu była charakterystyka 60 odmian jęczmienia pod względem stopnia porażenia kłosa w wyniku inokulacji zarodnikami grzybów z rodzaju *Fusarium* oraz ocena zawartości mikotoksyn zakumulowanych w ziarnie.

Materiały i metody

Materiałem badawczym było 60 odmian jęczmienia przedstawionych w tabeli 6. Fenotypowanie odmian zostało przeprowadzone w doświadczeniu polowym w trzech powtórzeniach. Do produkcji inokulum wykorzystano izolat grzybów *Fusarium culmorum* (KF846) wytwarzający deoksynivalenol. Szczep *F. culmorum* inkubowano przez 5 tygodni w kolbach Erlenmayera o pojemności 300 ml na sterylnych ziarniakach, przy odpowiedniej wilgotności ziarna. Zastosowano 50 g ziarna, do którego dodawano 15 ml destylowanej wody i następnie autoklawowano dwukrotnie przez 30 minut w odstępach 24 h. Ziarno zostało zaszczerpione krążkami pożywki PDA przerośniętej grzybnią *F. culmorum*. Kolby wstrząsano codziennie, aby nie dopuścić do zbrylenia ziarna. Po 5–6 tygodniach na ziarniakach

powstawały liczne sporodochia wypełnione zarodnikami, które zostały wykorzystane do inokulacji badanych odmian.

Inokulację przeprowadzono w fazie kwitnienia poprzez opryskiwanie roślin zawiesiną o stężeniu zarodników *F. culmorum* 10^5 na 1 mililitr z dodatkiem preparatu powierzchniowo czynnego Tween 20 (Sigma-Aldrich). Po inokulacji, przez kolejne trzy dni, stosowano zraszanie poletek w celu utrzymania wysokiej wilgotności, sprzyjającej rozwojowi choroby. Po wystąpieniu objawów choroby przeprowadzono ocenę nasilenia fuzariozy kłosów na podstawie proporcji porażonych kłosków w kłosie oraz proporcji kłosów porażonych na poletku. Z tych wartości wyliczono indeks fuzariozy kłosów (IFK):

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

W fazie pełnej dojrzałości ziarna zebrano kłosa i po ich wymłóceniu podzielono próby ziarniaków na ziarniaki zdrowe (HLK – ang. healthy looking kernels) i ziarniaki z objawami porażenia (FDK – ang. *Fusarium* damaged kernels), a następnie określono procent uszkodzonych ziarniaków. Kontrolę stanowiło doświadczenie, w którym nie przeprowadzono sztucznej inokulacji. Opis badanych cech fenotypowych umieszczono w tabeli 7.

Oznaczenie zawartości deoksynivalenolu (DON) w ziarnie wykonano za pomocą ilościowego testu immunoenzymatycznego - RIDASCREEN® DON (R-Biopharm AG) zgodnie z instrukcją producenta.

Przed rozpoczęciem analiz sporządzono bufor do przemywań rozpuszczając dostarczoną w zestawie sól w 1 l wody destylowanej. Odczynniki przed wykonaniem analiz umieszczono w temperaturze pokojowej (20-22°C) na 3 h przed rozpoczęciem prac. Dekontaminację szkła laboratoryjnego wykonano poprzez przemywanie w 10% v/v roztworze podchlorynu sodu – przetrzymując szkło w tym roztworze przez noc (pH doprowadzone do 7,0 przy użyciu HCl).

Do odczytu gęstości optycznej próbek użyto czytnik mikroplótkowy (ChroMate Microplate Reader) firmy Awareness Technology Inc (przy długości fali 450 nm). Na podstawie krzywej standardowej obliczano właściwe stężenie badanej mikotoksyny. Do ewaluacji wyników zastosowano oprogramowanie RIDA®SOFT Win.

Uzyskane wyniki opracowano statystycznie i zwizualizowano w środowisku do obliczeń statystycznych R. Przeanalizowano rozkład obserwacji dla poszczególnych cech fenotypowych osobno w serii kontrolnej i inokulowanej.

Wyniki

Charakterystyka 60 odmian jęczmienia jarego w odniesieniu do analizowanych cech oraz stopnia porażenia w doświadczeniu kontrolnym (K) oraz w doświadczeniu z inokulacją (I) zarodnikami grzybów z rodzaju *Fusarium* została przedstawiona w tabeli 8 i 9. W warunkach kontrolnych wysokość roślin wynosiła od 86,88 cm (Gawrosz) do 61,50 cm (Promyk), długość kłosa od 8,00 cm (Ella) do 6,00 cm (Mercada), liczba ziaren z kłosa od 30,10 (DC 6145-8) do 19,40 (Marthe) oraz masa ziarna z kłosa od 1,67 g (Victoriana) do 0,98 g (Marthe i Soldo). W warunkach inokulacji zarodnikami grzybów z rodzaju *Fusarium* wysokość roślin wynosiła od 79,32 cm (Garner) do 59,17 cm (Olimpic), długość kłosa od 6,83 cm (Johan) do 4,80 cm (Mercada), liczba ziaren z kłosa od 22,86 (Gawrosz) do 15,77 (Natasia) oraz masa ziarna z kłosa od 1,10 g (Justina) do 0,69 g (Nadek). Badane odmiany charakteryzowały się podobnym terminem kłoszenia wynoszącym około 157 dni.

W warunkach kontrolnych największy procent porażonych ziaren w próbie zaobserwowano dla odmiany Soldo wynoszący 13,21%. Dla odmiany tej indeks IFK wyniósł 9,7%, zaś koncentracja DON 17,18 µg/kg. Najmniejszy procent porażonych ziaren w próbie zaobserwowano dla odmiany Gawrosz wynoszący 0,34%. W przypadku tej odmiany nie stwierdzono porażenia, natomiast zawartość DON wynosiła 19,88 µg/kg. W warunkach bez inokulacji zaobserwowano grupę odmian, dla których indeks IFK wyniósł 0, natomiast dla wszystkich tych odmian test zawartości deoksynivalenolu w badanej próbie ziarna wykazał obecność mikotoksyny: Barke - 4,30 µg/kg, Basic - 30,84 µg/kg Class - 20,00 µg/kg, DC

6145-8 - 62,44 $\mu\text{g}/\text{kg}$, Fariba - 11,69 $\mu\text{g}/\text{kg}$, Gawrosz - 19,88 $\mu\text{g}/\text{kg}$, Granal - 11,55 $\mu\text{g}/\text{kg}$, Jersey - 10,20 $\mu\text{g}/\text{kg}$, Johan - 21,87 $\mu\text{g}/\text{kg}$, Kucyk - 13,45 $\mu\text{g}/\text{kg}$, Mercada - 73,56 $\mu\text{g}/\text{kg}$, Nadek - 6,00 $\mu\text{g}/\text{kg}$, Orthegea - 10,00 $\mu\text{g}/\text{kg}$, Publikan - 48,20 $\mu\text{g}/\text{kg}$, Xanadu - 5,84 $\mu\text{g}/\text{kg}$.

W warunkach inokulacji zarodnikami grzybów z rodzaju *Fusarium* największy procent porażonych ziaren w próbie zaobserwowano dla odmiany Propino wynoszący 40,50%. Dla odmiany tej indeks IFK wyniósł 29,30%, zaś koncentracja DON wynosiła 26 992 $\mu\text{g}/\text{kg}$. Najmniejszy procent porażonych ziaren w próbie zaobserwowano dla odmiany Gawrosz wynoszący 0,44%. W przypadku tej odmiany indeks IFK wyniósł 0,5% natomiast zawartość DON wynosiła 22 630 $\mu\text{g}/\text{kg}$. Większość badanych odmian w warunkach inokulacji miała indeks IFK wynoszący ponad 10%. Największą koncentrację DON w badanej próbie ziarna zaobserwowano dla odmian Promyk (38 240 $\mu\text{g}/\text{kg}$) oraz Publikan (38 232 $\mu\text{g}/\text{kg}$), najmniejszą zawartością DON charakteryzowały się odmiany Conchita (19 238 $\mu\text{g}/\text{kg}$) oraz Tocada (12 197 $\mu\text{g}/\text{kg}$).

Interpretując wyniki uzyskane dla puli 60 odmian jęczmienia zauważono, że nie zawsze wzrost stopnia porażenia ziarna w kłosie skutkował zwiększoną zawartością DON w ziarnie. Ponadto zidentyfikowano odmiany, dla których nie stwierdzono porażenia kłosów na poletku, natomiast ich ziarno wykazało obecność DON. Mimo znacznych różnic w wartości IFK dla badanych odmian zawartość DON utrzymywała się w większości na zbliżonym poziomie zarówno w warunkach kontrolnych jak i w warunkach inokulacji zarodnikami grzybów w rodzaju *Fusarium*.

Rozporządzenie Komisji Europejskiej (WE) nr 1881/2006 reguluje zawartość DON w produktach spożywczych oraz paszowych, określając maksymalną dopuszczalną zawartość DON w nieprzetworzonych ziarnach na poziomie 1250 $\mu\text{g kg}^{-1}$. Wiele badań wykazało wysoką, pozytywną korelację pomiędzy nasileniem objawów chorobowych a stężeniem DON w ziarnie (Zhu i in. 1999; Buerstmayr i in. 2004), jednak zależność między zawartością DON a stopniem porażenia kłosów i ziarna nie zawsze jest istotna (Mesterhazy i in. 1999; Úsele i in. 2013).