

**TOMASZ GÓRAL**<sup>1</sup>  
**HALINA WIŚNIEWSKA**<sup>2</sup>  
**PAWEŁ CZEMBOR**<sup>1</sup>  
**PIOTR OCHODZKI**<sup>1</sup>  
**MAGDALENA RADECKA-JANUSIK**<sup>1</sup>  
**MACIEJ MAJKA**<sup>2</sup>  
**JAROSŁAW PRZETAKIEWICZ**<sup>1</sup>

<sup>1</sup> Instytut Hodowli i Aklimatyzacji Roślin — Państwowy Instytut Badawczy, Radzików

<sup>2</sup> Instytut Genetyki Roślin Polskiej Akademii Nauk, Poznań

Kierownik Tematu: dr hab. Tomasz Góral Instytut Hodowli i Aklimatyzacji Roślin — Państwowy Instytut Badawczy, Radzików, 05-870 Błonie, tel. 22 7334636, e-mail: t.goral@ihar.edu.pl

*Prace zostały wykonane w ramach badań podstawowych na rzecz postępu biologicznego w produkcji roślinnej na podstawie decyzji Ministra Rolnictwa i Rozwoju Wsi nr HOR.hn.802.19.2018, Zadanie 6.*

## Poszukiwanie oraz wykorzystanie markerów fenotypowych, metabolicznych i molekularnych do badania typów odporności na fuzariozę kłosów u form pszenicy o zróżnicowanej podatności

### Identification and application of phenotypic, metabolic and molecular markers in studies of types of resistance to *Fusarium* head blight in winter wheat accessions differing in resistance

**Słowa kluczowe:** *Fhb1*, *Fusarium*, fuzarioza kłosów, markery molekularne, mykotoksyny, odporność, pszenica

#### CELE PROJEKTU

1. Ocena stopnia porażenia kłosów genotypów pszenicy ozimej przez *Fusarium* celem wyboru form odpornych pod względem odporności typu 1 oraz 2 na fuzariozę kłosów.
2. Ocena odporności na uszkodzenie ziarniaków przez *Fusarium* (typ odporności 3) oraz tolerancji genotypów pszenicy na fuzariozę kłosów (typ odporności 4) celem wyboru form odpornych.
3. Określenie zawartości ergosterolu (wskaźnik zawartości grzybni) oraz toksyn fuzaryjnych w ziarnie (typ odporności 5) wybranych genotypów pszenicy

wykazujących podwyższoną odporność na porażenie kłosa i uszkodzenie ziarniaków przez *Fusarium*.

4. Uzyskanie pokolenia F<sub>3</sub>BC<sub>2</sub> pięciu kombinacji krzyżówkowych pszenicy ozimej po wcześniejszej selekcji molekularnej osobników pokolenia F<sub>2</sub>BC<sub>2</sub> na obecność genu *Fhbl* odporności na fuzariozę kłosa.

#### MATERIAŁY I METODY

Odporność na fuzariozę kłosów genotypów pszenicy testowano w warunkach polowych w IHAR Radzików oraz w IGR PAN w Poznaniu (Cerekwica). Materiał badawczy stanowiły genotypy, które wykazały odporność w roku 2017 oraz nowe niebadane dotychczas genotypy. Formy wzorcowe stanowiły odmiany i linie odporne; wybrane genotypy o wysokiej podatności na porażenie kłosa; współczesne odmiany o wysokim plonie. Kłosa pszenicy w fazie kwitnienia opryskiwano zawiesiną zarodników *Fusarium culmorum*. Oceniano porażenie kłosów wyliczając indeks fuzariozy kłosów (IFK).

W celu określenia odporności typu 1 kłosa pszenicy opryskiwane były zawiesiną zarodników *F. culmorum*. Oceniana była liczba punktów infekcji na kłosach. W celu określenia odporności typu 2 zastosowana była metoda inokulacji punktowej. Nasilenie fuzariozy kłosów oceniane było poprzez określanie liczby kłosków z objawami choroby.

Prowadzone były doświadczenia infekcyjne w 5 punktach doświadczalnych (Dębina, Nagradowice, Polanowice, Smolice, Strzelce). W doświadczeniach tych wysiano nowe genotypy, których odporność nie była dotychczas badana. Metodyka doświadczenia była podobna w Radzikowie i Poznaniu.

Proporcja ziarniaków uszkodzonych przez *Fusarium* była określana wizualnie poprzez podział próby ziarniaków na ziarniaki zdrowe i ziarniaki z objawami porażenia przez *Fusarium* (Argyris i in., 2003). Wyliczono wartość FDK w oparciu o masę ziarniaków uszkodzonych (FDK masa) oraz ich liczbę (FDK liczba) w odniesieniu do masy lub liczebności całej próby. Określona została względna wartość komponentów plonu ziarna w odniesieniu do prób kontrolnych.

W wybranych próbach ziarna pszenicy z doświadczeń z roku 2017 analizowana była zawartość DNA *F. culmorum*. Wykorzystano technikę real-time PCR zgodnie z metodyką opisaną przez Nicolaisen i in. (2009). Wyliczono względną zawartość DNA *F. culmorum* w stosunku do DNA pszenicy (pg/μg).

Ziarno z genotypów o najwyższej odporności analizowano pod względem zawartości ergosterolu oraz toksyn fuzaryjnych. Zawartość ergosterolu określona była metodą wysokosprawnej chromatografii cieczowej (Perkowski i in., 2007, 2008). Zawartość trichotecenów z grupy B (deoksyniwalenol [DON], 3-acetyl deoksyniwalenol [3AcDON], 15-acetyl deoksyniwalenol [15AcDON], niwalenol [NIV]) analizowano przy wykorzystaniu techniki chromatografii gazowej (Góral i in., 2019). Zawartość zearalenonu (ZEN) oznaczano za pomocą ilościowego testu ELISA AgraQuant® ZON 40/1000 zgodnie z procedurą podaną przez producenta.

### Selekcja wspomagana markerami molekularnymi (MAS)

Materiałem wykorzystanym w badaniach były rośliny pokolenia F<sub>2</sub>BC<sub>2</sub> pochodzące z pięciu kombinacji krzyżówkowych. Dawcą genu odporności na fuzariozę była linia AIII62/1, natomiast biorcami — linie SMH8527, DL414/10, STH1178, MIB11262 oraz NAD10041. W ramach tematu przeanalizowano łącznie 600 roślin — po 120 z każdej kombinacji. W pierwszym etapie selekcji rośliny pokolenia F<sub>2</sub>BC<sub>2</sub> testowano w poszukiwaniu osobników homozygotycznych pod względem genu odporności *Fhb1* (w typie rodzica-dawcy), na podstawie analizy polimorfizmu markerów SSR sprzężonych z genem, tj. UMN10 lub cfb6033. Polimorfizm badano również w *loci* markerów flankujących dystalnie (gwm389) i proksymalnie (gpw3248), mając na celu selekcję homozygot w typie rodzica wypierającego. Po tym etapie zawężono pulę roślin do osobników, które były homozygotami pod względem genu odporności *Fhb1* (w typie rodzica-dawcy) oraz (w miarę możliwości) homozygotami w typie rodzica wypierającego pod względem *loci* markerów flankujących. W celu potwierdzenia wyników selekcji przetestowano ponownie *loci* wymienionych wcześniej markerów oraz dodatkowo zbadano polimorfizm kolejnych dwóch markerów flankujących, tj. gwm493 i barc12, położonych bliżej genu *Fhb1*.

Po zakończeniu analiz molekularnych wybrane rośliny pokolenia F<sub>2</sub>BC<sub>2</sub> zostały wykorzystane do uzyskania pokolenia F<sub>3</sub>BC<sub>2</sub>. Rośliny zostały poddane jarowizacji (8 tygodni w temp. 4°C), a następnie prowadzono je w warunkach szklarniowych.

### WYNIKI

Średni IFK w Cerekwicy wyniósł 6,9% (0–33,0%), natomiast w Radzikowie 9,0% (0,5–30,0%). Najwyższą odporność wykazały wzorce odporne oraz genotypy: KBP04.164, KBP05.284, NAD13014, NAD13015, NAD13016, NAD13017, POB0316, POB457/07, POB759/04 i STH9059.

Średnia odporność typu 1 wyniosła 1,54 punktów infekcji (pi) (1,00–2,89 pi). Najwyższą odporność typu 1 wykazał wzorzec odporny: 20816/2[Fhb1+] oraz genotypy NAD13015, KBP10 40, NAD13014, POB0211, POB0114, STH105, NAD11053, NAD13024, NAD13017, POB759/04, DC332/09-3, DCh4763/07, POB0616. Średnia odporność typu 2 wyniosła 1,89 porażonych kłosek (pk) (0–6,71 pk). Najwyższą odporność typu 2 wykazało 10 wzorców odpornych oraz genotypy STH032 i KOH275. Najwyższą średnią odporność obu typów wykazało 9 wzorców odpornych. Wysoka była również odporność następujących genotypów: STH2041, NAD13016, POB0514, NAD13017. Średnia odporności obu typów korelowała istotnie z IFK warunkach polowych ( $r = 0,632$ ).

Analiza składowych głównych, w której zmiennymi były IFK z lokalizacji (Poznań, Radzików, Dębina, Nagradowice, Polanowice) pozwoliła na zidentyfikowanie genotypów wykazujących odporność na porażenie kłosa we wszystkich środowiskach. Były to np.: AND82/11/50, POB1016, POB1216, NAD14008, STH5483, AND532/11, AND245/13, STH4317, POB0616, POB0216, POB0816, POB0516, SMH9523, NAD14020,

POB0316, STH5407, KBP296/48, SMH9326, STH5485, DM850/14. Najwyższą odporność spośród wzorców wykazała odmiana Kilimanjaro.

Średnie uszkodzenie ziarniaków przez *Fusarium* wyniosło FDK masa = 14,3% (2,6–43,2%) oraz FDK liczba = 21,1% (3,7–52,4%). Najniższe uszkodzenie ziarniaków miało 21 genotypów w tym 7 wzorców odpornych. Były to np. STH 9059, NAD 13014, NAD 13017, POB 170/04, NAD 14008, STH 5261, STH 5316. IFK korelował istotnie z uszkodzeniem ziarniaków.

Redukcja plonu ziarna z kłosa (RMZK) wyniosła średnio 45,6% 90–86,4%). Liczba ziarniaków w kłosie (LZK) została zredukowana średnio o 33,2% (0–81,5%). Masa tysiąca ziarniaków (MTZ) została zredukowana średnio o 20,9% (0–54,9%). Najniższą redukcję MZK w odniesieniu do kontroli odnotowano u 7 wzorców odpornych, odmiany Artist oraz 11 genotypów (w tym: AND82/11/50, STH9059, POB0316). Średni indeks fuzariozy kłosów oraz FDK korelowały z redukcjami masy ziarna z kłosa i liczby ziarniaków w kłosie.

Zidentyfikowano genotypy łączące odporność na porażenie kłosa (typ 1+2), uszkodzenie ziarniaków (typ 3) oraz niską redukcję plonu ziarna (typ 4). Były to: STH9059, POB0316, NAD13014, KBP1629, STH5261 oraz część wzorców odpornych.

W wybranych próbach pszenicy z 2017 koncentracja DNA *F. culmorum* wyniosła średnio 28034 pg na 1 µg DNA pszenicy. W próbach z Poznania zawartość DNA (39117 pg/µg) była ponad dwukrotnie wyższa niż z Radzikowa (16952 pg/µg). Zawartość DNA korelowała istotnie z innymi miernikami oceny odporności pszenicy na fuzariozę kłosów. Bardzo wysokie były współczynniki korelacji z IFK i FDK.

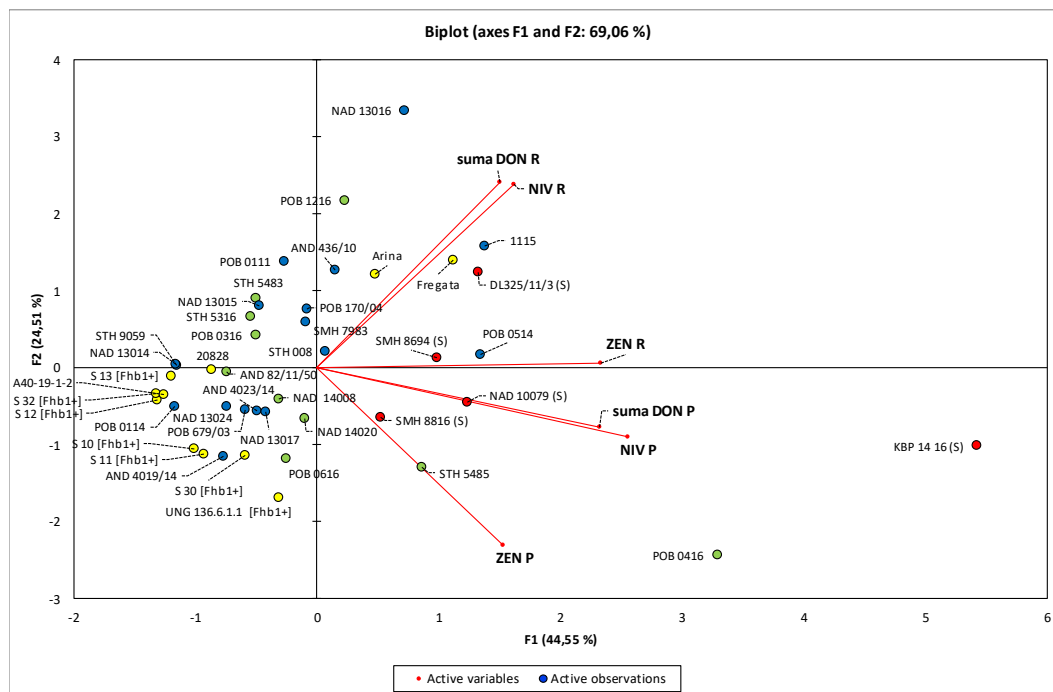
Średnia zawartość deoksyniwalenolu (DON) w ziarnie badanych genotypów wyniosła 1495 µg/kg (58–7726 µg/kg). W próbach z Poznania zawartość DON była bardzo niska i wyniosła 595 µg/kg (23–8300 µg/kg). W Radzikowie natomiast była 4-krotnie wyższa i wyniosła 2395 µg/kg (0–13825 µg/kg). Stwierdzono obecność w ziarnie pszenicy pochodnych acetylowych DON — 3AcDON i 15AcDON. Zawartości tych toksyn były bardzo niskie. Średnia zawartość niwalenolu (NIV) w ziarnie badanych genotypów była wyższa niż zawartość DON i wyniosła 2778 µg/kg (353–8173 µg/kg). W próbach z Radzikowa zawartość NIV była bardzo niska i wyniosła 67 µg/kg (0–375 µg/kg). W Poznaniu natomiast była bardzo wysoka i wyniosła 5488 µg/kg (680–16295 µg/kg).

Średnia sumaryczna zawartość trichotecenów z grupy B w ziarnie genotypów pszenicy wyniosła 4338 µg/kg. Zakres zmienności od 840 (S10[Fhb1+]) do 14465 µg/kg (POB0416).

Zawartość ZEN w ziarnie była niska i wyniosła średnio 45 µg/kg (0–454 µg/kg). W próbach ziarna z Poznania stwierdzono jedynie średnio 17 µg/kg ZEN, natomiast w próbach z Radzikowa zawartość ZEN wyniosła 73 µg/kg.

Ze względu na znaczne różnice w porażeniu kłosów genotypów badanych w dwóch doświadczeniach z Radzikowie, analizowano ich wyniki oddzielnie. Analiza wieloczynnikowa wykazała, że w grupie odpornych najniższą akumulację różnych grup toksyn stwierdzono u wzorców odpornych (z wyjątkiem Ariny i Fregaty) oraz u genotypów POB0114, NAD13014, STH9059, NAD13024 i AND82/11/50, AND4019/14, POB0111,

NAD13024, AND4023/14, POB679/03, NAD13017, POB0616 (rys. 1). W grupie DW najniższą akumulację różnych grup toksyn stwierdzono u genotypów STH6151, STH5347, STH6130, NAD15105, STH6116, STH6167, STH6177, NAD15115, STH5261, POB0517, STH6177, STH6167 i STH6111 (rys. 2).

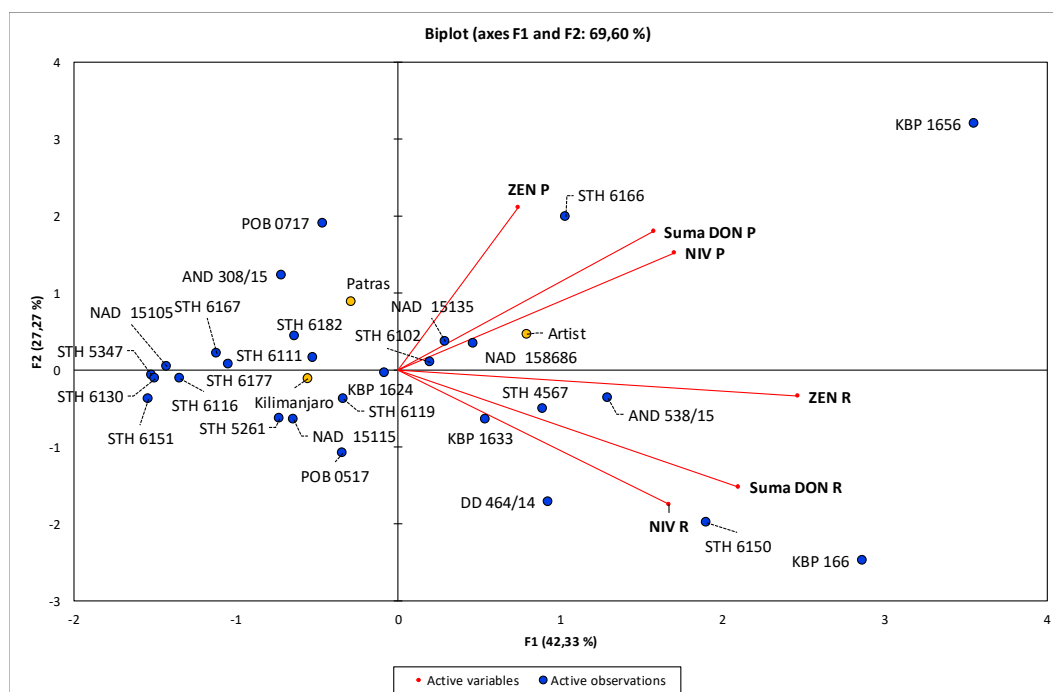


Rys. 1. Układ współrzędnych dwóch składowych głównych dla 43 genotypów pszenicy ozimej z grupy ‘odporne’. Składowe wyjaśniają 69,06% zmienności odporności akumulację zearalenonu (ZEN) i trichotecenów z grupy B (suma DON, NIV) w ziarnie z doświadczeń w Poznaniu (P) i Radzikowie (R). Wektory wskazują kierunek wzrostu wartości zmiennych

Indeks fuzariozy kłosów korelował istotnie z zawartością trichotecenów oraz zearalenonu. Najniższy był współczynnik korelacji z 15AcDON, najwyższy dla ZEN. Uszkodzenie ziarniaków nie korelowało z zawartością DON, natomiast wysokie były współczynniki korelacji z zawartościami NIV i ZEN. Stężenie DON nie korelowało istotnie z zawartością NIV. Istotny, lecz niski był współczynnik korelacji ze stężeniem ZEN.

W wyniku selekcji we wszystkich populacjach zidentyfikowano łącznie 166 osobników homozygotycznych w *loci* markerów centralnych (UMN10 lub cfb6033) sprzężonych z genem odporności na fuzariozę kłosów *Fhb1*. Wśród tej grupy znalazło się 135 roślin homozygotycznych (w typie rodzica wypierającego) w *locus* flankującego proksymalnie markera gpw3248 (27 w *locus* markera gwm493) oraz 75 osobników homozygotycznych w *locus* markera flankującego dystalnie — gwm389 (47 w *locus* markera barc12). Najbardziej pożądanym układem alleli był natomiast układ:

homozygota w typie rodzica dawcy w *locus* markera centralnego oraz homozygoty w typie rodzica wypierającego w *loci* markerów flankujących.



**Rys. 2. Układ współrzędnych dwóch składowych głównych dla 30 genotypów pszenicy ozimej z grupy ‘DW. Składowe wyjaśniają 69,60% zmienności odporności akumulację zearalenonu (ZEN) i trichotecenów z grupy B (suma DON, NIV) w ziarnie z doświadczeń w Poznaniu (P) i Radzikowie (R). Wektory wskazują kierunek wzrostu wartości zmiennych**

Po zakończeniu analiz wybrano 55 roślin, które posłużyły do uzyskania pokolenia  $F_3BC_2$ . Każdą z kombinacji potraktowano indywidualnie pod względem kryteriów selekcji osobników do dalszego rozmnażania, wybierając te o wcześniej wspomnianej najlepszej kombinacji alleli. Dodatkowo, w każdej kombinacji zebrano nasiona z ośmiu roślin homozygotycznych w typie rodzica wypierającego zarówno w *locus* markera centralnego, jak i w *loci* markerów flankujących. Rośliny te będą stanowić grupę kontrolną w przyszłych doświadczeniach infekcyjnych.

#### LITERATURA

- Argyris J., Van Sanford D., TeKrony D. 2003. *Fusarium graminearum* infection during wheat seed development and its effect on seed quality. *Crop Sci.* 43: 1782 — 1788.
- Góral T., Wiśniewska H., Ochodzki P., Nielsen L. K., Walentyn-Góral D., Stępień Ł. 2019. Relationship between *Fusarium* head blight, kernel damage, concentration of *Fusarium* biomass, and *Fusarium* toxins in grain of winter wheat inoculated with *Fusarium culmorum*. *Toxins* 11: 2.

- Nicolaisen M., Suproniene S., Nielsen L. K., Lazzaro I., Spliid N.H., Justesen A. F. 2009. Real-time PCR for quantification of eleven individual *Fusarium* species in cereals. *Journal of Microbiological Methods* 76: 234 — 240.
- Perkowski J., Buśko M., Stuper K., Kostecki M., Matysiak A., Sz wajkowska-Michalek L. 2008. Concentration of ergosterol in small-grained naturally contaminated and inoculated cereals. *Biologia* 63 (4): 542 — 547.
- Perkowski J., Wiwart M., Buśko M., Laskowska M., Berthiller A., Kandler S., Krska R. 2007. *Fusarium* toxins and total fungal biomass indicators in naturally contaminated wheat samples from northeastern Poland in 2003. *Food Additiv. Contam.* 24 (11): 1292 — 1298.

