

## **PSZENŻYTO**

Wiśniewska<sup>1\*</sup> Halina, Góral<sup>2</sup> Tomasz, Ochodzki<sup>2</sup> Piotr, Majka<sup>1</sup> Maciej., Walentyn-Góral<sup>2</sup> Dorota, Belter<sup>1</sup> Jolanta

<sup>1</sup> Instytut Genetyki Roślin, Polskiej Akademii Nauk, Poznań

<sup>2</sup> Instytut Hodowli i Aklimatyzacji Roślin, Państwowy Instytut Badawczy, Radzików

\*Halina Wiśniewska: [hwis@igr.poznan.pl](mailto: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.802.18.2018), **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: gen *Fhb1*, fuzarioza kłosów, pszenżyto, mykotoksyny

### **Wprowadzenie**

Nowe odmiany pszenżyta okazują się podatne na fuzariozę kłosów a także na kumulację toksyn fuzaryjnych. Patogeneza fuzariozy kłosów jest złożona i wyróżnia się kilka typów odporności. Poważnym problemem związanym z fuzariozą kłosów jest skażenie ziarna mykotoksynami, które są związkami stabilnymi, nie ulegają metabolizowaniu i są szkodliwe dla człowieka i zwierząt.

Głównym źródłem odporności jest *locus* cech ilościowych (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. 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 kłosów. Dodatkowo 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.

## **Cele projektu:**

1. Badanie odporności typu I i II na fuzariozę kłosów u wybranych genotypów pszenżyta 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 BC<sub>2</sub> uzyskanych w 2017 roku z krzyżowania wstecznego mieszańców BC<sub>1</sub> i BC<sub>2</sub> z formami pszenżyta . Ocena odporności na uszkodzenie ziarna (typ III odporności) oraz określenie redukcji parametrów struktury plonu w testowanych genotypach po inokulacji (typ IV odporności).
3. Analiza zawartości toksyn fuzaryjnych w ziarnie, kumulacja/degradacja toksyn (typ V odporności).

## **Materiały i metody**

### Materiał badawczy

Materiałem badawczym były genotypy pszenżyta ozimego – **temat badawczy 1, 2, 3 i 4** oraz genotypy pszenżyta z introgresją chromatyny *Triticum monococcum* i substytucjami genomu D pszenicy - **temat badawczy nr 1**.

### Metody badawcze:

Testowanie genotypów pszenżyta metodą inokulacji (oprysk) w warunkach polowych oraz metodą inokulacji punktowej w dwóch lokalizacjach w IHAR Radzików oraz w IGR PAN w Poznaniu .

Badanie typu I odporności- na infekcje pierwotną, na rozprzestrzenianie się patogenu wzdłuż osadki kłosowej (typ II odporności) – **temat badawczy nr 1**, analizowanie odporności na uszkodzenie ziarniaków przez patogen (typ III odporności) poprzez określanie wizualne proporcji ziarniaków uszkodzonych przez *Fusarium* (FDK) i ziarniaków wyglądających zdrowo (HLK).

Określanie redukcji komponentów plonu ziarna: (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 tolerancji czyli odporności na obniżkę parametrów struktury plonu (typ IV odporności).

Ziarno z form o najwyższej odporności i niewielkiej obniżce parametrów plonotwórczych analizowane było pod względem zawartości toksyn fuzaryjnych – deoksyniwalenolu, niwalenolu, zearalenonu - przy wykorzystaniu techniki chromatografii gazowej (typ V - odporność na kumulację i degradację toksyn fuzaryjnych w ziarniakach, poszukiwane markery metaboliczne) - **temat badawczy nr 4**.

Identyfikowanie molekularnie genu *Fhbl* warunkującego podwyższoną odporność na fuzariozę, w uzyskanych mieszańcach BC<sub>1</sub> i BC<sub>2</sub> - **temat badawczy 2.**

## Wyniki

### **Temat badawczy 1: Doświadczenia infekcyjne w IHAR-PIB Radzików i IGR Poznań z około 75 genotypami pszenżyta ozimego wybranymi jako formy o podwyższonej odporności w latach ubiegłych oraz z nowymi uzyskanymi na drodze krzyżowań z różnymi źródłami odporności**

Brak opadów w okresie kwitnienia pszenżyta nie sprzyjał rozwojowi fuzariozy. W lokalizacji Poznań zastosowano po inokulacji zamgławianie, stąd obserwowane porażenie było wyższe (8,7%) aniżeli w Radzikowie (2,7%). Biorąc pod uwagę dwie lokalizacje prowadzenia doświadczenia inokulacyjnego stwierdzono, że porażenie kłosów kształtowało się średnio dla dwóch lokalizacji od 2,1% do 21,1%. Najniższe porażenie kłosa IFK poniżej 3,0% odnotowano u 7 genotypów pszenżyta - DANKO 22 (2015), DANKO 6/15, DANKO 20/16, BOH 534-4, DS 1238, BOH 2271-4, MAH 34762-2. Dwa z tych genotypów (DANKO 20/16, MAH 34762-2) pochodziły z Doświadczenia Wstępnego z roku 2017, czyli były to obiekty z aktualnie prowadzonych programów hodowlanych. Średnie IFK badanych linii pszenżyta z introgresją chromatyny *T. monococum* i substytucjami genomu D pszenicy wynosiło IFK= 6,8 %. Niewielkie porażenie do 4% odnotowano u 8 genotypów.

Nie stwierdzono korelacji pomiędzy indeksem fuzariozy (IFK%) dla badanych 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. Korelacja terminu kwitnienia i średniego IKF była istotna, co wskazuje, że genotypy późniejsze były słabiej porażane. Wyjątek stanowiły np. wczesne i słabo porażone: DANKO 21 (2015), DANKO 22 (2015), DANKO 6/15, DANKO 20/16, MAH 34762-2, DS. 9.

Tegoroczne warunki pogodowe nie sprzyjały rozwojowi chorób powodowanych przez grzyby patogeniczne. Było zbyt sucho w okresie kwitnienia. Zarodniki *Fusarium* do skiełkowania potrzebują kropli wody i wtedy, kiedy jest bezdeszczowo podczas kwitnienia obserwuje się małe porażenie kłosów. W lokalizacji Poznań Cerekwica zastosowano zamgławianie po inokulacji i to spowodowało, że porażenie kłosów było 3-krotnie wyższe niż w Radzikowie, gdzie niestosowane

jest zamgławianie po inokulacji, a inokulację przeprowadza się wieczorem. Jednakże nawet mimo zastosowania zamgławiania w Cerekwicy porażenie kłosów było dwukrotnie niższe niż w 2017r.

Średnia liczba punktów infekcji dla 49 badanych genotypów pszenżyta wynosiła 1,9. Zakres zmienności 1,0 -3,2. Dla pszenicy odpornej było to 1,7, zakres zmienności 1,2 -2,3. Najwyższą odporność typu I zanotowano dla genotypów DC 06080-56, BOHD 898-1, MAHD 33404-1, DC 03326/06/2, DS. 9, DANKO 17 (2014), BOHD 1025-2 i MAH 35657-2. Najniższą dla DANKO 2 (2014), BOHT 730, DANKO 12/17, MAH 33070-3/1, DANKO 20/17, DANKO 23/17, DAST 15/11 (S), DANKO 15/17, Fredro i BOH 835-4.

Średnia liczba porażonych kłosków (typ I odporności) dla 49 badanych genotypów pszenżyta wynosiła 2. Dla pszenicy odpornej było to 1,1, zakres zmienności. Najwyższą odporność typu II zanotowano dla genotypów MAH 33544-3, BOH 835-4, DANKO 2 (2014), DANKO 21 (2015), BOH 1062-2, DANKO 10 (2015). Jeżeli chodzi o średnią odporność obu typów to była ona najwyższa u genotypów MAH 33544-3, DS. 9, DC 06080-56, DL 593/07, MAH 34359-1 i BOHD 1025-2. Średnia odporność typu I i II korelowała istotnie z IFK w warunkach polowych w 2018r. uzyskanych w Poznaniu i w Radzikowie oraz ze średnim IFK.

## **Temat badawczy 2**

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

Inokulacja kłosów pszenżyta 3 szczepami *Fusarium culmorum* przeprowadzona w dodatkowych lokalizacjach (Dębina, Borowo, Małyszyn, Szelejewo) wykazała wystąpienie porażenia kłosów (IFK%) tylko w lokalizacji Dębina. W lokalizacjach Borowo, Strzelce i Małyszyn nie obserwowano fuzariozy kłosów. Spowodowane było to wystąpieniem suszy o dużym nasileniu (brak opadów, wysokie temperatury). Szczególnie dotyczy to czerwca, czyli okresu kwitnienia pszenżyta, inokulacji i rozwoju fuzariozy kłosów. Objawy fuzariozy w naturalnej infekcji obserwowano tylko w Dębinie, a średnie porażenie kłosów z lokalizacji Poznań i Radzików korelowało z porażeniem kłosa w Dębinie ( $r=0,430$ ).

Średni IFK dla nowych genotypów wynosił 7,1%, natomiast dla odpornych 5,3%. Nie brano pod uwagę odmian wzorcowych i wzorców podatnych. Średnie różniły się istotnie statystycznie.

W roku 2018 uzyskane w ramach projektu formy mieszańcowe BC<sub>1</sub> i BC<sub>2</sub> niosące gen odporności na fuzariozę kłosa *Fhb1*, zostały poddane krzyżowaniom wstecznym w celu uzyskania mieszańców pokolenia BC<sub>2</sub> i BC<sub>3</sub>. Uzyskano 11 form BC<sub>2</sub> z genem odporności *Fhb1* oraz 56 form BC<sub>3</sub>

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

Typ III odporności związany z porażeniem ziarniaków - procent ziarniaków z wyraźnymi objawami fuzariozy (%FDK m =z masy) oraz (%FDK L =z liczby) w 2018 roku badany był u 75 genotypów pszenżyta ozimego o zróżnicowanym podłożu genetycznym, pochodzących z różnych kombinacji krzyżowań odmian i genotypów o poznanej podwyższonej odporności oraz trzech form kontrolnych (Porto, Meloman, Trefl) w dwóch lokalizacjach Poznań-Cerekwica i Radzików.

Mimo braku opadów w okresie kwitnienia porażenie ziarna było zróżnicowane. Procent ziarniaków w wyraźnymi objawami fuzariozy (%FDK m) wahał się w lokalizacji Poznań od 2,99 do 25,00% , a średnio 11,39%, natomiast liczba porażonego ziarna (%FDK L) wahała się od 6,25 do 38,22%, średnio 18,55% . Dla genotypów ocenionych w Radzikowie średni procent FDK m wynosił 14,18% (1,47 -32,07%), a FDK L wynosił 14,80% (1,81 – 35,62%). Najniższą liczbę porażonego ziarna (FDK L) w dwóch lokalizacjach odnotowano u genotypu DS.9.

Współczynniki korelacji IFK z FDK m lub FDK L były niskie. IFK w Poznaniu korelował istotnie z wartościami FDK w Poznaniu i ze średnimi FDK. Podobne były zależności IFK i FDK w Radzikowie. Średnia wartość IFK korelowała z wartościami średnimi FDK m i FDK L.

Średnio najniższa redukcja MZK była obserwowana u genotypów MAH 34068-5 (S), DANKO 3/15, MAH 33115-4/1 i DANKO 2/16. Najwyższa u DANKO 17 (2014), LD 121/08 i DANKO 4 (2013). Najniższa średnia redukcja MTZ wystąpiła u genotypów BOHD 2027-1, DANKO 3/17, DS. 9, DANKO 13/17 i DANKO 28/17.

IFK korelował z uszkodzeniem ziarniaków. Uszkodzenie ziarniaków (FDK m i FDK L) korelowało z względną MTZ.

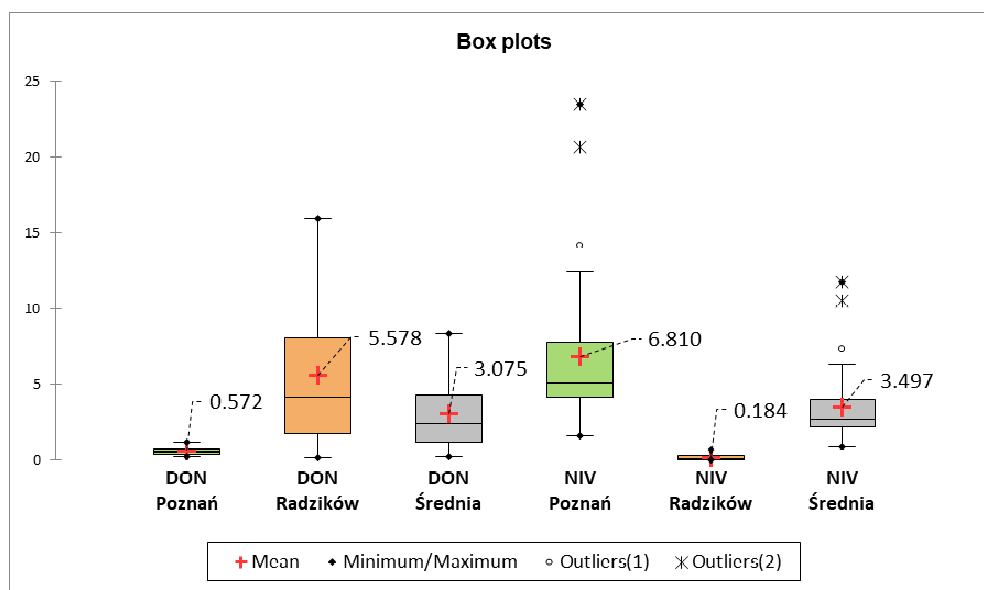
### **Temat badawczy 4:**

#### **Analiza w badanym materiale zawartości toksyn fuzaryjnych w ziarnie, kumulacja/degradacja toksyn (typ V odporności)**

Akumulację toksyn fuzaryjnych: deoksyniwalenol (DON) i pochodne acetylowe, niwalenol (NIV) oraz zearalenon (ZEN) badano w ziarnie genotypów pszenżyta ozimego po inokulacji trzema szczepami *F. culmorum*. We wszystkich próbach stwierdzono obecność DON, NIV oraz pochodnej acetylowej 3Ac-DON. Brak było pochodnej 15Ac-DON. Pochodna 3Ac-DON występowała w

ilościach śladowych, nie została więc uwzględniona w przedstawianych wynikach.

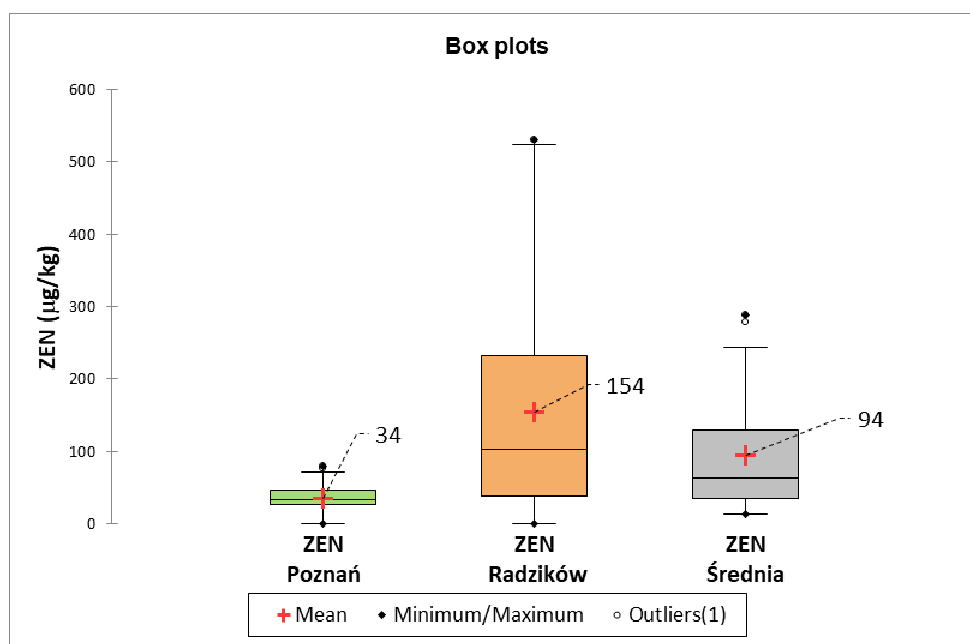
Na podstawie wykonanych analiz stwierdzono całkowicie inne proporcje zawartości DON i NIV w ziarnie w Poznaniu i w Radzikowie. W Poznaniu dominującą toksyną był NIV, którego zawartość była ponad 10-krotnie wyższa niż DON-u. W Radzikowie natomiast dominował DON, którego zawartość była około 30-krotnie wyższa niż NIV (wykres 1).



Wykres 1. Porównanie zawartości DON i NIV w próbach ziarna 39 genotypów pszenżyta pochodzących z Poznania i Radzikowa. Prostokąty pokazują pierwszy kwartyl, medianę i trzeci kwartyl. Wąsy pokazują dolny i górny limit, poza którym wartości są odstające

Najniższe zawartości DON stwierdzono u genotypów LD 121/08, MAHD 35399-1, BOH 534-4, DANKO 2/17, MAH 34359-1, BOHD 898-1 i odmiany Trefl. Natomiast najniższe zawartości NIV stwierdzono u genotypów DS. 9, BOH 537-2, DANKO 3/17, BOHD 898-1. Sumarycznie najmniej trichotecenów B było w ziarnie genotypów BOHD 898-1, DANKO 3/17, DS. 9, DC 03326/06/2, Trefl, BOHD 1025-2 i MAHD 35399-1. Najwięcej trichotecenów B było w ziarnie genotypów DANKO 22 (2015), BOH 1062-2, DANKO 6 (2014), DL 446/08, MAH 33116-7/1 (S) i DAST 15/11 (S).

Zawartość ZEN w ziarnie pszenżyta wynosiła średnio 94 µg/kg. W próbach ziarna z Radzikowa było go około 5-krotnie więcej niż w próbach ziarna z Cerekwicy (wykres 2). Najmniej ZEN było w ziarnie genotypów BOH 534-4, MAH 34359-1, BOHD 898-1, DANKO 2/17, LD 121/08, MAHD 35399-1 i DS. 9. Natomiast najwięcej w ziarnie genotypów DANKO 9 2013, DANKO 6 (2014), DS 1238, DANKO 22 (2015), DANKO 6/15, DAST 15/11 (S), Porto, MAH 33116-7/1 (S).



Wykres 2. Porównanie zawartości ZEN w próbach ziarna 39 genotypów pszenżyta pochodzących z Poznania i Radzikowa. Prostokąty pokazują pierwszy kwartył, medianę i trzeci kwartył. Wąsy pokazują dolny i górny limit, poza którym wartości są odstające

IFK korelował z zawartością NIV i sumaryczną zawartością trichotecenów B. Brak było korelacji z zawartością DON i ZEN. Poziom uszkodzenia ziarniaków korelował z zawartością wszystkich badanych mykotoksyn. Najwyższe były współczynniki dla sumy trichotecenów B.

Jeżeli chodzi o względne parametry struktury plonu to istotne ujemne współczynniki znaleziona korelacji MTZ oraz DON, ZEN i sumy trichotecenów B. Ta zależność może wynikać z faktu, że jedynie MTZ korelowała z uszkodzeniem ziarniaków (FDK).

## Podsumowanie

Analiza wieloczynnikowa pozwoliła na zidentyfikowanie genotypów łączących odporności różnych typów. Są to DS. 9, BOHD 898-1, odmiana Trefl, DANKO 2/17, DANKO 3/17, BOH 534-4, MAHD 35399-1, DL 593/07, DC 03326/06/2, LD 121/08, BOHD 1025-2, odmiana Meloman, BOH 537-2 i DANKO 22/17. Cztery z nich to nowe genotypy pochodzące w Doświadczenia Wstępnego 2017/2018 (wykres 3).

