

SPRAWOZDANIE Z REALIZACJI ZADANIA nr 14: **Badanie typów odporności na fuzariozę kłosów u pszenżyta ozimego za pomocą markerów fenotypowych i metabolicznych, 2016r**

**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*. Patogeneza fuzariozy kłosów jest złożona i wyróżnia się kilka typów odporności: typ 1 - na infekcję pierwotną, typ 2 - na rozprzestrzenianie się patogena wzdłuż osadki kłosowej, typ 3 - odporność na uszkodzenie ziarniaków, typ 4 - tolerancja, czyli odporność na obniżkę plonu, typ 5 - 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. Ekspresja cech warunkowana takimi genami podlega dużemu wpływowi środowiska. Czynniki sprzyjającymi rozwojowi fuzariozy są wysoka wilgotność powietrza, wiatr i opady deszczu. Fuzarioza kłosów może prowadzić do obniżenia plonu ziarna. Jednakże poważniejszym problemem związanym z fuzariozą kłosów jest skażenie ziarna mikotoksynami takimi jak deoksyniwalenol, niwalenol, zearalenon, które są związkami niezwykle stabilnymi.

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. 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. 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.

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.

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.

### MATERIAŁ BADAWCZY, CEL I METODYKA BADAŃ

**Materiał badawczy:** 75 genotypów pszenżyta ozimego i 3 formy wzorcowe (Trefl, Fredro i Meloman)

**Cel badań:**

1. Badanie odporności typu I (odporność na infekcję) i II (rozprzestrzenianie się *Fusarium* w kłosie) 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 cytogenetyczna i molekularna mieszańców F<sub>1</sub> z uzyskanymi z krzyżowania w 2015 pszenżyta z formami posiadającymi gen odporności *Fhb1*.

3. Analiza zebranego materiału pod kątem oceny zasiedlania ziarniaków przez patogen (typ III odporności).
4. Analiza zawartości toksyn fuzaryjnych – deoksyniwalenolu i pochodnych, niwalenolu i zearalenonu w ziarnie wybranych genotypów pszenżyta wykazujących podwyższoną odporność na porażenie kłosa i uszkodzenie ziarniaków przez *Fusarium* (typ V odporności).

#### **Metodyka badań:**

- Odporność na fuzariozę kłosów testowano metodą inokulacji punktowej w warunkach szklarniowych i polowych (typ II odporności) i przez oprysk w warunkach polowych w IHAR 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 kłosków 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 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).

### **WYNIKI**

#### **1. *Badanie odporności typu I i II na fuzariozę kłosów u wybranych genotypów pszenżyta ozimego w dwóch lokalizacjach z wykorzystaniem markerów fenotypowych***

##### **Badanie odporności w warunkach polowych**

W 2016 roku badania obejmowały 106 genotypów pszenżyta ozimego o zróżnicowanym podłożu genetycznym, pochodzące z różnych kombinacji krzyżowań odmian i genotypów o poznanej podwyższonej odporności oraz trzech form kontrolnych. Wysiano genotypy nowo uzyskane (75) i te, które w na podstawie wyników badań w poprzednich latach wytypowano, jako formy o podwyższonej odporności. Badania przeprowadzono w doświadczeniach

infekcyjnych w Poznaniu i Radzikowie. Doświadczenia polowe zostały założone w układzie losowanych bloków Pszenżyto wysiano na poletkach o powierzchni 0,5 - 1 m<sup>2</sup> w trzech powtórzeniach oraz w kombinacji kontrolnej poza polem infekcyjnym.

Zastosowano technikę inokulacji przez opryskiwanie. Po inokulacji przez 2 doby stosowano mikrozaszanie (Poznań) lub inokulację prowadzono w godzinach wieczornych, kiedy wzrastała wilgotność względna powietrza. Inokulację przeprowadzono w pełni kwitnienia każdego genotypu.

Porażenie kłosów pszenżyta ozimego w obu lokalizacjach było zróżnicowane i kształtowało się średnio dla dwóch lokalizacji od 8,6 do 39,5%. Warunki pogodowe w obu lokalizacjach różniły się, szczególnie pod względem opadów po inokulacji, co miało istotny wpływ na poziom infekcji.

Współczynnik korelacji porażenia kłosów dla genotypów w Poznaniu i Radzikowie wynosił  $r=0,207$ . Na niską wartość współczynnika korelacji mogły mieć wpływ uszkodzenia mrozowe roślin pszenżyta w Radzikowie. Nie spowodowały one całkowitego wypadnięcia genotypów, ale spowodowały zniekształcenia roślin i zróżnicowanie terminu kwitnienia genotypów w poszczególnych powtórzeniach.

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

Przeprowadzono pilotażowe badania w szklarni IGR PAN Poznań na 20 liniach podwojonych haploidów (DH) pszenżyta z introgresją chromatyny *Aegilops* - materiał ten uzyskano w IGR PAN - Poznań: BC<sub>1</sub>F<sub>4</sub> Sekundo × (*Ae. kotschyi* × *S. cereale*)

(F<sub>3</sub> Moreno × (*Ae. ovata* × *S. cereale*))

Doświadczenie przeprowadzono w warunkach szklarniowych, z użyciem grzyba patogenicznego *F. culmorum*. Zastosowano inokulację punktową, stężenie 50 000 zar./ml.

Ocenę rozprzestrzeniania się patogena wzdłuż osadki kłosowej (Typ II odporności) przeprowadzono po 10 i 21 dniach od inokulacji. U trzech linii porażenie było niewielkie od 0,7 do 0,8 (LPK). Wszystkie linie DH pochodziły z kombinacji krzyżówkowej: F<sub>3</sub> Moreno × (*Ae. ovata* × *S. cereale*). Największe porażenie odnotowano u linii pochodzącej z kombinacji krzyżówkowej F<sub>3</sub> Moreno × (*Ae. ovata* × *S. cereale*).

### **Badanie typu II odporności w liniach pszenżyta ozimego z introgresją chromatyny *Triticum monococcum* i substytucjami genomu D pszenicy**

Do badań odporności typu II na fuzariozę kłosów wykorzystano również 40 genotypów pszenżyta ozimego z introgresją chromatyny *Triticum monococcum* i substytucjami genomu D pszenicy. Badania wykonano na polach doświadczalnych w Cerekwicy i Radzikowie. Na podstawie analizy wyników z dwóch lokalizacji wyselekcjonowano 6 genotypów z porażeniem 1,4 do 1,5 LPK. Współczynnik korelacji pomiędzy wynikami z Poznania i Radzikowa był niski i wynosił  $r = 0,357$ .

### **Badanie typu I i II odporności w genotypach wykazujących odporność na fuzariozę kłosów pszenżyta ozimego**

Badano również odporność typu I i II na fuzariozę kłosów u 56 genotypów pszenżyta ozimego, które wykazywały odporność polową w latach poprzednich. Badania wykonano w dwóch doświadczeniach w Radzikowie. Średnia odporność typu I wyniosła 2,27 punktów infekcji. Najwyższą odpornością obu typów (średnia) charakteryzowały się genotypy BOHD 1025-2, BOH 1425-1, DANKO 2 (2014) i DS.9.

Stwierdzono brak korelacji pomiędzy typami odporności I i II. Typ I nie korelował z indeksem fuzariozy kłosów w Radzikowie, natomiast korelował z IFK w Poznaniu. Typ II, dla odmiany,

korelował z IFK w Radzikowie, natomiast brak było korelacji z IFK w Poznaniu. Suma typów odporności I i II korelowała z IFK w Radzikowie i Poznaniu ( $R^2 = 0,318$ ). Najwyższy był, natomiast współczynniki korelacji ze średnim IFK dla obu lokalizacji.

## **2. Fenotypowanie porażenia kłosów wybranych genotypów pszenżyta w doświadczeniach infekcyjnych w dodatkowych lokalizacjach oraz analiza cytogenetyczna i molekularna mieszańców $F_1$ z uzyskanymi z krzyżowania w 2015 pszenżyta z formami posiadającymi gen odporności *Fhb1*.**

### **Doświadczenie infekcyjne w dodatkowych lokalizacjach**

W czterech lokalizacjach na terenie Polski wysiano po 66 genotypów pszenżyta badanego pod kątem fuzariozy również w Radzikowie i Poznaniu. Do inokulacji zastosowano te same szczepy *F. culmorum* jakie stosowano w Poznaniu i Radzikowie. Najwyższe średnie porażenie kłosa odnotowano w Dębnie, gdzie prawie każdego roku porażenie jest wysokie ze względu na korzystne dla rozwoju tej choroby warunki (temperatura i opady). Najniższe w Szelejewie.

W powyższych lokalizacjach odnotowano niewielkie objawy fuzariozy kłosów po infekcji naturalnej grzybami *Fusarium*. Objawy wystąpiły na pojedynczych poletkach. Infekcja naturalna nie pozwoliła więc na zróżnicowanie genotypów pod względem odporności na fuzariozę kłosów.

### **Identyfikacja molekularna markera *UMN10* charakteryzującego gen *Fhb1* w mieszańcach $F_1$**

Analizom molekularnym poddano 150 roślin mieszańcowych pokolenia  $F_1$  pochodzącym z 8 kombinacji krzyżówkowych pszenżyto  $\times$  pszenica (z genem *Fhb1*). W badaniach wykorzystano marker *UMN10*, którego lokalizacja jest powiązana z locus genu *Fhb1* znajdującego się na chromosomie 3B pszenicy odmiany „Sumai3”. Zidentyfikowano 147 roślin posiadających gen *Fhb1*. Wybrane formy, niosące gen *Fhb1* odporności na fuzariozę kłosa, zostały poddane krzyżowaniom wstecznym z pszenżytem. Uzyskano ziarniaki, które będą przedmiotem badań w kolejnych latach.

### **Analizy cytogenetyczne**

Analizom cytogenetycznym poddano 150 roślin mieszańcowych pokolenia  $F_1$  pochodzącym z 8 kombinacji krzyżówkowych pszenżyto  $\times$  pszenica z genem *Fhb1*. Genomowa hybrydyzacja *in situ* (GISH) została użyta, celem potwierdzenia mieszańcowego charakteru roślin pokolenia  $F_1$ , tj. identyfikacji genomów pszenicy (AABBDD) oraz pszenżyta (AABBRR).

## **3. Ocena fenotypowa porażenia ziarniaków badanych form (typ III odporności)**

W 2016 roku badania obejmowały 106 genotypów pszenżyta ozimego o zróżnicowanym podłożu genetycznym, pochodzące z różnych kombinacji krzyżowań odmian i genotypów o poznanej podwyższonej odporności oraz trzech form kontrolnych (Trefl, Meloman, Fredro). Wysiano genotypy nowo uzyskane (75) i te, które w na podstawie wyników badań w poprzednich latach wytypowano, jako formy o podwyższonej odporności.

Odnotowano bark korelacji porażenia kłosów i porażenia ziarna w lokalizacji Poznań-Cerekwica i słabą korelację (istotną statystycznie) w Radzikowie. Korelowało w niewielkim stopniu porażenie kłosa (średnie dla Poznania i Radzikowa) z porażeniem ziarna w lokalizacji Poznań. Średni IFK korelował jedynie z %FDK z liczby. Współczynnik miał niską wartość.

### **Określenie redukcji komponentów plonu ziarna**

Określano redukcję komponentów plonu ziarna (masa ziarna z kłosa, liczba ziarniaków w kłosie, masa tysiąca ziarniaków) w odniesieniu do prób kontrolnych (typ odporności IV).

Odnotowano brak korelacji porażenia kłosów i porażenia ziarna w lokalizacji Poznań-Cerekwica i słabą korelację (istotną statystycznie) w Radzikowie. Korelowało w niewielkim stopniu porażenie kłosa (średnie dla Poznania i Radzikowa z porażeniem ziarna w lokalizacji Poznań). Średni IFK korelował jedynie z %FDK z liczby. Współczynnik miał niską wartość.

U genotypów inokulowanych odnotowano średnio MZK na poziomie 62,4% kontroli.

Porażenie ziarna słabo korelowało z redukcją parametrów struktury plonu. Najwyższy był współczynnik dla korelacji %FDK z liczby i MTZ %kontroli. W przypadku IFK najwyższy był współczynnik korelacji z MZK %kontroli.

### **Identyfikacja białek ochronnych/obronnych**

Analizy proteomiczne prowadzono na dwóch odmianach żyta: odmianie Tur o stosunkowo wysokim stopniu odporności na porażenie *F. culmorum* oraz na odmianie Horyzo o większej podatności. Wykorzystując technikę 2-D elektroforezy, uzyskano żele, które stanowiły mapy białkowe dla warunków po inokulacji i warunków kontrolnych badanych odmian. Analiza różnicowa tych map, przy wykorzystaniu programu ImageMaster 2-D Platinum, wskazała 23 białka o wyższym poziomie akumulacji u odmiany odpornej żyta po inokulacji. Zidentyfikowane białka obejmowały głównie różne komponenty komórkowe, związane z aktywnością amylaz. Uzyskane wyniki potwierdziły naszą wcześniejszą hipotezę, że mechanizm odporności na *F. culmorum* u żyta może być związany z inhibicją alfa-amylazy grzybowej, podobnie jak u pszenicy i przędzyta.

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

Średnia ilość toksyny DON w Poznaniu i Radzikowie była bardzo podobna ok. 8 mg/kg. Natomiast stwierdzono znacznie wyższą zawartość toksyny NIV w Poznaniu.

Zawartość zearalenonu była około 8-krotnie wyższa w próbach ziarna z Poznania w porównaniu do prób z Radzikowa.

Określono także współczynniki korelacji pomiędzy porażeniem ziarna (FDK) a zawartością, zearalenonu (ZEA) i deoksyniwalenolu (DON) i pochodnych, niwalenolu (NIV) w ziarnie badanych prób. Wysokie współczynniki korelacji stwierdzono pomiędzy zawartością deoksyniwalenolu (DON) a % FDK m i %FDK l. Najwyższe współczynniki korelacji obliczono dla sumy trichotecen (TCTB) a DON i NIV ( $r=0,919$ ).

### **PODSUMOWANIE**

Badając w 2016 roku odporność genotypów 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 wielocelową (PCA), zidentyfikowano genotypy łączące różne typy odporności na fuzariozę kłosów: **BOHD 1025-2, BOH 537-2, DS. 9, DANKO 14/15, MAH 33544-4, MAH 33881-1/3, DANKO 19/15 i BOH 534-4.**