

SPRAWOZDANIE Z REALIZACJI ZADANIA nr 14: **Badanie typów odporności na fuzariozę kłosów u pszenżyta ozimego za pomocą markerów fenotypowych i metabolicznych, 2015r**

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 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. 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). Wprowadzenie genu *Fhb1* do pszenżyta przez krzyżowanie pszenżyta z formami pszenicy posiadającymi gen *Fhb1*
3. Analiza zebranego materiału pod kątem oceny zasiedlania ziarniaków przez patogen (typ III odporności) w tym identyfikacja białek w ziarniakach różnicujących odporne i podatne genotypy pszenżyta inokulowane szczepami *Fusarium culmorum*.
4. Określenie 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*.

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* (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 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 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 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

W 2015 roku badania obejmowały 89 genotypów pszenżyta ozimego o zróżnicowanym podłożu genetycznym, pochodzące z różnych kombinacji krzyżowań odmian i genotypów o poznanej podwyższonej odporności oraz trzech form kontrolnych (Tomko, Meloman Fredro). Wysiano genotypy nowo uzyskane i te, które na podstawie wyników badań w poprzednich latach wytypowano, jako formy o podwyższonej odporności. Przy wyborze genotypów do krzyżowań uwzględniano również zadawalające cechy rolnicze (plon i jakość). Zastosowano technikę inokulacji przez oprysk, ponieważ ten sposób inokulacji przypomina naturalne warunki infekcji.

1. Określono odporności typu I (na infekcję) oraz typu II (na rozprzestrzenienie się patogena wzdłuż osadki kłosowej).

Inokulację przeprowadzono w pełni kwitnienia każdego genotypu, ponieważ pszenżyto jest najbardziej podatne na atak *Fusarium* w fazie kwitnienia i w tej fazie rozwojowej zarodniki

najłatwiej wnikają w głąb kłosa. Aby prawidłowo nastąpiło zainfekowanie kłosa niezbędna jest kropla wody przez około dwa dni po inokulacji, która potrzebna jest do skielkowania zarodników w kłosie. Stąd też w lokalizacji Poznań zastosowano mikrozaszanie, a w Radzikowie inokulację prowadzono w godzinach wieczornych, kiedy wzrasta wilgotność względna powietrza. Porażenie kłosa pszenżyta ozimego w obu lokalizacjach było zróżnicowane i kształtowało się średnio dla dwóch lokalizacji od 3,6 do 22,2%. Warunki pogodowe w obu lokalizacjach różniły się, szczególnie pod względem opadów w czasie kwitnienia i tuż po inokulacji, co miało istotny wpływ na poziom infekcji. W lokalizacji Poznań ilość opadów była w czerwcu prawie 3-krotnie wyższa niż w Radzikowie. Podobnie w lipcu odnotowano również dwukrotnie więcej opadów w lokalizacji Poznań. Duże ilości opadów w lokalizacji Poznań wpłynęły na znacznie wyższe porażenie kłosa w tej lokalizacji w porównaniu z porażeniem tych samych genotypów w Radzikowie. W lokalizacji Poznań -Cerekwica porażenie kłosów pszenżyta (IFK% C) wahało się od 7,5 do 27%, natomiast w Radzikowie porażenie kłosów (%IFK) było niższe i kształtowało się od 0,0 do 20% i u 7 genotypów nie obserwowano porażenia kłosów. Biorąc pod uwagę średnie porażenie z dwóch lokalizacji, najniższe porażenie kłosa poniżej 5% odnotowano dla 5 genotypów: DL 446/08, DS. 9, BOHD 898-1, DANKO 1 (2014), BOH 835-4. Niewielkie porażenie poniżej 10% odnotowano jeszcze dla 42 genotypów. Genotyp DS.9 testowano już w 2014 i w tym roku odnotowano u niego najniższe porażenie. Podobnie Danko1 i DL 446. Największe porażenie kłosa, powyżej 20% odnotowano u 5 genotypów.

Należy zwrócić uwagę, że w 2015 roku na poletkach z pszenżytem a także pszenicą pojawił się wirus żółtej karłowatości jęczmienia (BYDV, CYDV) i to bardzo obniżyło kondycję roślin. Pojawiła się także rdza żółta na kłosach, co również utrudniało prawidłową ocenę.

Średnie dotyczące badanych parametrów odporności: liczba punktów infekcji, liczba porażonych kłosków, IFK w tunelu, IFK w polu w Radzikowie, IFK w polu w Poznaniu były wyższe dla pszenżyta w porównaniu z pszenicą, co potwierdza, że w ostatnim czasie następuje wyraźne załamanie odporności pszenżyta na fuzariozę kłosów, co z pewnością powodować będzie zwiększoną ilość szkodliwych dla człowieka i zwierząt toksyn fuzaryjnych. Pszenżyto przede wszystkim przecież używane jest na pasze dla zwierząt.

Odnotowano wysokie współczynniki korelacji pomiędzy indeksem fuzariozy obserwowanym w Radzikowie a typem I i II odporności, jak również pomiędzy porażeniem kłosów (IFK) łącznie w Radzikowie i Poznaniu a doświadczeniem inokulacyjnym prowadzonym w warunkach częściowo kontrolowanych w tunelu w Radzikowie. Współczynnik determinacji pomiędzy średnią odpornością typu I i II oraz średnim indeksem fuzariozy w Radzikowie i Poznaniu wynosił $R^2=0,3271$.

W lokalizacji Poznań ponadto wykorzystano w badaniach odporności na fuzariozę kłosów typu II (na rozprzestrzenianie się patogena wzdłuż osadki kłosowej) 42 linie pszenżyta ozimego z introgresją chromatyny *T. monococcum* oraz substytucją lub addycją chromosomu 1D lub 3D z *T. aestivum* odm. Panda uzyskanych w IGR PAN w Poznaniu. Odnotowano niskie porażenie kłosa od 1,0 do 4,6 dla szczepu KF 846 i (średnio 1,6) i niższe od 1,0 do 1,8 przy zastosowaniu do inokulacji szczepu ZFR 112

(średnio 1,38). Niewielkie porażenie wyliczone średnio dla obu szczepów *F. culmorum* odnotowano dla 8 genotypów. Natomiast porażenie powyżej 2 (od 2,10 do 2,8) obserwowano u trzech genotypów.

Prowadzono również doświadczenia inokulacyjne w czterech dodatkowych lokalizacjach na terenie Polski: (Dębnie, Małyszynie, Szelejewie i Borowie. Warunki pogodowe we wszystkich lokalizacjach prowadzenia doświadczeń były bardzo zróżnicowane, stąd nie uzyskano wysokich korelacji pomiędzy lokalizacjami $r=0,503$.

Trzy wysokoplonujące, nowoczesne odmiany i linie pszenżyta ozimego (odmiana Twingo oraz linie MAH7314 i MAH 7213) przekrzyżowano z 4 liniami pszenicy wykazującymi odporność na fuzariozę kłosów i zawierającymi gen odporności *Fhb1* z odmiany Sumai 3. Dla potwierdzenia obecności genu *Fhb1* (chromosom 3BS) w genotypach pszenicy użytych do krzyżowań, przeprowadzono identyfikację molekularną genotypów pszenicy za pomocą markera UMN10. Krzyżowania wykonano w szklarni w dniach od 21.04 do 11.05.2015. Uzyskano ogółem 211 ziarniaków. Ziarniaki jesienią wysiano w szklarni do doniczek z ziemią, celem rozmnożenia.

2. Określano typ III odporności związany z porażeniem ziarniaków.

Określano procent ziarniaków z wyraźnymi objawami fuzariozy (%FDK m =z masy) oraz (%FDK l =z liczby) u 75 genotypów pszenżyta ozimego i trzech odmian wzorcowych (Fredro, Meloman i Tomko). Procent ziarniaków z wyraźnymi objawami fuzariozy (%FDK m) w lokalizacji Poznań wahał się od 4,1 do 30,20% (FDK% masa), średnio 12,27%. Natomiast % liczby porażonego ziarna (%FDK liczba) wahał się od 5,7 do 39,4 (średnio 18,8%). Porażenie ziarna w lokalizacji Radzików było niższe i wahało się od 1,0 do 26,6 %FDK masa (średnio 10,6) i od 1,2 do 25,3%FDK z liczby (średnio 11,0). Uwzględniając dwie lokalizacje badań stwierdzono, że najmniejsze porażenie ziarna (typ III odporności) odnotowano dla genotypów DS.9 i DL446. Niskie porażenie ziarna odnotowano jeszcze u genotypu MAH 33115-4/1 (poniżej 6% FDK). Największy procent ziarna z wyraźnymi objawami fuzariozy odnotowano u genotypu BOHD 2027-1 odpowiednio FDK m =28,4% i FDK l=32,2%.

Dla wszystkich genotypów inokulowanych i kontrolnych (bez inokulacji) określono elementy struktury plonu: masę ziarna z kłosa (MZK), liczbę ziarna z kłosa (LZK) oraz masę tysiąca ziarniaków (MTZ). Biorąc pod uwagę wyniki określone dla kontroli oraz genotypów inokulowanych określono redukcję elementów struktury plonu RMZK, RLZK oraz RMTZ po inokulacji szczepami *F. culmorum*. U wszystkich badanych obserwowano genotypów pszenżyta ozimego w lokalizacji Poznań redukcję wszystkich trzech badanych parametrów struktury plonu (MZK, LZK, MTZ). Jednakże w tym roku nie było sprzyjających warunków do rozwoju fuzariozy i obniżka parametrów struktury była znacznie niższa niż w latach sprzyjających rozwojowi tej choroby. Odnotowano średnio najwyższą obniżkę masy ziarna z kłosa o 28%.

Stopień porażenia ziarniaków jest związany z potencjałem odporności roślin na fuzariozę kłosów. Metabolizm rośliny w warunkach stresów jest uzależniony m.in. od stopnia akumulacji niektórych białek, w tym białek ochronnych/obronnych. Identyfikacja takich białek może być bezpośrednim wskaźnikiem stopnia odporności rośliny.

W wyniku analiz porównawczych pomiędzy mapami białkowymi 2-D charakteryzującymi ziarniaki linii o wysokim stopniu porażenia i ziarniaki linii o niskim stopniu porażenia, wyselekcjonowano 23 plamki białkowe, które pokazały statystycznie istotny, zróżnicowany poziom akumulacji białek pomiędzy badanymi grupami roślin. Sześć białek pokazało wyższy poziom akumulacji u linii o wyższym porażeniu i 7 białek u linii o niższym porażeniu. Zidentyfikowane białka były zaangażowane w metabolizm aminokwasów, biosyntezę białek i ich fałdowanie, gromadzenie materiałów zapasowych, homeostazę redox, system detoksyfikacji, mitochondrialny transport elektronów, 'processing RNA' oraz metabolizm węglowodanowy.

3. Analiza zawartości ergosterolu i kumulacji /degradacji toksyn fuzaryjnych w ziarnie (typ IV odporności)

W doświadczeniach inokulacyjnych badano w ziarniakach zawartość ergosterolu (ERG) – miernika ilości grzybnia w tkance. Zawartość ERG średnio dla dwóch lokalizacji (Poznań i Radzików) prowadzenia doświadczeń wynosiła 4,9mg/kg i wahała się od 1,4mg/kg (BOH534-4) do 8,1mg/kg (MAH34068-5). U genotypu DS. 9 wykazującego niewielkie porażenie kłosa (%IFK) oraz niewielki procent porażonego ziarna (%FDK) odnotowano również niewielką ilość ergosterolu (5,5 mg/kg).

Badano również akumulację toksyn fuzaryjnych: deoksyniwalenol (DON), zearalenon (ZEA) oraz niwalenol (NIV). Niwalenolu nie stwierdzono w badanych próbach. Zawartość DON wynosiła średnio dla dwóch lokalizacji 11298 ppb i wahała się od 1900 (BOHD 1025-2) do 39500 ppb (Danko 1). Najmniej DON stwierdzono w ziarnie genotypów: BOHD 1025-2, DL 446/08, DC 06080-56, LD 121/08 i DANKO 21; najwięcej w ziarnie genotypów: BOH 835-4 i DANKO 1 (2014).

Zawartość ZEA była niska i wynosiła średnio dla dwóch lokalizacji 41ppb i wahała się od 10 (DL446/08) do 188 ppb (Danko 8). Najmniej ZEA stwierdzono w ziarnie genotypów: DL 446/08, BOHD 1025-2, MAH 34359-1, BOHD 1186-1, DANKO 21; najwięcej w ziarnie genotypów: BOH 835-4 i DANKO 8 (2013).

Określono także zależności pomiędzy porażeniem ziarna (FDK) a zawartością ergosterolu (ERG), zearalenonu (ZEA) i deoksyniwalenolu (DON) w ziarnie badanych prób. Najwyższy współczynnik korelacji stwierdzono pomiędzy zawartością deoksyniwalenolu (DON) a zawartością zearalenonu (ZEA) $r=0,665$

Zależność pomiędzy średnim uszkodzeniem ziarniaków (FDK liczba) a średnią zawartością ergosterolu (ERG) w ziarnie z doświadczeń inokulacyjnych w Poznaniu i Radzikowie wynosiła natomiast $r=0,511$. Współczynnik korelacji wyliczony dla zawartości deoksyniwalenolu (DON) i liczby uszkodzonych ziarniaków (FDK liczba) był niższy i wynosił $r=0,414$. Najwyższy współczynnik korelacji stwierdzono pomiędzy uszkodzeniem ziarniaków (FDK liczba) a zawartością zearalenonu (ZEA). Współczynnik ten wynosił $r=0,558$.

Synteza badań

Ze względu na złożoność odporności na fuzariozę kłosów oraz różne jednostki miar poszczególnych badanych cech uzyskane wyniki poddano statystycznej analizie składowych głównych. Genotypy pszenżyta badane w projekcie zostały pogrupowane na podstawie odporności na porażenie kłosa (IFK) i

uszkodzenie ziarniaków (FDK) oraz zawartości ergosterolu (ERG) i toksyn fuzaryjnych w ziarnie (DON i ZEA) . Oznaczono 6 genotypów pszenżyta ozimego o najwyższej odporności: DL446/08, DS.9, MAH33881-7, BOHD1025-2, LD121/08, MAH33881-1/3.

PODSUMOWANIE

- ❖ Uzyskanie genotypów pszenżyta z większą odpornością na fuzariozę kłosów jest trudne, ponieważ odporność na tę chorobę jest cechą ilościową, modyfikowaną przez czynniki genetyczne i przez warunki środowiskowe, szczególnie temperaturę i opady, od kwitnienia do stadium dojrzałości woskowej miękkiej.
- ❖ Obserwowana jest znaczna interakcja genotypowo-środowiskowa i dlatego konieczne są, co najmniej dwa niezależne doświadczenia do fenotypowego oszacowania poziomu odporności.
- ❖ Na podstawie analizy składowych głównych dla 37 genotypów pszenżyta ozimego z uwzględnieniem zmienności odporności na fuzariozę kłosów mierzoną indeksem fuzariozy kłosów (IFK), uszkodzeniem ziarniaków (FDK) i zawartością ergosterolu (ERG), zearalenonu (ZEA) i deoksyniwalenolu (DON) w ziarnie w Radzikowie i Cerekwicy oznaczono 6 genotypów pszenżyta ozimego o najwyższej odporności: DL446/08, DS.9, MAH33881-7, BOHD1025-2, LD121/08, MAH33881-1/3.
- ❖ Genotypy te mogą stanowić źródło odporności przeznaczone do badań nad odpornością oraz mogą być wykorzystane do krzyżowań.