

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

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

WPROWADZENIE

Fuzarioza kłosów jest chorobą powodowaną przez grzyby z rodzaju *Fusarium*, która może prowadzić do obniżenia plonu ziarna. Jednakże poważniejszym problemem związanym z fuzariozą kłosów jest skażenie ziarna mikotoksynami, takimi jak deoksyniwalenol (DON), niwalenol (NIV), zearalenon (ZEA). Spożywanie żywności lub paszy skażonej mikotoksynami wywołuje różne choroby u ludzi i zwierząt określane ogólnie, jako mikotoksykozy. Powyższe fakty stworzyły potrzebę kontroli i zredukowania zawartości mikotoksyn w ziarnie zbóż. 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. Uprawa takich odmian pozwoli również na ograniczenie stosowania fungicydów.

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. Brak jak dotąd wyjaśnienia tego zjawiska. 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.

MATERIAŁ BADAWCZY, CEL I METODYKA BADAŃ

Materiał badawczy: 75 genotypów pszenżyta ozimego i 3 formy wzorcowe (Tomko, Fredro i Borwo)

Cel badań:

1. Badanie odporności typu I (liczba punktów infekcji na kłosie) i II (rozprzestrzenianie się *Fusarium* w kłosie) u wybranych genotypów pszenżyta ozimego w dwóch lokalizacjach z wykorzystaniem markerów fenotypowych.
2. Założenie polowych doświadczeń infekcyjnych z wybranymi genotypami pszenżyta ozimego w dodatkowych lokalizacjach oraz piramidyzacja genów odporności poprzez krzyżowanie z formami o podwyższonej odporności (typ III odporności).
3. Ocena odporności na uszkodzenie ziarniaków (typ III odporności), elementów struktury plonu (typ V tolerancja) oraz analiza zawartości ergosterolu i toksyn fuzaryjnych w ziarnie, kumulacja/degradacja toksyn (typ IV odporności).

Metodyka badań:

Odporność na fuzariozę kłosów testowano metodą inokulacji punktowej w warunkach szklarniowych (typ II odporności) i przez oprysk w warunkach polowych w IHAR Radzików oraz w IGR PAN w Poznaniu (typ I i II).

Do produkcji inokulum zastosowano 3 izolaty *Fusarium culmorum* (KF846, ZFR112, ZFR16) 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 na początku kwitnienia genotypów. Po inokulacji rośliny w lokalizacji Cerekwica były zamgławiane, natomiast w Radzikowie inokulacje prowadzone w godzinach wieczornych.

Nasilenie fuzariozy kłosów określano na podstawie proporcji porażonych kłosek w kłosie (tylko w kłosach z objawami choroby) oraz proporcji kłosów prażonych na poletku. Z tych wartości został wyliczony indeks fuzariozy kłosów (IFK).

Proporcję ziarniaków uszkodzonych przez *Fusarium* (typ odporności III) określano wizualnie poprzez podział próby ziarniaków na ziarniaki zdrowe (HLK-healthy looking kernels) i ziarniaki z objawami porażenia przez *Fusarium* (FDK-*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).

Ziarno z form o najwyższej odporności i niewielkiej obniżce parametrów plonotwórczych analizowane było pod względem zawartości ergosterolu oraz toksyn fuzaryjnych – deoksyniwalenolu, niwalenolu, zearalenonu (typ IV 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) (Romer Laboratories).

WYNIKI

Badania obejmowały 75 genotypów pszenżyta ozimego o zróżnicowanym podłożu genetycznym i 3 odmiany wzorcowe. Porażenie kłosa w lokalizacji Poznań/Cerekwica było wysokie - średnio 20,3% IFK, natomiast w drugiej lokalizacji – Radzików średnie porażenie kłosów było niższe 12,5% IFK. Z badanych genotypów pszenżyta ozimego 4 były bardzo stabilne i wykazywały niskie porażenie kłosa w obu lokalizacjach. Zmienne warunki pogodowe oraz rdza żółta na kłosach pszenżyta wpłynęły na silną modyfikację działania genów związanych z odpornością na fuzariozę kłosów, co potwierdza konieczność prowadzenia doświadczeń inokulacyjnych w kilku lokalizacjach.

Spośród badanych genotypów najwyższą odporność typu I i II oraz „polową” stwierdzono u 6 genotypów. Była ona na poziomie odporności form odpornych pszenicy. Określono również zależność pomiędzy średnią odpornością typu II oraz średnim indeksem porażenia kłosów %IFK dla badanego pszenżyta ozimego. Współczynnik determinacji wynosił $R^2=0,256$.

Ze względu na złożoność odporności na fuzariozę kłosów oraz różne jednostki miar poszczególnych cech uzyskane wyniki poddano statystycznej analizie składowych głównych. Genotypy pszenżyta i dla porównania pszenicy zostały pogrupowane na podstawie odporności na porażenie kłosa IFK w Cerekwicy i w Radzikowie i IFK w tunelu foliowym oraz typu I i II odporności). Wyznaczono 6 genotypów o podwyższonej odporności na fuzariozę kłosów. Reakcja większości tych genotypów była na poziomie form odpornych pszenicy – Arina oraz linii 20828. Tylko u jednej linii stwierdzono odporność zbliżoną do pszenicy UNG 136.6.1.1 zawierającej gen odporności *Fhb1*.

Wykonano również polowe doświadczenia infekcyjne w 4 lokalizacjach, w których badane genotypy inokulowano tymi samymi szczepami *F. culmorum*. Zależności pomiędzy wynikami uzyskanymi w czterech lokalizacjach były bardzo niewielkie. Wynikały one z występowania w każdym z doświadczeń grupy genotypów, które były oceniane, jako silnie porażone fuzariozą kłosów. Genotypy te w innych lokalizacjach wykazywały słabe porażenie kłosa. Na takie wyniki wpływ miało miejscowe występowanie rdzy żółtej na kłosach, obejmujące różne genotypy w różnych lokalizacjach.

Badano również typ III odporności związany z porażeniem ziarniaków. Procent ziarniaków z wyraźnymi objawami fuzariozy wynosił w lokalizacji Poznań-Cerekwica średnio 26,6% a w Radzikowie 23,2 %. Genotyp DS.9 wykazywał najniższe porażenie ziarna, średnio z dwóch lokalizacji 7,4 % FDK. Pozostałe cztery genotypy wykazywały również małe porażenie ziarna w lokalizacji Poznań-Cerekwica do 15%FDK oraz w odniesieniu do średniej z dwóch lokalizacji 19,4%FDK. Liczba porażonego ziarna badanych genotypów (%FDK l) w lokalizacji Poznań-Cerekwica wynosiła średnio 40,7%FDKl.

Średnia masa ziarna z kłosa (MZK% kontroli) po inokulacji genotypów pszenżyta ozimego była niższa w porównaniu z kontrolą i wynosiła w Poznaniu średnio 65,5% i w Radzikowie

60,8% kontroli. Genotyp DS.9 mimo niewielkiego porażenia kłosa w dwóch lokalizacjach reagował znaczną obniżką plonu po inokulacji średnio 29,5% w dwóch lokalizacjach. Najniższy ubytek masy ziarna po inokulacji (MZK% kontroli) w dwóch lokalizacjach stwierdzono u genotypu DANKO 15 (83,6 % kontroli).

Badano również zawartość toksyn fuzaryjnych w ziarnie wybranych genotypów pszenżyta inokulowanych *Fusarium culmorum*. W doświadczeniu inokulacyjnym w Poznaniu średnia zawartość ZEA była bardzo wysoka i wynosiła 2272 ppb, natomiast w drugiej lokalizacji była znacznie niższa - średnia 126 ppb ZEA. Podobnie zawartość trichotecenów B była znacznie (ponad 10 krotnie) wyższa w Cerekwicy (43,440 ppm) niż w Radzikowie (3,869 ppm). U genotypu DS.9 stwierdzono najniższą zawartość ZEA i trichotecenów B. Genotyp ten wykazywał najniższe porażenie kłosa (typ II i I odporności) i redukcję masy ziarna po inokulacji (Typ V odporności). Najwyższą zawartość toksyn stwierdzono u genotypu DANKO 1. Genotyp ten wykazywał średnie porażenie kłosa, natomiast miał niską odporność typu III (uszkodzenie ziarniaków). Wysoki współczynnik korelacji obserwowano pomiędzy zawartością ZEA a stopniem porażenia ziarna w Cerekwicy $r=0,759$. Stwierdzono wysokie współczynniki korelacji uszkodzenia ziarniaków z zawartością zearalenonu ($r=0,675$) oraz trichotecenów B ($r=0,658$) dla średnich wartości z Cerekwicy i Radzikowa.

Średnia zawartość ergosterolu w ziarnie wyniosła 47,8 mg/kg. W próbach z Poznania było to 79,6 mg/kg, natomiast w próbach z Radzikowa około 5-krotnie mniej (15,9 mg/kg). Współczynnik ERG/trichoteceny B wyniósł w Poznaniu 1,8 natomiast w Radzikowie 4,1 co wskazuje, że w Poznaniu warunki były dużo bardziej sprzyjające dla tworzenia się trichotecenów – dwukrotnie większa wydajność tworzenia się toksyn przy tej samej ilości grzybni mierzonej zawartością ergosterolu. Zawartość ERG istotnie korelowała z zawartością trichotecenów ($r=0,751$) oraz ZEA ($r=0,626$) w ziarnie.

Biorąc pod uwagę wszystkie typy odporności, najwyższą odporność wykazał genotyp DS.9 oraz 5 genotypów pszenżyta. Niskie zawartości toksyn mimo silnego porażenia kłosa wykazały 4 genotypy pszenżyta. Natomiast wysokie zawartości toksyn mimo słabego porażenia kłosa wykazały 4 genotypy: DANKO 1 (S), BOH 835-4 (Tox), DANKO 13, DC 06080-56.

WNIOSKI

1. Zidentyfikowano genotypy pszenżyta wykazujące odporność na porażenie kłosów warunkach polowych (typ odporności I+II).
2. Odporności typu I i II korelowały z indeksami fuzariozy kłosów z doświadczeń polowych, jednakże wyższe były współczynniki korelacji IFK ze średnią odpornością obu typów.
3. Korelacja porażenia kłosów (IFK) ze stopniem uszkodzenia ziarniaków (FDK) oraz zawartością toksyn była niska.
4. Współczynniki korelacji FDK z zawartością toksyn (ZEA, trichoteceny B) przyjmowały wysokie wartości.
5. Zawartość toksyn fuzaryjnych w ziarnie niektórych genotypów pszenżyta była bardzo wysoka.