

**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, Halina Wiśniewska, Hanna Ćwiek-Kupczyńska, Karolina Krystkowiak, Krzysztof Mikołajczak, Piotr Ogródowicz, Renata Trzeciak, Renata Holewińska, Alina Anioła

**Sprawozdanie z realizacji badań w 2016 roku**

**Temat badawczy 1**

**Utworzenie wysoko wysyconej markerami molekularnymi mapy dla jęczmienia jarego.**

Cel tematu badawczego 1

Celem tematu była konstrukcja mapy genetycznej jęczmienia jarego dla populacji uzyskanej z odległych genetycznie form o zróżnicowanych cechach rozwojowych oraz odporności na stresy. Mapa została sporządzona na podstawie genotypowania z wykorzystaniem markerów SNP na platformie Illumina iSelect.

Materiały i metody

Mapa genetyczna dla 100 linii opracowana została na podstawie danych genotypowych uzyskanych w roku 2015. Do konstrukcji mapy posłużył program JoinMap 4.1. Zgodność segregacji markerów w stosunku 1:1 sprawdzona została testem  $\chi^2$  przy poziomie istotności  $\alpha=0,05$ . Markery odbiegające od przyjętego modelu były odrzucone w trakcie mapowania. Pozycje poszczególnych loci ustalono za pomocą komendy maksymalnego prawdopodobieństwa uzyskania sprzężeń (maximum likelihood algorithm). Do identyfikacji grup sprzężeń zastosowany został LOD (logarithm of odds) w zakresie od 6 do 9. Współczynnik częstości rekombinacji REC (ang. Recombination Frequency threshold) między parami markerów był przyjęty na poziomie  $\leq 4$ , natomiast dystans genetyczny, między markerami wyrażony w cM, był szacowany przy użyciu funkcji mapującej Kosambi (Kosambi 1944).

Wyniki

Na podstawie genotypowania populacji RIL jęczmienia jarego z wykorzystaniem platformy iSelect obejmującej 7842 markery SNP zidentyfikowano 2256 (28,77%) markery polimorficzne. Po odrzuceniu tych, które wykazywały duże zaburzenia w segregacji ostatecznie liczba zmapowanych markerów SNP wynosiła 1995. Wyznaczono siedem grup sprzężeń odpowiadających siedmiu chromosomom jęczmienia (1H – 7H). Określono porządek ułożenia loci w poszczególnych chromosomach oraz względne odległości między nimi. Zaburzenia segregacji markerów stwierdzono w obrębie wszystkich chromosomów, w największym stopniu w chromosomie 1H, zaś w najmniejszym w 4H. Poziom odchylenia markerów od przyjętego stosunku segregacji 1:1 wynosił kolejno dla chromosomów: 1H – 47,70%, 2H – 14,49%, 3H – 23,44%, 4H – 10,45%, 5H – 24,29%, 6H – 23,04% oraz 7H – 27,01%. Charakterystyka uzyskanej mapy została przedstawiona w tabeli 1. Długości map poszczególnych chromosomów wahały się w granicach 153-376 cM, przy czym dla chromosomu 5H mapa była najdłuższa, natomiast największą liczbę markerów zmapowano w obrębie chromosomu 3H. Łącznie mapa

analizowanej populacji RIL jęczmienia jarego wynosiła 1624 cM. Średnia odległość między markerami wynosiła 0,81 cM, natomiast w obrębie chromosomu 3H wynosiła ona najmniej (0,62 cM). Markery na ogół rozmieszczone były równomiernie. Największą odległość między sąsiednimi markerami (16,2 cM) stwierdzono w chromosomie 2H.

## **Temat badawczy 2**

**Określenie zmienności 200 linii RIL pod względem porażenia kłosa oraz zawartości mikotoksyn na podstawie fenotypowania w doświadczeniach polowych przeprowadzonych w trzech miejscowościach z zastosowaniem inokulacji zarodnikami grzybów z rodzaju *Fusarium*.**

### Cel tematu badawczego 2

Celem tematu była charakterystyka badanych linii RIL 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 200 linii rekombinacyjnych (RIL) jęczmienia jarego stanowiące półrodzeństwo: Lubuski × Cam/B1/CI08887//CI0576 (zwana dalej LCam) oraz Maresi × Cam/B1/CI08887//CI0576 (zwana dalej MCam). Doświadczenia prowadzono w roku 2016 na polach doświadczalnych należących do Poznańskiej Hodowli Roślin zlokalizowanych w Nagradowicach, Tulcach i Antoninach. Każda populacja wraz z formami rodzicielskimi i trzema odmianami wzorcowymi: Soldo, RGT Planet, Radek została wysiana w trzech powtórzeniach w układzie bloków losowanych. Rozłosoowanie doświadczenia wykonano w programie EKSPLAN. Do produkcji inokulum wykorzystano izolaty odpowiednich gatunków grzybów z rodzaju *Fusarium* (np. *F. culmorum* KF848, wytwarzający deoksyniwalenol). Inokulację przeprowadzono po zakwitnięciu ok. 50% kłosów na poletku metodą opryskiwania zawiesiną zarodników o stężeniu  $10^5$  na 1 mililitr z dodatkiem preparatu powierzchniowo czynnego Tween 20 (Sigma-Aldrich). Pierwszy termin inokulacji był 4 czerwca 2016 roku, a następnie oprysk powtarzano dwukrotnie w każdej z lokalizacji w odstępach trzydniowych. Celem uzyskania wysokiej wilgotności powietrza sprzyjającej infekcji kłosów stosowano zraszanie poletek przez kolejne trzy dni po każdej inokulacji.

Nasilenie fuzariozy kłosów określano na podstawie proporcji porażonych kłosków w kłosie oraz proporcji kłosów prażonych na poletku. Z tych wartości wyliczono indeks fuzariozy kłosów (IFK):

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

Proporcję ziarniaków uszkodzonych przez *Fusarium* (typ odporności III – ocena odporności na uszkodzenie ziarniaków) określano wizualnie poprzez podział próby ziarniaków na ziarniaki zdrowe (HLK – healthy looking kernels) i ziarniaki z objawami porażenia przez *Fusarium* (FDK – Fusarium damaged kernels). Ponadto w doświadczeniach polowych analizowano cechy, które przedstawiono w tabeli 2 wraz z opisem. Oznaczenie zawartości deoksyniwalenolu (DON) w ziarnie wykonano za pomocą immunoenzymatycznego testu do jego ilościowego oznaczania. Następnie materiał badawczy poddano procedurze immunoenzymatycznej wg zaleceń R-Biopharm AG i podano w jednostkach ppb (ang. parts per bilion;  $1 \times 10^{-9}$ , wartość 1  $\mu\text{g}/1 \text{ kg}$ ).

### Wyniki

#### Populacja MCam

W warunkach sztucznej inokulacji zarodnikami grzybów z rodzaju *Fusarium* obserwowano zróżnicowanie pod względem wartości średnich analizowanych cech między formami rodzicielskimi oraz w obrębie populacji (tabela 3). Odmiana Maresi

charakteryzowała się zredukowaną wysokością, dłuższym kłosem, zwiększoną liczbą jak i masą ziaren z kłosa oraz opóźnionym terminem kłoszenia w porównaniu do formy CamB. W największym stopniu formy rodzicielskie różniły się pod względem masy ziaren z kłosa (ok. 43%), a w najmniejszym pod względem terminu kłoszenia (ok. 5%).

W obrębie populacji RIL odnotowano efekty transgresji w odniesieniu do wszystkich analizowanych cech; obserwowano zarówno linie o wartościach przewyższających lepszą z form rodzicielskich jak i o wartościach mniejszych od gorszej formy rodzicielskiej. Wyjątek stanowiły masa ziarna z kłosa oraz termin kłoszenia, gdzie wartości minimalne dla populacji były równe wartościom gorszej formy rodzicielskiej.

Spośród analizowanych cech największy współczynnik zmienności (CV) stwierdzono dla masy ziarna z kłosa i liczby ziaren z kłosa, natomiast najniższy dla wysokości roślin kłoszenia (tabela 3). Kierując się nasileniem objawów fuzariozy kłosów w populacji MCam wytypowano grupy linii RIL skrajnie różniące się stopniem porażenia i dla tych grup oraz form rodzicielskich przedstawiono szczegółowe wyniki (tabela 4). Forma CamB odznaczała się 6,5 razy większym porażeniem w oparciu o indeks IFK oraz ponad dwukrotnie wyższą zawartością deoksynivalenolu w ziarnie. Spośród linii o najmniejszym indeksie IFK największy procent porażonych ziaren w kłosie (FDK) zidentyfikowano dla linii MCam17 (34,3%) a najniższy dla linii MCam59 (11,7%) – linia ta odznaczała się również najniższą zawartością DON. Z kolei w obrębie grupy linii o najwyższym indeksie IFK najmniejszy procent porażonych ziaren w kłosie stwierdzono dla linii MCam68 (82,1%), natomiast pozostałe cztery linie miały zbliżony procent ziaren FDK w kłosie tj. ok 95%. Spośród nich największą koncentrację DON obserwowano dla linii MCam70, czyli formy najpóźniej kłoszącej w obrębie tej grupy. Ponadto zaobserwowano, że grupy linii o skrajnym stopniu porażenia różniły się pod względem terminu kłoszenia (wykres 1). Linie z grupy o najmniejszym porażeniu wg indeksu IFK osiągały kłoszenie kilka dni później niż linie najbardziej porażone. Największą różnicę, tj. 10 dni, odnotowano między linią MCam88 a MCam59.

### Populacja LCam

W warunkach sztucznej inokulacji zarodnikami grzybów z rodzaju *Fusarium* odmiana Lubuski charakteryzowała się zredukowaną wysokością i opóźnionym terminem kłoszenia o ok. 7% w obu przypadkach w porównaniu do formy CamB. W obrębie populacji RIL odnotowano efekty transgresji w odniesieniu do analizowanych cech; obserwowano zarówno linie o wartościach przewyższających lepszą z form rodzicielskich jak i o wartościach mniejszych od gorszej formy rodzicielskiej (z wyjątkiem terminu kłoszenia, gdzie wartość minimalna dla populacji była nieznacznie większa od wartości gorszej formy rodzicielskiej). Zaobserwowano wyższy współczynnik zmienności (CV) dla terminu kłoszenia niż dla wysokości rośliny.

Kierując się nasileniem objawów fuzariozy kłosów w populacji LCam wytypowano grupy linii RIL skrajnie różniące się stopniem porażenia i dla tych grup oraz form rodzicielskich przedstawiono szczegółowe wyniki. Forma CamB odznaczała się ponad dwukrotnie większym porażeniem w oparciu o indeks IFK jak i zawartością miktotoksyny DON w ziarnie względem odmiany Lubuski. Dla grupy linii o najmniejszym indeksie IFK procent porażonych ziaren w kłosie (FDK) był wysoki i wahał się od 82% (LCam99) do 92% (LCam81). Największy poziom akumulacji DON odnotowano dla linii LCam21, natomiast najniższy dla LCam19. Zaobserwowano że linia ta charakteryzowała się najmniejszym terminem kłoszenia w obrębie grupy. Dla grupy linii o najwyższym indeksie IFK poziom porażonych ziaren w kłosie przekraczał 90%, a dla LCam71 i LCam77 stwierdzono całkowite porażenie ziaren w kłosie. Zawrtość DON w obrębie tej grupy była zbliżona.

Linie z grupy o najmniejszym porażeniu wg indeksu IFK osiągały kłoszenie kilka dni później niż linie najbardziej porażone – maksymalna różnica ok. 10 dni.

### **Temat badawczy 3**

#### **Określenie zmienności 200 linii RIL pod względem odporności na FHB w warunkach naturalnego porażenia.**

##### Cel tematu badawczego 3

Celem tematu była ocena badanych linii jęczmienia pod względem ich odporności na porażenie grzybami z rodzaju *Fusarium* w warunkach naturalnych.

##### Materiały i metody

Materiał badawczy oraz układ doświadczenia był tożsamy z tematem badawczym nr 2. Doświadczenie prowadzono w roku 2016 na polach doświadczalnych należących do Poznańskiej Hodowli Roślin zlokalizowanych w Nagradowicach, Tulcach i Antoninach w warunkach naturalnego porażenia grzybami z rodzaju *Fusarium*, bez sztucznej inokulacji. W każdej z lokalizacji wykonano trzy powtórzenia w układzie bloków losowanych, a rozlosowanie doświadczenia wykonano w programie EKSPLAN.

##### Wyniki

###### Populacja MCam

W warunkach naturalnego porażenia grzybami z rodzaju *Fusarium* obserwowano zróżnicowanie pod względem wartości średnich analizowanych cech między formami rodzicielskimi oraz w obrębie populacji. Odmiana Maresi charakteryzowała się zredukowaną wysokością, dłuższym kłosem, zwiększoną liczbą jak i masą ziaren z kłosa oraz opóźnionym terminem kłoszenia w porównaniu do formy CamB – podobnie jak w warunkach sztucznej inokulacji. W największym stopniu formy rodzicielskie różniły się pod względem liczby ziaren z kłosa (ok. 39%), natomiast w najmniejszym pod względem terminu kłoszenia (ok. 5%). W obrębie populacji RIL odnotowano efekty transgresji w odniesieniu do wszystkich analizowanych cech (tabela 7); obserwowano zarówno linie o wartościach przewyższających lepszą z form rodzicielskich jak i o wartościach mniejszych od gorszej formy rodzicielskiej. Wyjątek stanowiły masa ziarna z kłosa oraz termin kłoszenia, gdzie wartości minimalne dla populacji były równe bądź lepsze od wartości gorszej formy rodzicielskiej. Spośród analizowanych cech największy współczynnik zmienności (CV) stwierdzono dla terminu kłoszenia, masy ziarna z kłosa i liczby ziaren z kłosa, natomiast najniższy dla wysokości roślin. Nasilenie objawów fuzariozy kłosów populacji MCam pozwoliło na wytypowanie grupy linii RIL skrajnie różniących się stopniem porażenia w doświadczeniu z wykorzystaniem sztucznej inokulacji: linie o najmniejszym porażeniu – grupa 1 oraz linie o największym porażeniu – grupa 2. Dla tych dwóch grup i dla ich form rodzicielskich przedstawiono szczegółowe wyniki w doświadczeniu prowadzonym w warunkach naturalnych. Stwierdzono, że forma CamB miała indeks IFK 8.0 podczas gdy dla odmiany Maresi nie odnotowano tego indeksu. Mimo to, dla obu form rodzicielskich w analizowanym ziarnie stwierdzono zawartość DON. Wszystkie linie z grupy 1 nie wykazywały porażenia na poletku lecz ich ziarno w teście immunoenzymatycznym wykazało zawartość DON. Z kolei linie grupy 2 miały wysoki indeks IFK w warunkach naturalnego porażenia grzybami z rodzaju *Fusarium*. Najmniejszy procent porażonych ziaren w kłosie stwierdzono dla linii MCam88 (5,6%), natomiast największy dla linii MCam88 (12,2%). Największą koncentrację DON obserwowano dla linii MCam67 i wynosiła ona ponad 300 ppb.

###### Populacja LCam

W warunkach naturalnego porażenia grzybami z rodzaju *Fusarium* odmiana Lubuski charakteryzowała się zredukowaną wysokością o ok. 3% i opóźnionym terminem kłoszenia o ok. 6% w porównaniu do formy CamB. W obrębie populacji RIL odnotowano efekty transgresji w odniesieniu do analizowanych cech; obserwowano zarówno linie o wartościach przewyższających lepszą z form rodzicielskich jak i o wartościach mniejszych od gorszej formy rodzicielskiej (z wyjątkiem terminu kłoszenia, gdzie wartość minimalna dla populacji była nieznacznie większa od wartości gorszej formy rodzicielskiej). Zaobserwowano wyższy

współczynnik zmienności (CV) dla terminu kłoszenia niż dla wysokości rośliny. Podobnie jak w populacji MCam na podstawie nasilenia objawów fuzariozy kłosów wytypowano grupy linii RIL skrajnie różniące się stopniem porażenia w doświadczeniu z wykorzystaniem sztucznej inokulacji: linie o najmniejszym porażeniu – grupa 1 oraz linie o największym porażeniu – grupa 2. Dla tych dwóch grup i dla ich form rodzicielskich przedstawiono szczegółowe wyniki w doświadczeniu prowadzonym w warunkach naturalnych (tabela 10). Stwierdzono, że forma CamB miała indeks IFK 8.0 podczas gdy dla odmiany Lubuski nie odnotowano tego indeksu. Analiza zawartości DON w ziarnie obu form rodzicielskich pokazała jego obecność, przy czym dla odmiany Lubuski była ona siedmiokrotnie wyższa w porównaniu do drugiego genotypu rodzicielskiego. Wśród linii grupy 1 tylko dla dwóch z nich obserwowano indeks IFK, mimo to w ziarnie wszystkich linii stwierdzono zawartość DON. W przypadku linii grupy 2 stwierdzono stopień porażonych ziaren w kłosie w przedziale 4-10%, a zawartość DON dla dwóch linii MCam58 i MCam77 była wysoka, i wynosiła odpowiednio 240,06 ppb oraz 224,5 ppb.

### **Prezentacja wyników na konferencjach:**

Poster: Krzysztof Mikołajczak, Anetta Kuczyńska, Karolina Krystkowiak, Piotr Ogrodowicz, Maria Surma, Tadeusz Adamski, Michał Kempa, Halina Wiśniewska, Paweł Krajewski „Relationship between photoperiodic reaction and susceptibility to Fusarium head blight in spring barley”, 20th General Congress Plant Breeding: the Art of Bringing Science to Life, EUCARPIA, 29 sierpnia – 1 września 2015, Zurich, Szwajcaria, s. 220.