

**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 (Znak sprawy: KS.zb.802.2.2020), **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

## **WPROWADZENIE**

**Łamliwość podstawy źdźbła** – choroba pszenicy uprawnej (*Triticum aestivum* L.) i innych zbóż, powodowana przez dwa grzyby z rodzaju *Oculimacula*. Pojawia się szczególnie podczas łagodnych zim i chłodnych wiosen. Podstawa źdźbła próchnieje i powoduje jego łamliwość, co może prowadzić do ubytku plonu nawet do 50%. Zidentyfikowano dwa geny warunkujące odporność. Gen *Pch1* - najbardziej efektywny, który znacząco redukuje skalę porażenia i gen *Pch2*, który w mniejszym stopniu warunkuje odporność na łamliwość źdźbła i może być traktowany jako dodatkowe źródło odporności.

## **CELE BADAŃ**

1. **Celem tematu badawczego nr 1** było wytypowanie genotypów ze spiramidyzowanymi genami podwyższającymi odporność na łamliwość źdźbła w uzyskanych mieszańcach wewnątrzgatunkowych.
2. **Celem badań w ramach tematu badawczego nr 2** była identyfikacja genu *Pch1* przy użyciu markera izoenzymatycznego oraz efektywnych markerów dla genów *Pch1* i *Pch2*.  
Konfrontacja wyników uzyskanych w temacie badawczym nr 2 z wynikami testów inokulacyjnych (**temat numer 3**) w celu określenia efektywności wybranych markerów w

procesie określania obecności genów warunkujących odporność na łamliwość podstawy źdźbła.

### 3. Cele tematu numer 3:

- wykorzystanie markerów fenotypowych do oceny porażenia przez sprawcę łamliwości źdźbła siewek badanych genotypów pszenicy ozimej po indukowanej inokulacji siewek zawiesiną grzybni i zarodników *O. yallundae* i *O. acuformis* w doświadczeniu prowadzonym w fitotronie w IGR PAN,
- ocena porażenia przez grzyby z rodzaju *Oculimacula* dojrzałych źdźbeł badanych genotypów pszenicy ozimej w polowym teście inokulacyjnym (w fazie 1-2 kolanka) (z użyciem zawiesiny grzybni i zarodników *O. yallundae* i *O. acuformis* – poletka w Kopaszewie),
- analiza elementów struktury plonu i korelowanie z obecnością genów *Pch1* i *Pch2*.

## MATERIAŁ I METODY

W celu uzyskania genotypów ze spiramidyzowanymi genami odporności na grzyby z rodzaju *Oculimacula* przeprowadzono trzy kombinacje krzyżowań (temat **badawczy nr 1**).

Do krzyżowań wykorzystano komponenty krzyżówkowe:

- cechujące się obecnością genów *Pch1* i *Pch2* zidentyfikowanych przy pomocy markerów molekularnych oraz markera izoenzymatycznego;
- wykazujące podwyższoną odporność na łamliwość źdźbła;
- genotypy, u których zidentyfikowano molekularnie gen *Pch1* lub *Pch2*;
- genotypy pszenicy wykazujące dobre cechy agronomiczne, u których nie wykazano molekularnie genów *Pch1* i *Pch2*.

Badania molekularne i izoenzymatyczne obejmowały **174 genotypów** pszenicy ozimej o zróżnicowanym podłożu genetycznym, 3 wysokoplonujące odmiany (Artist, Kilimanjaro, Patras) oraz odmianę Rendezvous (kontrola pozytywna). W badaniach wykorzystano **5 markerów**:

- trzy dla genu *Pch1* warunkującego odporność rośliny w stadium dojrzewania (w tym jeden marker (izoenzymatyczny - *EpD1b*) i dwa markery SSR: *Xust2001* i *Xorw1*)
- dwa związane z locus genu *Pch2*: *Xwmc525* i *Xcfa2040* – **temat badawczy nr 2**

Ocenę podatności na grzyby z rodzaju *Oculimacula* w testach inokulacyjnych siewkowych (fitotronowych) i polowych prowadzono na 178 genotypach pszenicy ozimej o zróżnicowanym podłożu genetycznym, trzech odmianach kontrolnych i odm. Rendezvous - wzorzec odporności **temat badawczy nr 3**.

## WYNIKI I WNIOSKI

### Temat badawczy 1:

**Krzyżowania wybranych na podstawie wcześniejszych badań genotypów pszenicy w celu piramidyzacji genów *Pch1* i *Pch2* i analiza molekularna obecności w mieszańcach z 2019 roku genów *Pch1* i/lub *Pch2*.**

We wcześniejszych badaniach prowadzonych w tym projekcie 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*. Dlatego w 2019 roku założono piramidyzację genów *Pch1* i *Pch2* w wybranych genotypach pszenicy ozimej.

Do piramidyzacji genów *Pch1* i *Pch2* wykorzystano kilka komponentów krzyżówkowych:

- posiadających zidentyfikowane przy pomocy markerów molekularnych i markera izoenzymatycznego dwa geny związane z odpornością na te patogeny (*Pch1* i *Pch2*),
- genotypy, u których zidentyfikowano molekularnie gen *Pch1* lub *Pch2*
- genotypy pszenicy, u których nie wykazano molekularnie genów *Pch1* i *Pch2*, lecz wykazujących dobre cechy agronomiczne.

W przeprowadzonych analizach molekularnych związanych z identyfikacją genu *Pch1* u roślin mieszańcowych wykorzystano markery molekularne *Xust2001-7D* i *Xorw1*, który wykazuje pełne sprzężenie z genem *Pch1*. W analizie korelacji występujących pomiędzy znanymi markerami określono, że marker *Xorw1* w pełni pozwala na identyfikację genu *Pch1* u roślin, które wcześniej analizowano za pomocą markera *Ep-D1*, co wskazuje na pełną korelację obydwu markerów.

W 32 formach krzyżówkowych otrzymanych z przekrzyżowań w 2019 roku, zidentyfikowano molekularnie geny *Pch1* i *Pch2* z wykorzystaniem tych markerów.

Drugim zidentyfikowanym genem był *Pch2*, który w mniejszym stopniu warunkuje odporność na łamliwość źdźbła. Do identyfikacji genu *Pch2* wybrano marker *Xwmc525*.

Przy wykorzystaniu markerów molekularnych *Xust2001-7DL*, *Xorw1* (*Pch1*) i *Xwmc525* (*Pch2*) przeanalizowano genotypy rodzicielskie, jako formy kontrolne w celu potwierdzenia obecności genów *Pch1* i *Pch2* i zbadano rośliny mieszańcowe uzyskane w wyniku krzyżowań w roku 2019. Pośród wszystkich analizowanych genotypów mieszańcowych 5 z nich cechowało się obecnością obydwu genów warunkujących odporność na łamliwość podstawy źdźbła: *Pch1* i *Pch2*, co wskazuje na piramidyzację tych genów odporności w badanych formach. Rośliny ze spiramidyzowanymi

genami odporności samozapylono, zebrano ziarniaki. Zostały one zgromadzone w banku genów IGR PAN i będą mogły być wykorzystane jako źródła odporności na tę chorobę lub do przekrzyżowań. Po rozmnożeniu i wytworzeniu odpowiedniej liczby ziarniaków będą mogły być badane pod kątem elementów struktury plonu jak i odporności w testach inokulacyjnych fitotronowych i polowych. Materiał ze spiramidyzowanymi genami *Pch1* i *Pch2* poszerzy również pożądaną zmienność genetyczną pszenicy.

Do nowych krzyżowań prowadzonych w 2020 r. wybrano również genotypy pszenicy ozimej, u których w badaniach prowadzonych w latach wcześniejszych, stwierdzono podwyższoną odporność na patogeny z rodzaju *Oculimacula* w wyniku testów inokulacyjnych i zidentyfikowano u nich przy pomocy markerów molekularnych i markera izoenzymatycznego geny związane z odpornością na te patogeny: gen *Pch1* (9 linii) lub gen *Pch2* (10 linii oraz odm. Patras i Artist) oraz 10 linii wraz z odm. Kometa oraz Rendezvous, u których stwierdzono jednocześnie oba geny *Pch1* i *Pch2*. Krzyżowania wykonano w szklarniach Instytutu Genetyki Roślin PAN w Poznaniu. Uzyskano 648 ziarniaków mieszańcowych. .

### **Podsumowanie dla tematu nr 1**

1. Przy pomocy identyfikacji molekularnej z użyciem markerów molekularnych dla genu *Pch1* i *Pch2* wytypowano 5 form pszenicy ozimej (uzyskane w roku 2019) ze spiramidyzowanymi genami *Pch1* i *Pch2*, podwyższającymi odporność na patogeny z rodzaju *Oculimacula* (sprawcy choroby grzybowej zwanej łamliwością źdźbła).
2. Przeprowadzenie w 2020 r. nowych krzyżowań wewnątrzgatunkowych pszenicy, w celu piramidyzacji genów *Pch1* i *Pch2*, pozwoliło na uzyskanie kolejnych 648 ziarniaków mieszańcowych pszenicy ozimej.

### **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*.**

W badaniach genów odporności na grzyby z rodzaju *Oculimacula* wykorzystano 5 markerów. Trzy dla genu *Pch1* warunkującego odporność rośliny w stadium dojrzewania, w tym jeden marker (izoenzymatyczny - *EpD1b*) i dwa markery SSR: *Xust2001* i *Xorw1* oraz dwa związane z locus genu *Pch2*: *Xwmc525* i *Xcfa2040*. W badaniach analizowano 5 roślin z każdego badanego genotypu.

Badania w temacie nr 2 prowadzone były na 177 liniach/odmianach pszenicy ozimej uzyskanych z przekrzyżowań o różnym podłożu genetycznym oraz formie kontrolnej Rendezvous, która stanowiła kontrolę pozytywną dla obecności genów warunkujących odporność na łamliwość źdźbła (*Pch1* i *Pch2*) oraz 9 liniach wzorcach obecności genu *Pch2*.

Obserwowane u badanych 177 obiektów zymogramy można przypisać do 12 klas. Typ pierwszy reprezentowany przez odmianę „Randezvous”, a także 18 badanych genotypów charakteryzował się trzema prążkami dla *Ep-D1b*, które identyfikują formy odporne na infekcję grzybową powodowaną przez *Oculimacula yallundae* i *Oculimacula acuformis*. Stanowiły one 10%. Jak wynika z danych literaturowych tylko obecność prążków dla *Ep-D1b* przy jednoczesnym braku prążków *Ep-D1a* gwarantuje odporność na łamliwość źdźbła.

#### Identyfikacja markerów SSR: *XustSSR2001-7DL*, *Xorw1*, *Xcfa2040*, *Xwmc525*

Geny odporności na łamliwość podstawy źdźbła analizowano przy pomocy markerów SSR sprzężonych z genami *Pch1* i *Pch2* oraz polegały na: amplifikacji fragmentów DNA za pomocą specyficznych starterów metodą PCR, rozdziale elektroforetycznym produktów amplifikacji w żelu agarozowym (2-3%) oraz wizualizacji z wykorzystaniem systemu do archiwizacji.

W wyniku amplifikacji markera *XustSSR2001-7DL* uzyskano dwa produkty w postaci prążków o wielkości 240 par zasad (pz) oraz 220 pz. Dzięki reakcji PCR przeprowadzonej z wykorzystaniem DNA kontrolnej odmiany ‘Randezvous’ otrzymano produkt o wielkości 240 pz. W analizach poszczególnych genotypów obserwowano występowanie pojedynczych produktów (220 pz lub 240 pz) oraz układu heterozygotycznego (220 pz + 240 pz). U 8 genotypów stwierdzono produkt o wielkości 240 pz (taki jak u wzorcowej odmiany Rendezvous).

*Xorw1* to nowo opracowany marker, który znajduje się w bliższej odległości od locus *Ep-D1* i genu *Pch1* w porównaniu do markera *XustSSR2001-7DL*. Scharakteryzowano 3 produkty amplifikacji markera *Xorw1* o wielkości 150, 160 i 170 pz. Odporna odmiana wzorcowa Rendezvous wykazywała obecność produktu o długości 160 pz i taki układ stwierdzono u 23 badanych genotypów pszenicy ozimej.

Marker *Xwmc525* zlokalizowany jest w obrębie locus *Pch2*. U odpornej odmiany Rendezvous stwierdzono produkt amplifikacji markera *Xwmc525* o długości 180 pz. Takie produkty amplifikacji stwierdzono również u 78 badanych genotypów.

Marker *Xcfa2040* podobnie jak marker *Xwmc525* zlokalizowany jest w obrębie locus *Pch2* (odległość 1.3 cM od *Xwmc525*). U odpornej odmiany Rendezvous stwierdzono produkt amplifikacji tego markera o długości 286 pz. Takie produkty amplifikacji stwierdzono również u 78

badanych genotypów. U genotypów, u których stwierdzono produkt właściwy dla markera *Xcfa2040* stwierdzono również obecność produktu właściwego dla markera *Xwmc525*, co pozwala na prawidłową identyfikację genu *Pch2*.

### **Podsumowanie dla tematu nr 2**

1. U trzech genotypów pszenicy ozimej (SMH 39, KBP 18 61, KBP 18 33) zidentyfikowano geny odporności *Pch1* i *Pch2*, identyczne jak u odmiany wzorcowej *Rendezvous*, przy pomocy czterech markerów wymienionych w projekcie: *XustSSR2001-7DL*, *Xorw1* (*Pch1*), *Xcfa2040*, *Xwmc525* (*Pch2*).
2. 11 genotypów pszenicy ozimej (KBP 18 15, KBP 18 14, STH 8214, STH 8215, KBP 18 42, SMH 80, STH 6207, DD 998/16, STH 8274, DD 240/16, STHD 85/20) charakteryzowała obecność genu *Pch1* zidentyfikowanego z użyciem markera izoenzymatycznego oraz markera molekularnego *Xorw1*. Brak potwierdzenia obecności genu *Pch1* przy pomocy markera *Xust2001*, wynika najprawdopodobniej z przełamania sprzężenia między locus markera, a locus genu *Pch1* na jednym lub dwóch chromosomach homologicznych 7D. U sześciu z nich zidentyfikowano również gen *Pch2*, ze względu na obecność markerów *Xwmc525* i *Xcfa2040*.
3. U czterech linii pszenicy ozimej (NAD\_17063, SMH 2, SMH 3, AND\_1113/16) zidentyfikowano gen *Pch1* z użyciem markera izoenzymatycznego oraz dwóch markerów molekularnych *Xust2001* i *Xorw1*. Nie stwierdzono natomiast genu *Pch2*. Jego efektywność zapobiegania infekcji przez grzyby z rodzaju *Oculimacula* jest mniejsza od genu *Pch1* i jest to tylko gen pomocniczy.
4. U 69 linii pszenicy ozimej stwierdzono tylko gen *Pch2* na podstawie obecności markerów molekularnych *Xwmc525* i *Xcfa2040*.
5. U 90 linii nie zidentyfikowano żadnego z dwóch analizowanych genów (*Pch1*, *Pch2*) odporności na łamliwość podstawy źdźbła.

### **Temat badawczy 3**

**Ocena podatności pszenicy na łamliwość źdźbła poprzez testy inokulacyjne siewkowe i polowe oraz określenie naturalnego porażenia badanych genotypów w kilku lokalizacjach.**

**Analiza korelacji między elementami struktury plonu, a obecnością genu/genów *Pch1* i *Pch2*.**

**Wybór genotypów cechujących się występowaniem genów *Pch1* i *Pch2*.**

*Testy inokulacyjne siewkowe*

178 genotypów pszenicy ozimej badano pod względem porażenia siewki przez grzyby z rodzaju *Oculimacula* według skali przygotowanej przez Zespół 2019 roku.

Siewki przyporządkowano do pięciu klas porażenia:

- W klasie I znalazły się 8 genotypów charakteryzujące się brakiem objawów porażenia w tym odmiana odporna Rendezvous.
- Do klasy II, charakteryzującej genotypy o stopniu porażenia w zakresie 0,1-1, zakwalifikowano 54 genotypów.
- Klasa III charakteryzowała rośliny o porażeniu w zakresie 1,1-2,0 (95 genotypy).
- Klasa IV- 16 genotypów o porażeniu od 2,1-3,0.
- Klasa V- obejmowała 5 genotyp o porażeniu od 3,1 do 4,0.

Najmniejsze porażenie siewek stwierdzono u genotypów posiadających geny *Pch1* i *Pch2*, a najwyższe dla genotypów, u których nie stwierdzono genu *Pch1*.

#### *Testy inokulacyjne polowe*

Na badanych próbach roślin określono procentowy udział źdźbeł porażonych (ogółem) oraz obliczono wskaźnik porażenia źdźbła przez grzyby z rodzaju *Oculimacula*.

- Dla genotypów, u których wykazano gen *Pch1* średni współczynnik porażenia K był najniższy i wynosił 5,4.
- Dla genotypów, z genami *Pch1* i *Pch2* współczynnik K wynosił 5,69.
- Genotypy, u których stwierdzono obecność genu *Pch2* wykazywały współczynnik porażenia K na poziomie 20,69.
- Genotypy, u których nie stwierdzono genu *Pch1* i *Pch2* wykazywały najwyższy współczynnik porażenia K=22,13.

#### *Testy inokulacyjne polowe*

W ocenianym sezonie wegetacyjnym panowały dogodne warunki do infekcji źdźbeł pszenicy ozimej przez grzyby rodzaju *Oculimacula*. Wykonane zakażenie mieszaniną zarodników i grzybni gatunków *Oculimacula aciformis* i *Oculimacula yallundae* sprzyjało porażeniu przez wymienionych sprawców, co znalazło odzwierciedlenie dla większości badanych obiektów (rodów) w wielkości wskaźnika K, która wahała się w zależności od obiektu i lokalizacji doświadczenia od 0 do 50. Te badane odmiany i rody, które mają niski wskaźnik porażenia K mogą być przydatne w dalszej hodowli. Za niski wskaźnik w obecnym sezonie można umownie przyjąć wartość wskaźnika K od 0 – 8. Tak niski wskaźnik może wskazywać, że powodowane jest to przez obecność genu lub genów odporności *Pch* w badanym materiale.

#### *Analizy cech fizjologicznych*

W ramach tematu wykonane zostały analizy korelacji pomiędzy elementami struktury plonu

w postaci masy tysiąca nasion (MTZ) i plonu z poletka (Plon) w porównaniu do współczynnika porażenia (K) oraz średniego procentu porażonych źdźbeł (śr. % porażenia). Największą korelację uzyskano pomiędzy współczynnikiem K, a średnim procentem porażenia źdźbeł. Istotnie statystycznie były również zależności pomiędzy plonem, a współczynnikiem K oraz plonem, a średnim procentem porażenia źdźbeł. Współczynniki korelacji były jednakże bardzo niskie. Pokazuje to, że genotypy bardziej podatne (bez genów odporności) charakteryzowały się wyższym plonem ziarna.

W celu wykazania, czy obecność genów *Pch1* i *Pch2* warunkujących odporność grzyby z rodzaju *Oculimacula* w badanych genotypach pszenicy ozimej ma istotne znaczenie dla wielkości komponentów struktury plonu, wykonano analizę wariancji (ANOVA). Wykazano, że obecność genów *Pch1* i *Pch2* wpływała na plon ziarna (z poletka). Plon był najniższy w obecności obu genów, najwyższy w obecności genu *Pch2* lub przy braku genów. Jednakże różnice nie były istotne statystycznie.

Obserwowano również brak istotnego wpływu obecności genów *Pch1*, *Pch2* lub ich braku na masę tysiąca ziarniaków (MTZ). U genotypów z genem *Pch2* stwierdzono nieznacznie wyższe wartości MTZ, niż u pozostałych grup genotypów.

### **Podsumowanie dla tematu nr 3**

1. Najmniejsze porażenie siewek stwierdzono u genotypów posiadających gen *Pch1* oraz *Pch1* i *Pch2*, a najwyższe dla genotypów, u których nie stwierdzono genów *Pch1* i *Pch2* oraz genotypów z genem *Pch2*.
2. 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* lub genu *Pch2*.
3. Wykazano, że obecność genów *Pch1* i *Pch2* lub ich brak nie wpływała istotnie na plon ziarna (z poletka) oraz masę tysiąca ziarniaków (MTZ) (analiza wariancji ANOVA).
4. Największą korelację uzyskano pomiędzy współczynnikiem K, a średnim procentem porażenia źdźbeł.