

Sprawozdanie merytoryczne z wykonania zadania nr 2: „Wykorzystanie markerów molekularnych i fenotypowych do identyfikacji genów odporności pszenicy na łamliwość źdźbła powodowaną przez *Oculimacula yallundae* i *Oculimacula aciformis*”, w 2017 roku.

*Halina Wiśniewska, Michał Kwiatek, Magdalena Gawłowska, Marek Korbas, Maciej Majka, Jolanta Belter oraz 2 pracowników pomocniczych*

## WPROWADZENIE

Łamliwość podstawy źdźbła to jedna z najważniejszych chorób pszenicy uprawnej (*Triticum aestivum* L.) oraz innych zbóż. Powodowana jest przez dwa grzyby patogeniczne *Oculimacula yallundae* i *Oculimacula aciformis* (wcześniej klasyfikowane jako jeden gatunek *Cercospora herpotrichoides*, a później jako *Pseudocercospora herpotrichoides*). Szczególnie podczas łagodnych zim i chłodnych wiosen, na roślinach pszenicy, na zewnętrznych pochwach liści występują bursztynowo-brązowe plamy będące objawem infekcji grzybów patogenicznych. W trakcie wegetacji patogen z pochw liściowych przedostaje się na podstawy źdźbła, gdzie na obszarze plam w źdźble tworzy się watowata grzybnia. Skutkiem tego podstawa źdźbła próchnieje i powoduje łamliwość źdźbła, co może powodować ubytek plonu nawet do 50%. Celem projektu było opracowanie narzędzi genetycznych, które pozwoliłyby wprowadzić geny warunkujące odporność na łamliwość podstawy źdźbła do odmian pszenicy uprawnej. Istnieje kilka źródeł odporności na łamliwość podstawy źdźbła, lecz jak dotąd tylko dwa geny, *Pch1* i *Pch2* zostały przeniesione do pszenicy uprawnej i warunkują odporność. Gen *Pch1* jest najbardziej efektywny. Został zidentyfikowany w *Aegilops ventricosa* [ $2n = 4x = 28, D^vD^vM^vM^v$ ] i translokowany do długiego ramienia chromosomu 7D heksaploidalnej pszenicy (Maia et al. 1967). Nie zapewnia on całkowitej odporności rośliny, jednakże znacząco redukuje skalę porażenia przez grzyby patogeniczne oraz ich penetrację podstawy źdźbła. Dotychczas na rynek wprowadzono kilka odmian posiadających gen *Pch1*, jednakże ich wartość technologiczna znacząco odbiega od odmian wzorcowych pszenicy, gdyż segment chromosomu *Ae. ventricosa* z locus genu *Pch1*, translokowany na chromosom 7DL pszenicy wnosi również wiele cech niekorzystnych z punktu widzenia agronomii. Drugim genem, który w mniejszym stopniu warunkuje odporność na łamliwość źdźbła jest *Pch2* zlokalizowany na dłuższym ramieniu chromosomu 7A pszenicy odmiany „Capelle-Deprez”, jednakże nie jest on homeologiem genu *Pch1*, o podobnej lokalizacji na chromosomie 7D. Warunkuje on odporność w stadium siewki, jednak jego efektywność zapobiegania infekcji przez grzyby patogeniczne z rodzaju *Oculimacula* jest mniejsza od genu *Pch1*. Z tego względu gen *Pch2* może być traktowany jako dodatkowe źródło odporności pszenicy na łamliwość podstawy źdźbła.

## MATERIAŁ BADAWCZY I CEL BADAŃ

**Materiał badawczy** stanowiło 150 genotypów pszenicy o zróżnicowanym podłożu genetycznym oraz odmiana pszenicy ozimej „Rendezvous”- użyta jako wzorzec odporności na łamliwość podstawy źdźbła.

### Tematy badawcze:

1. Krzyżowania wybranych genotypów celem piramidyacji genów *Pch1* i *Pch2*.
2. Wytworzenie skutecznego systemu markerów SSR do identyfikacji spiramidyzowanych genów *Pch1* i *Pch2*, badania izoenzymatyczne w celu określenia obecności endopeptydazy *EpD1b* sprzężonej z genem *Pch1*.
3. Analiza wytworzonych mieszańców (w liczbie około 150) za pomocą doświadczenia inokulacyjnego *in vivo* (zbiór materiału roślinnego inokulowanego oraz ocena porażenia przez *O. aciformis* i *O. yallundae* w celu weryfikacji ekspresji genów *Pch1* i *Pch2*, analiza korelacji między cechami fenotypowymi roślin a odpornością na łamliwość źdźbła. Badanie podatności wytworzonych mieszańców na poletkach w miejscach, gdzie występuje naturalne porażenie przez *O. aciformis* i *O. yallundae* i wybór genotypów cechujących się występowaniem genów *Pch1* i *Pch2*.

### **Cel badań:**

1. Piramidyzacja genów odporności na łamliwość źdźbła u pszenicy zwyczajnej poprzez krzyżowania wewnątrzgatunkowe oraz międzyrodzajowe (oddalone).
2. Wybór efektywnych markerów dla genów *Pch1* i *Pch2* spośród dostępnych markerów SSR sprzężonych z chromosomami - odpowiednio 7D i 7A, identyfikowanie obecności genu *Pch1* przy użyciu markera izoenzymatycznego w postaci endopeptydazy *EpD1b* i markerów molekularnych (*Xust2001-7DL*, *Xorw1*, *Xorw5*) oraz genu *Pch2* przy użyciu markera molekularnego - *Xwmc525* u genotypów pszenicy ozimej i form mieszańcowych oraz konfrontowanie wyników uzyskanych w temacie badawczym nr 2 z wynikami testów inokulacyjnych (temat badawczy nr 3) w celu określenia efektywności wybranych markerów w procesie określania obecności genów warunkujących odporność na łamliwość podstawy źdźbła.
3. Wykorzystanie markerów fenotypowych do oceny porażenia genotypów pszenicy ozimej przez sprawcę łamliwości źdźbła zbóż po indukowanej inokulacji zawieszoną grzybną i zarodników *Oculimacula yallundae* i *O. aciformis* oraz ocena naturalnego porażenia przez sprawców łamliwości źdźbła poprzez analizę wylegania uzyskanych genotypów pszenicy ozimej zbóż zróżnicowanych pod względem warunków klimatycznych w lokalizacjach na terenie Polski.

### **Metodyka badań:**

#### Analiza izoenzymów

Do badań pobrano pięć roślin z każdego genotypu. Analizę polimorfizmu allozymów przeprowadzono w ekstraktach z 2 cm<sup>2</sup> świeżej tkanki liściowej. Izoenzymy analizowano za pomocą elektroforezy horyzontalnej na 10% żelu skrobiowym.

#### Analizy markerów SSR

Do badań pobierano pięć roślin z każdego genotypu. Izolację genomowego DNA analizowanych genotypów przeprowadzono przy użyciu metody CTAB. Analiza molekularna pod względem obecności markerów *Xust2001-7DL*, *Xorw1*, *Xorw5* (dla genu *Pch1*), *Xwmc525* (dla genu *Pch2*) polegała na:

- amplifikacji fragmentów DNA za pomocą specyficznych starterów metodą PCR,
- rozdziale elektroforetycznym produktów amplifikacji na żelu agarozowym (2-3%).

#### Testy inokulacyjne siewkowe

Inokulowano 3-tygodniowe rośliny, zastosowano inokulum o stężeniu 4,0 mln zarodników w 1 ml wody. Przez okres 6-8 tygodni rośliny podlewano w celu uzyskania wysokiej wilgotności właściwej dla infekcji patogena i utrzymywano w temperaturze do 10°C. Po tym czasie wykonano wizualną ocenę porażenia siewek.

#### Testy inokulacyjne polowe

W fazie 1-2 kolanka (BBCH 31-32, druga dekada kwietnia 2017 roku) zakażano suspensją mieszaniny zarodników i grzybni *Oculimacula yallundae* i *O. aciformis* w proporcji 1:1 celem oceny podatności badanych genotypów na porażenie przez *Oculimacula yallundae* i *O. aciformis* w fazie rośliny dojrzałej. Stężenie inokulum wynosiło 4,0 mln zarodników w 1 ml.

#### Obserwacje naturalnego porażenia

Obserwacje naturalnego porażenia *Oculimacula yallundae* i *O. aciformis* wywołującym łamliwość podstawy źdźbła przeprowadzono w czterech lokalizacjach na terenie Polski, tj.: Smolice, Kobierzyce, Strzelce i Nagradowice.

#### Obserwacje temperatury i opadów

W w/w lokalizacjach przeprowadzono obserwacje warunków pogodowych panujących w trakcie trwania sezonu wegetacyjnego. W tym celu ewidencjonowano średnie wartości temperatur i sum opadów dla danych miesięcy sezonu wegetacyjnego.

#### Porównanie analiz identyfikacji markerów z wynikami testów inokulacyjnych

Na podstawie wyników laboratoryjnych oraz wyników testów inokulacyjnych dokonano wyboru form, które były odporne na *Oculimacula yallundae* i *O. aciformis*. Genotypy te zostały przekazane do banku genów IGR PAN i mogą być wykorzystane jako źródła odporności na *Oculimacula* ssp.

### Wpływ cech fenotypowych i fizjologicznych na reakcję i na porażenie przez *Oculimacula yallundae* i *O. acuformis*

W celu wykazania, czy obecność genów *Pch1* i *Pch2* warunkujących odporność na łamliwość podstawy źdźbła w badanych genotypach pszenicy ozimej ma istotne znaczenie dla wielkości komponentów struktury polonu, wykonano analizę wariancji (ANOVA).

## WYNIKI

### **Temat badawczy nr 1. Krzyżowania wybranych genotypów celem piramidyzacji genów *Pch1* i *Pch2*.**

#### Wyniki:

Do krzyżowań wykorzystano źródła mające najbardziej efektywne geny *Pch1* i *Pch2* - formy o dobrych wartościach technologicznych: odmianę Patras (z genem *Pch2*) oraz linię SMH 9204 (zawierająca geny *Pch1*, *Pch2* i *QPch*). Krzyżowania wykonano w szklarniach Instytutu Genetyki Roślin PAN w Poznaniu. Uzyskano 35 ziarniaków z przekrzyżowania linii SMH 9204 z odm. Patras.

Wykonano również krzyżowania oddalone pomiędzy odmianą Patras (stwierdzona obecność genu *Pch2*) a formą mieszańcową (*Ae. ventricosa* × *T. persicum*) - (posiadającą gen *Pch1*) uzyskaną w roku 2016, mającą bardzo zbity kłos. Krzyżowania oddalone były mało efektywne i uzyskano tylko 3 ziarniaki.

#### Dyskusja:

Mieszańce z genami odporności na łamliwość podstawy źdźbła próbowano uzyskać wykorzystując krzyżowania wewnątrzgatunkowe i międzyrodzajowe. W ramach krzyżowań wewnątrzgatunkowych mających na celu piramidyzację genów warunkujących odporność na łamliwość podstawy źdźbła wytworzono mieszańce pszenicy ozimej ze skrzyżowania linii SMH 9204 wyróżniającymi się pod względem cech struktury plonu, cech technologicznych oraz odporności na patogeny z rodzaju *Oculimacula* (zawierającą geny *Pch1*, *Pch2* i *QPch*) i odmianę Patras o dobrych cechach technologicznych, charakteryzująca się brakiem genu *Pch1*, lecz ze stwierdzonym w ramach badań w tym projekcie w roku 2016 genem *Pch2* warunkującym odporność w stadium siewki.

Przeprowadzono również krzyżowania międzyrodzajowe z wykorzystaniem formy mieszańcowej (*Ae. ventricosa* × *T. persicum*). Efektywność uzyskania mieszańcowych ziarniaków była znacznie niższa niż przy krzyżowaniach wewnątrzgatunkowych.

Krzyżowania wewnątrzgatunkowe z wykorzystaniem formy z pożądanym genem/genami charakteryzującej się korzystnymi cechami technologicznymi są korzystniejsze. Zapewniają uzyskanie mieszańców z pożądanym genem/genami o dobrych wartościach technologicznych szybciej i bez konieczności wypierania niekorzystnych cech z jakimi mamy do czynienia prowadząc krzyżowania międzyrodzajowe (oddalone) z formami prymitywnym i źródłami genów odporności na wybrane choroby. Poza tym uzyskanie mieszańców międzyrodzajowych metodami wymuszonego krzyżowania napotyka niestety na wiele barier genetycznych w postaci alleli dominujących genów *Kr1*, *Kr2*, *Kr3* i *Kr4*). Ponadto w pszenicy istnieje mechanizm wpływający na łączenie się w pary homologicznych biwaleńców podczas mejozy, który uniemożliwia formowanie multiwaleńców, a w konsekwencji zapobiega nierównej segregacji chromosomów do komórek potomnych. System ten jest kontrolowany przez gen *Ph1*, zlokalizowany na długim ramieniu chromosomu 5B. Dominujące allele tych genów występują w większości europejskich odmian pszenicy, natomiast azjatyckie odmiany noszą allele recesywne, co znacznie zwiększa ich efektywność krzyżowań. Kolejnym utrudnieniem w krzyżowaniach międzyrodzajowych jest występowanie barier postzygotycznych). Te czynniki w krzyżowaniach oddalonych wpływają na to, że uzyskujemy niską liczbę otrzymanych ziarniaków w stosunku do liczby zapylnych kłosów.

## **Temat badawczy nr 2. Wytworzenie skutecznego systemu markerów SSR do identyfikacji spiramidyzowanych genów *Pch1* i *Pch2*, badania izoenzymatyczne w celu określenia obecności endopeptydazy *EpD1b* sprzężonej z genem *Pch1*.**

W roku 2017 poddano badaniu 150 genotypów pszenicy ozimej o zróżnicowanym podłożu genetycznym oraz 45 form mieszańcowych uzyskanych w ubiegłorocznej serii krzyżowań oddalonych pomiędzy pszenicą zwyczajną a formami *Ae. ventricosa* x *T. persicum*, a także odmiana „Rendezvous”, która jest wzorcem odporności na łamliwość podstawy źdźbła. W badaniach genów odporności na łamliwość podstawy źdźbła powodowaną przez grzyby z rodzaju *Oculimacula* wykorzystano 5 markerów molekularnych: cztery dla genu *Pch1* warunkującego odporność rośliny w stadium dojrzewania, w tym jeden marker izoenzymatyczny (*EpD1b*) i 3 markery molekularne: *Xust2001-7DL*, *Xorw1*, *Xorw5* (7DL) oraz jeden marker dla genu *Pch2*: *Xwmc525* (7AL) - gen ten warunkuje odporność w stadium siewki, a ma niewielki wpływ na odporność rośliny dojrzalej.

### **Wyniki tematu badawczego nr 2:**

#### Analiza izoenzymów

W badanych 165 genotypach pszenicy ozimej uzyskanej z przekrzyżowań o różnym podłożu genetycznym i 6 formach kontrolnych obserwowane zymogramy można przypisać do 11 z 13 klas): Typ 1 - reprezentowany przez odmianę „Rendezvous” i 15 badanych genotypów pszenicy ozimej (9%) charakteryzował się trzema prążkami dla *Ep-D1b*, które identyfikują formy odporne na infekcję grzybową powodowaną przez *Oculimacula yallundae* i *Oculimacula aciformis*. Pozostałe genotypy wykazywały wzory prążkowe zymogramów (od Typu 2 do Typu 13).

W tym roku analizowano 5 roślin z każdego genotypu.

- Trzy linie były polimorficzne, w tym dwie wykazywały wzór typowy dla roślin odpornych.
- Większość badanych linii wykazywała wzór prążkowy - Typ 3 (47,7% genotypów).
- Kolejnymi kategoriami wzorów prążkowych zymogramów pod względem liczby obiektów były wzory prążkowe - Typy 5 i 8.
- Tylko 8,1% (14 genotypów) stanowiły genotypy o typie wzoru (Typ 1) charakterystycznym dla roślin odpornych. Jak wynika z danych literaturowych) tylko obecność prążków dla *Ep-D1b* przy jednoczesnym braku prążków *Ep-D1a* gwarantuje odporność na łamliwość źdźbła.

#### Analizy molekularne

##### a) *Xust2001-7DL* jako marker dla genu *Pch1*

Scharakteryzowano dwa produkty amplifikacji markera *XustSSR2001-7DL* w postaci prążków o wielkości 240 par zasad (pz) oraz 220 pz. W rezultacie reakcji PCR przeprowadzonej z wykorzystaniem DNA kontrolnej odmiany ‘Rendezvous’ uzyskano produkt o wielkości 240 pz. W analizach poszczególnych genotypów obserwowano występowanie pojedynczych produktów (220 pz lub 240 pz). U czternastu (8,13%) genotypów stwierdzono produkt o wielkości 240 pz (taki jak u wzorcowej odmiany Rendezvous).

##### b) *Xorw 5* jako marker dla genu *Pch1*

Scharakteryzowano dwa produkty amplifikacji markera *Xorw 5* o wielkości 140 pz i null (brak produktu amplifikacji). Odmiana wzorcowa Rendezvous wykazywała null i taki układ stwierdzono u 16 badanych genotypów pszenicy ozimej.

##### c) *Xorw 1* jako marker dla genu *Pch1*

*Xorw1* to nowo opracowany marker, który wykazuje całkowite sprzężenie z locus *Ep-D1* i genem *Pch1*. Scharakteryzowano 4 produkty amplifikacji markera *Xorw 1* o wielkości 140, 150, 160 i 170 pz.

Odmiana wzorcowa odporna Rendezvous wykazywała obecność produktu o długości 160 pz i taki układ stwierdzono u 14 badanych genotypów pszenicy ozimej.

#### d) *Xwmc525* jako marker dla genu *Pch2*

U odpornej odmiany Rendezvous stwierdzono produkt amplifikacji markera *Xwmc525* o długości 180 pz. Takie produkty amplifikacji stwierdzono u 68 badanych genotypów.

#### Dyskusja

Najbardziej efektywny jest gen *Pch1*. Został zidentyfikowany w *Aegilops ventricosa* [ $2n = 4x = 28$ ,  $D^vD^vM^vM^v$ ] i translokowany do długiego ramienia chromosomu 7D heksaploidalnej pszenicy. Nie zapewnia on całkowitej odporności rośliny, jednakże znacząco redukuje skalę porażenia przez grzyby patogeniczne oraz ich penetrację podstawy źdźbła. Drugim genem, który w mniejszym stopniu warunkuje odporność na łamliwość źdźbła jest *Pch2* zlokalizowany na dłuższym ramieniu chromosomu 7A pszenicy odmiany „Capelle-Deprez”, jednakże nie jest on homeologiem genu *Pch1*, o podobnej lokalizacji na chromosomie 7D. Warunkuje on odporność w stadium siewki, jednak jego efektywność zapobiegania infekcji przez grzyby patogeniczne z rodzaju *Oculimacula* jest mniejsza od genu *Pch1*. Z tego względu gen *Pch2* może być traktowany jako dodatkowe źródło odporności pszenicy na łamliwość źdźbła.

#### Podsumowanie

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 trzech genotypów pszenicy ozimej: DD248/12, KBP 15.12, STH 4431. W 6 genotypach z użyciem markera izoenzymatycznego i markerów molekularnych zidentyfikowano tylko gen *Pch1*. Nie stwierdzono natomiast genu *Pch2*, który w mniejszym stopniu warunkuje odporność na łamliwość źdźbła, jego efektywność zapobiegania infekcji przez grzyby z rodzaju *Oculimacula* jest mniejsza od genu *Pch1*, jest to tylko gen pomocniczy. Dwa genotypy SMH 9409 i DL358/13/4 były polimorficzne w badaniu z użyciem markera izoenzymatycznego. W pozostałych trzech genotypach: C 3373/11-1, KBH 15.15, KBP 1416 identyfikowano gen *Pch1* tylko z użyciem markera izoenzymatycznego. U genotypu DD 708/13 zidentyfikowano obecność genu *Pch1* i *Pch2*, gdzie najprawdopodobniej doszło do przełamania sprzężenia między locus *Pch1*, a locus markera *Xorw5*. W pozostałych genotypach pszenicy nie identyfikowano genów *Pch1* i *Pch2*. Produkty amplifikacji właściwe dla roślin odpornych dla markera *Xorw1* zidentyfikowano u 37 z 45 badanych roślin mieszańcowych oraz odmianie wzorcowej Rendezvous.

**Temat badawczy nr 3. Analiza wytworzonych mieszańców (w liczbie około 150) za pomocą doświadczenia inokulacyjnego *in vivo* (zbiór materiału roślinnego inokulowanego oraz ocena porażenia przez *O. acufornis* i *O. yallundae* w celu weryfikacji ekspresji genów *Pch1* i *Pch2*, analiza korelacji między cechami fenotypowymi roślin a odpornością na łamliwość źdźbła. Badanie podatności wytworzonych mieszańców na poletkach w miejscach, gdzie występuje naturalne porażenie przez *O. acufornis* i *O. yallundae*) i wybór genotypów cechujących się występowaniem genów *Pch1* i *Pch2***

#### **Wyniki tematu badawczego nr 3:**

##### *Testy inokulacyjne siewkowe*

- ✓ Najniższe porażenie siewek odnotowano u genotypów posiadających dwa geny *Pch1* i *Pch2* średnio 0,8 (od 0-3).
- ✓ Genotypy posiadające tylko gen *Pch1* wykazywały wyższe porażenie - średnio 1,20 i podobnie genotypy posiadające gen *Pch2* - średnio 1,40.
- ✓ Genotypy nie posiadające genów *Pch1* i *Pch2* wykazywały najwyższe porażenie siewek - średnio 1,90 (od 0-6).

### 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 z genem *Pch1* średni współczynnik porażenia był najniższy i wynosił  $K=0,50$ . Odnotowano najniższe porażenie źdźbeł, średnio 1,30 (od 0-4).
- Dla genotypów, u których wykazano gen *Pch2* współczynnik  $K$  wynosił 5,7, a procent porażonych źdźbeł był wysoki 24,8%.
- Genotypy, u których wykazano obecność genów *Pch1* i *Pch2* wykazywały współczynnik porażenia  $K$  na poziomie 0,80 i dość niski procent porażonych źdźbeł 5%.
- Genotypy, u których nie stwierdzono genu *Pch1* i *Pch2* wykazywały najwyższy współczynnik porażenia  $K=6,2$  i najwyższy średni procent porażonych źdźbeł (29,20%).

Oba parametry (współczynnik  $K$  i % porażonych źdźbeł) charakteryzujące stopień porażenia badanych roślin przez grzyby z rodzaju *Oculimacula* wykazały wysoki stopień korelacji ( $R^2=0,94$ ).

### Podsumowanie i wnioski do testu inokulacyjnego siewkowego i polowego

1. Najmniejsze porażenie siewek stwierdzono u genotypów posiadających gen *Pch1* i *Pch2* (0,80 w skali 1-4), a najwyższe dla genotypów, u których nie stwierdzono genów *Pch1* i *Pch2* (1,70).
2. Najmniejszy procent porażonych źdźbeł w teście polowym odnotowano u genotypów pszenicy z genem *Pch1* (średnio 1,30%).
3. Genotypy, posiadające tylko gen *Pch2* wykazywały wysokie porażenie źdźbeł (średnio 24,8%), podobnie jak genotypy bez genów *Pch1* i *Pch2* (śr. 29,2%).

### Obserwacje naturalnego porażenia

Przeprowadzono obserwacje naturalnego porażenia grzybami *Oculimacula yallundae* i *O. aciformis* w wybranych lokalizacjach na terenie Polski: Smolice, Kobierzyce, Strzelce i Nagradowice. Obserwowano niewielkie porażenie grzybami z rodzaju *Oculimacula* tylko w dwóch lokalizacjach. Mimo dużej liczby opadów w badanych lokalizacjach łamliwość podstawy źdźbła nie wystąpiła w dużym nasileniu. Tylko w przypadku jednego rodu (C 13337) w Nagradowicach obserwowano niewielkie porażenie. Najkorzystniejsze warunki do rozwoju tej choroby stwierdzono w 2016/2017r. w lokalizacji Strzelcach (HR Strzelce). W tej lokalizacji w okresie jesiennym odnotowano stosunkowo dużo opadów i korzystną temperaturę do infekcji tym patogenem (październik śr. 8,6°C). Grzyby z rodzaju *Oculimacula* najlepiej infekują w temp. 8-11°C. Jednak grzyb nie rozwinął się w dużym stopniu ze względu na zbyt wysokie temperatury w czasie kłoszenia i dojrzewania (maj powyżej 15°C i czerwiec powyżej 19°C).

### Analizy cech fizjologicznych

W celu wykazania, czy obecność genów *Pch1* i *Pch2* warunkujących odporność na łamliwość źdźbła w badanych genotypach pszenicy ozimej ma istotne znaczenie dla wielkości komponentów struktury polonu, wykonano analizę wariancji (ANOVA).

Wykazano, że obecność genów *Pch1* i *Pch2* lub ich brak nie wpływała istotnie na plon ziarna (z poletka), chociaż plon był najwyższy przy obecności obu genów.

Obserwowano natomiast istotny wpływ obecności genu *Pch1* na masę tysiąca ziarniaków (MTZ). U genotypów z genem *Pch1* stwierdzono istotnie wyższe wartości MTZ niż u genotypów bez obu genów lub jedynie z genem *Pch2*. Masa tysiąca ziaren rosła jeżeli był obecny gen *Pch1* i dodatkowo wzrastała, kiedy identyfikowana była obecność obu genów *Pch1* i *Pch2*.

## PODSUMOWANIE wszystkich tematów badawczych

1. Krzyżowania wewnątrzgatunkowe z wykorzystaniem formy z pożądanym genem/genami charakteryzującej się korzystnymi cechami technologicznymi są korzystniejsze. Zapewniają uzyskanie mieszańców z pożądanym genem/genami o dobrych wartościach technologicznych szybciej i bez konieczności wypierania niekorzystnych cech z jakimi mamy do czynienia prowadząc krzyżowania międzyrodzajowe (oddalone) z formami prymitywnym i źródłami genów odporności na wybrane choroby.
2. Uzyskanie mieszańców międzyrodzajowych metodami wymuszonego krzyżowania napotyka niestety na wiele barier genetycznych i jest mniej efektywne.
3. 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 trzech genotypów pszenicy ozimej: DD248/12, KBP 15.12, STH 4431.
4. W 6 genotypach z użyciem markera izoenzymatycznego i markerów molekularnych zidentyfikowano tylko gen *Pch1*.
5. Dwa genotypy SMH 9409 i DL358/13/4 były polimorficzne w badaniu z użyciem markera izoenzymatycznego.
6. Najmniejsze porażenie siewek stwierdzono u genotypów posiadających gen *Pch1* i *Pch2* (0,80 w skali 1-4), a najwyższe dla genotypów, u których nie stwierdzono genów *Pch1* i *Pch2* (1,70).
7. Najmniejszy procent porażonych źdźbeł w teście polowym odnotowano u genotypów pszenicy z genem *Pch1* (średnio 1,30%).
8. Genotypy, posiadające tylko gen *Pch2* wykazywały wysokie porażenie źdźbeł (średnio 24,8%), podobnie jak genotypy bez genów *Pch1* i *Pch2* (średnio 29,2%).
9. Wykazano, że obecność genów *Pch1* i *Pch2* lub ich brak nie wpływała istotnie na plon ziarna (z poletka), chociaż plon był najwyższy przy obecności obu genów.
10. Obserwowano istotny wpływ obecności genu *Pch1* na masę tysiąca ziarniaków (MTZ). U genotypów z genem *Pch1* stwierdzono istotnie wyższe wartości MTZ niż u genotypów bez obu genów lub jedynie z genem *Pch2*. Masa tysiąca ziaren rosła jeżeli była obecność genu *Pch1* i dodatkowo wzrastała, wtedy kiedy identyfikowane były oba geny *Pch1* i *Pch2*.