

**PSZENICA**, Wiśniewska<sup>1\*</sup> Halina, Majka<sup>1</sup> Maciej, Gawłowska<sup>1</sup> Magdalena, Korbas<sup>2</sup> Marek, Twardawska<sup>1</sup> Adriana, Belter<sup>1</sup> Jolanta

<sup>1</sup> Instytut Genetyki Roślin, Polskiej Akademii Nauk, Poznań

<sup>2</sup> Instytut Ochrony Roślin, Państwowy Instytut Badawczy, Poznań

\*Wiśniewska Halina: [hwis@igr.poznan.pl](mailto:hwis@igr.poznan.pl), nr telefonu: 662 044 293

Prace zostały wykonane w ramach badań podstawowych na rzecz postępu biologicznego w produkcji roślinnej na podstawie decyzji: *nr decyzji (HOR. hn.802.2.2019)*, **zadanie nr 2**.

**Wykorzystanie markerów molekularnych i fenotypowych do identyfikacji genów odporności pszenicy na łamliwość źdźbła powodowaną przez *Oculimacula yallundae* i *Oculimacula aciformis***

**Słowa kluczowe:** geny *Pch1*, *Pch2*, łamliwość źdźbła, markery molekularne, *Oculimacula*, pszenica

## **Wstęp**

Łamliwość źdźbła to ważna choroba pszenicy uprawnej (*Triticum aestivum* L.) oraz innych zbóż. Powodowana jest przez dwa grzyby patogeniczne *Oculimacula yallundae* i *O. aciformis*. Występuje często w rejonach, gdzie są łagodne zimy i chłodne wiosny. W trakcie wegetacji patogen rozwija się na podstawach źdźbeł, gdzie tworzy się watowata grzybnia i wówczas podstawa źdźbła próchnieje, powodując łamliwość źdźbła. Może to skutkować ubytkiem plonu nawet do 50%. Do tej pory zidentyfikowano dwa geny warunkujące odporność - *Pch1* i *Pch2*. Gen *Pch1* jest najbardziej efektywny, został zidentyfikowany w *Aegilops ventricosa* i translokowany do długiego ramienia chromosomu 7D heksaploidalnej pszenicy. Nie zapewnia on całkowitej odporności rośliny, jednakże znacząco redukuje skalę porażenia. Drugim genem, który w mniejszym stopniu warunkuje odporność na łamliwość źdźbła jest *Pch2*, zlokalizowany na dłuższym ramieniu chromosomu 7A pszenicy odmiany Capelle-Desprez. Jego efektywność zapobiegania infekcji przez grzyby patogeniczne z rodzaju *Oculimacula* jest mniejsza od genu *Pch1* i dlatego gen *Pch2* może być traktowany jako dodatkowe źródło odporności na łamliwość źdźbła.

## Cele badań w roku 2019:

1. Piramidyzacja genów odporności (*Pch1* i *Pch2*) na łamliwość źdźbła u heksaploidalnej pszenicy. Identyfikowanie obecności genu *Pch1* przy użyciu markera izoenzymatycznego w postaci endopeptydazy *EpD1b* oraz genów *Pch1* i *Pch2* przy użyciu markerów SSR.
2. Ocena porażenia siewek genotypów pszenicy (test siewkowy w fitotronie) i dojrzałych źdźbeł (test polowy w fazie 1-2 kolanka, z użyciem zawiesiny grzybni i zarodników *O. yallundae* i *O. acufiformis*) oraz ocena naturalnego porażenia w kilku lokalizacjach w Polsce.
3. Analiza elementów struktury plonu badanych form - określenie wpływu genów *Pch1* i *Pch2* na cechy agronomiczne.

## Materiały i Metody

Do krzyżowań wykorzystano komponenty krzyżówkowe wykazujące podwyższoną odporność na łamliwość źdźbła, posiadające zidentyfikowane przy pomocy markerów molekularnych i markera izoenzymatycznego dwa geny: *Pch1* i *Pch2*; genotypy, u których zidentyfikowano molekularnie gen *Pch1* lub *Pch2* oraz genotypy pszenżyta, u których nie wykazano molekularnie genów *Pch1* i *Pch2*, lecz wykazujące dobre cechy agronomiczne. Geny *Pch1* i *Pch2* identyfikowano molekularnie w mieszańcach wewnątrzgatunkowych uzyskanych w 2018 roku, gdzie do piramidyzacji genów *Pch1* i *Pch2* warunkujących podwyższoną odporność na łamliwość źdźbła u pszenicy wykorzystano źródła posiadające te geny - **temat badawczy nr 1**.

Materiał do identyfikacji molekularnej genów *Pch1* i *Pch2* oraz do oceny podatności na łamliwość źdźbła w testach inokulacyjnych siewkowych stanowiło 165 genotypów pszenicy ozimej o zróżnicowanym podłożu genetycznym, trzy odmiany kontrolne i odm. *Rendezvous* - wzorzec odporności. Doświadczenia inokulacyjne polowe wykonano na 113 genotypach pszenicy ozimej oraz odmianie *Rendezvous* – **temat badawczy nr 2 i 3**.

## Wyniki

### Temat badawczy 1

Krzyżowania wybranych na podstawie wcześniejszych badań genotypów pszenicy w celu piramidyzacji genów *Pch1* i *Pch2* i analiza molekularna obecności genów *Pch1* i/lub *Pch2* w mieszańcach wewnątrzgatunkowych uzyskanych w 2018 roku

**Celem tematu badawczego nr 1** było wytypowanie genotypów ze spiramidyzowanymi genami podwyższającymi odporność na łamliwość źdźbła w uzyskanych mieszańcach wewnątrzgatunkowych. Wykonano krzyżowania wewnątrzgatunkowe (3 kombinacje krzyżowkowe) form pszenicy o stwierdzonej wcześniej podwyższonej odporności na patogeny z rodzaju *Oculimacula* oraz form ze zidentyfikowanymi przy pomocy markerów molekularnych genami *Pch1* i *Pch2* oraz formy bez genów *Pch1* i *Pch2*. Uzyskano 182 ziarniaki mieszańcowe pszenicy ozimej. Przy pomocy markerów molekularnych dla genu *Pch1* i *Pch2* wytypowano 123 formy pszenicy ozimej (uzyskane w roku 2018) ze spiramidyzowanymi genami *Pch1* i *Pch2*, podwyższającymi odporność na patogeny z rodzaju *Oculimacula*.

## Temat badawczy 2

Analiza sprzężeń wybranych markerów SSR z locus genów *Pch1* i *Pch2*, a także badania izoenzymatyczne w celu określenia obecności endopeptydazy *EpD1b* sprzężonej z genem *Pch1*

**Celem badań w ramach tematu nr 2** była identyfikacja genu *Pch1* przy użyciu markera izoenzymatycznego w postaci endopeptydazy *EpD1b* oraz efektywnych markerów SSR dla genów *Pch1* i *Pch2* sprzężonych odpowiednio z chromosomami 7D i 7A. W badaniach wykorzystano cztery markery molekularne i jeden izoenzymatyczny (tab. 1).

Tabela 1. Markery wykorzystane do identyfikacji molekularnej genów *Pch1* i *Pch2*

Lp.	Marker	Gen	Lokalizacja w chromosomie
1	<i>EpD1b</i> (izoenzymatyczny)	<i>Pch1</i>	7D
2	<i>XustSSR2001-7DL</i>	<i>Pch1</i>	7D
3	<i>Xorw1</i>	<i>Pch1</i>	7D
4	<i>Xcfa2040</i>	<i>Pch2</i>	7A
5	<i>Xwmc525</i>	<i>Pch2</i>	7A

Geny *Pch1* i *Pch2*, takie same jak u wzorcowej, odpornej odmiany *Rendezvous* (identyfikowane z użyciem wymienionych w projekcie markerów dla genów *Pch1* i *Pch2*) stwierdzono u sześciu genotypów pszenicy ozimej. W 19 genotypach pszenicy ozimej z użyciem markera izoenzymatycznego i markera molekularnego *Xorw1* zidentyfikowano gen *Pch1*. U tych genotypów zidentyfikowano również gen *Pch2*, z wykorzystaniem markerów *Xwmc525* i *Xcfa2040*. U siedmiu linii pszenicy ozimej zidentyfikowano gen *Pch1* z użyciem markera izoenzymatycznego oraz dwóch markerów molekularnych *XustSSR2001-7DL* i *Xorw1*. Nie stwierdzono natomiast genu

*Pch2*, który w mniejszym stopniu warunkuje odporność na łamliwość źdźbła. W dwóch liniach pszenicy ozimej zidentyfikowano tylko gen *Pch1* z użyciem markera izoenzymatycznego oraz jednego markera *Xorw1*. Nie identyfikowano markera *XustSSR2001-7DL*, gdzie najprawdopodobniej, doszło do przełamania sprzężenia między locus *Pch1*, a locus markera *XustSSR2001-7DL*. Natomiast u 99 linii pszenicy ozimej stwierdzono tylko gen *Pch2* na podstawie obecności markerów molekularnych *Xwmc525* i *Xcfa2040*.

### **Temat badawczy 3**

Ocena podatności pszenicy na łamliwość źdźbła w testach inokulacyjnych siewkowych (doświadczenia fitotronowe) i polowych (doświadczenie polowe, inokulacyjne w Kopaszewie). Analiza korelacji między parametrami struktury plonu badanych genotypów pszenicy, a ich odpornością na łamliwość podstawy źdźbła. Wybór genotypów cechujących się występowaniem genów *Pch1* i *Pch2*

#### **Cele tematu badawczego 3:**

- ocena porażenia siewek pszenicy przez sprawcę łamliwości źdźbła po indukowanej inokulacji siewek zawiesiną grzybni i zarodników *O. yallundae* i *O. acuformis* (doświadczenie w fitotronie w IGR PAN) z wykorzystaniem markerów fenotypowych.
- ocena porażenia przez grzyby z rodzaju *Oculimacula* dojrzałych źdźbeł badanych genotypów pszenicy ozimej w polowym teście inokulacyjnym z użyciem zawiesiny grzybni i zarodników *O. yallundae* i *O. acuformis*) – doświadczenie w Kopaszewie.
- analiza elementów struktury plonu i korelowanie z obecnością genów *Pch1* i *Pch2*

Obserwowano brak naturalnego porażenia grzybami z rodzaju *Oculimacula* w czterech z pięciu wybranych lokalizacji Polski. W dużej mierze wynikało to z warunków pogodowych panujących przez cały sezon wegetacyjny, które uniemożliwiły rozwój grzybów z rodzaju *Oculimacula*. Najmniejsze porażenie siewek stwierdzono u genotypów wykazujących obecność genu *Pch1* oraz *Pch1* i *Pch2*, a najwyższe dla genotypów, u których nie stwierdzono genów *Pch1* i *Pch2*. Na podstawie wyników uzyskanych w ramach inokulacyjnego testu polowego stwierdzono, że genotypy pszenicy ozimej posiadające gen *Pch1* oraz *Pch1* i *Pch2* cechują się dużo niższą wartością wskaźnika porażenia źdźbła oraz procentowego udziału źdźbeł porażonych (ogółem) względem genotypów, u których nie stwierdzono genów *Pch1* i *Pch2*. Wykazano, że obecność genów *Pch1* i *Pch2* lub ich brak nie wpływała istotnie na plon ziarna (z poletka) oraz masę tysiąca ziarniaków.

## Wnioski

- Z trzech kombinacji krzyżówkowych związanych z piramidyzacją genów *Pch1* i *Pch2* uzyskano 182 ziarniaki mieszańcowe pszenicy ozimej - **temat badawczy 1**.
- Przy pomocy markerów molekularnych dla genu *Pch1* i *Pch2* wytypowano 123 formy pszenicy ozimej (uzyskane w roku 2018) ze spiramidyzowanymi genami *Pch1* i *Pch2*, podwyższającymi odporność na patogeny z rodzaju *Oculimacula* - **temat badawczy 1**.
- U odmiany odpornej *Rendezvous*, a także u sześciu genotypów pszenicy stwierdzono przy pomocy markera izoenzymatycznego *EpD1b* i markerów molekularnych *XustSSR2001-7DL*, *Xorw1* obecność genu *Pch1*, a za pomocą pozostałych markerów molekularnych *Xcfa2040*, *Xwmc525* obecność genu *Pch2* - **temat badawczy nr 2**.
- W 19 genotypach pszenicy ozimej z użyciem markera izoenzymatycznego i markera molekularnego *Xorw1* zidentyfikowano gen *Pch1*. Nie zidentyfikowano markera *XustSSR2001-7DL*, gdzie najprawdopodobniej, doszło do przełamania sprzężenia między locus *Pch1*, a locus markera *XustSSR2001-7DL*. Genotypy te posiadały również gen *Pch2*, ze względu na obecność markerów *Xwmc525* i *Xcfa2040* - **temat badawczy nr 2**.
- U 99 genotypów pszenicy stwierdzono tylko gen *Pch2* - **temat badawczy nr 2**.
- Najmniejsze porażenie siewek stwierdzono u genotypów posiadających gen *Pch1* oraz oba geny (*Pch1* i *Pch2*), a najwyższe dla genotypów, u których nie stwierdzono genów *Pch1* i *Pch2* - **temat badawczy nr 3**.
- Genotypy posiadające tylko gen *Pch1* wykazywały brak porażania – śr. 0,00, w porównaniu do genotypów posiadających tylko gen *Pch2* - średnio 0,927. Taka sama zależność obserwowana była dla inokulacyjnego testu polowego, gdzie współczynnik porażenia K dla genotypów z *Pch1* wynosił śr. 0,00, a dla genotypów z *Pch2* średnio 2,24 - **temat badawczy nr 3**.
- Wykazano, że obecność genów *Pch1* i *Pch2* lub ich brak nie wpływała istotnie na plon ziarna (z poletka) i masę tysiąca ziarniaków- **temat badawczy 3**.