

Sprawozdanie merytoryczne z wykonania zadania nr 2: „**Poszukiwanie markerów molekularnych i fenotypowych do identyfikacji genów odporności pszenicy na łamliwość źdźbła powodowaną przez *Oculimacula yallundae* i *Oculimacula aciformis***”, w 2014 roku.

*Halina Wiśniewska, Michał Kwiatek, Magdalena Gawłowska, Marek Korbas, Maciej Majka, Jolanta Belter oraz 3 pracowników pomocniczych*

## WPROWADZENIE

Łamliwość źdźbła, powodowana przez grzyby patogeniczne *Oculimacula yallundae* i *O. aciformis*, jest najgroźniejszą chorobą podstawy źdźbła. Gen *Pchl*, którego ekspresja najskuteczniej potrafi blokować rozwój tych patogenów zidentyfikowano w nieuprawnym gatunku *Aegilops ventricosa* ( $D^vD^vM^vM^v$ ). Co więcej, locus *Pchl* zdołano przetransformować do pszenicy zwyczajnej (*Triticum aestivum* L.) na skutek translokacji chromosomu 7D. Badania w potomstwie linii pszenicznej stanowiącej źródło genu *Pchl* włączonego z *Ae. ventricosa* pozwoliły stwierdzić, że locus genu *Pchl* sprzężony jest z locus kodującym endopeptydazę *Ep-D1b* (również pochodzącym z *Ae. ventricosa*). *Ep-D1b* jest użytecznym markerem izoenzymatycznym, dziedziczonym kodominacyjnie. W pszenicy endopeptydaza 1 (*EP-1*) jest kontrolowana przez 3 loci: *Ep-A1*, *Ep-B1* i *Ep-D1* zlokalizowanych odpowiednio w chromosomach: 7AL, 7BL i 7DL. *Ep-D1* posiada dwa allele: *Ep-D1a* – pochodzący z pszenicy oraz *Ep-D1b* – pochodzący z *Aegilops ventricosa*. Jego identyfikacja pozwala stwierdzić obecność genu *Pchl*, ze względu na bliskie położenie tych dwóch sekwencji na dłuższym ramieniu chromosomu 7D (7DL). Według danych literaturowych marker *Ep-D1b* w 100 % określa reakcję na porażenie grzybami *Oculimacula yallundae* i *O. aciformis*. Opracowano także marker STS (*Xust SSR2001-7DL*), którego locus jest ściśle powiązane z locus *Ep-D1*.

## MATERIAŁ BADAWCZY, CEL I METODYKA BADAŃ

**Materiał badawczy** stanowiły 162 genotypy pszenicy o zróżnicowanym podłożu genetycznym oraz odmiana pszenicy ozimej „Rendezvous”- użyta jako wzorzec odporności na łamliwość źdźbła.

### **Cel badań:**

1. Analiza izozymów endopeptydaz celem identyfikacji obecności markera izoenzymatycznego *Ep-D1b*.
2. Identyfikacja obecności markera STS *Xust SSR2001-7DL*, którego locus jest ściśle powiązane z locus *Ep-D1*.
3. Analiza ekspresji genu *Pchl* w warunkach polowych (testy *in vivo*) skontrolowana w warunkach inokulacji wybranych genotypów zarodnikami *Oculimacula yallundae* i *O. aciformis*.

### **Metodyka badań:**

Do badań pobrano pięć roślin z każdego genotypu, co łącznie stanowiło 810 prób. 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. Żele przygotowano z użyciem buforu tris citrate pH 7. Przez okres trzech godzin prowadzono horyzontalną elektroforezę w temperaturze 5°C przy napięciu 200V. Żele inkubowano w temperaturze 37°C przez 2 godziny w 0,5% roztworze niskotopliwej agarozы zawierającym 2,56 mg Fast Black K Salt i 1,12 mg BANA w 0,1 M Trizma maleate-NaOH – pH 5,8. Równolegle dokonano identyfikacji obecności markera STS *Xust SSR2001-7DL*. Izolację genomowego DNA analizowanych genotypów przeprowadzono przy użyciu metody CTAB. Analiza molekularna pod względem obecności markera STS (*XustSSR2001-7DL*), powiązanego z locus *Ep-D1b* warunkującego odporność na łamliwość źdźbła polegała na:

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

Na 162 genotypach w pięciu powtórzeniach będących przedmiotem badań wykonano także zakażenie suspensją mieszaniny zarodników i grzybni *Oculimacula yallundae* i *O. aciformis* w proporcji

1:1. Stężenie inokulum wynosiło 4,0 mln zarodników w 1 ml. Ocena uwzględniała stopień porażenia źdźbeł w 4-stopniowej skali. Na badanych próbach roślin określono procentowy udział źdźbeł porażonych (ogółem) oraz obliczono wskaźnik porażenia źdźbła przez grzyby z rodzaju *Oculimacula*. 50 źdźbeł w 5 powtórzeniach z każdego genotypu poddano ocenie a wyniki uśredniono.

## WYNIKI

Obserwowane u badanych 162 obiektów zymogramy przypisano do 6 klas. Typ pierwszy reprezentowany przez odmianę „Rendezvous”, a także 6 badanych genotypów charakteryzował się trzema prążkami dla *Ep-D1b*, które identyfikują formy odporne na infekcję grzybową powodowaną przez *Oculimacula yallundae* i *O. aciformis*. Pozostałe typy zymogramów charakterystyczne były dla roślin bez introgresji fragmentu chromatyny *Ae. ventricosa* niosącego endopeptydazę *EpD1b*. W analizach molekularnych obserwowano dwa produkty amplifikacji markera STS (*Xust SSR2001-7DL*) w postaci prążków o wielkości 240 par zasad (pz) oraz 222 pz. W badaniach poszczególnych roślin obserwowano występowanie zarówno pojedynczych produktów (222 pz lub 240 pz) oraz obu produktów występujących jednocześnie. Amplifikacja w/w markera z DNA każdej z pięciu analizowanych roślin sześciu genotypów niosących endopeptydazę *EpD1b* dała produkt o wielkości 240 pz. Produkty amplifikacji w dwóch genotypach były zróżnicowane. W przypadku jednego genotypu uzyskano produkt o wielkości 222 pz w jednej roślinie, produkt o wielkości 240 pz w dwóch roślinach oraz dwa produkty (222 i 240 pz) w dwóch roślinach. 3 kolejne rośliny charakteryzowały produktem o wielkości 240 pz, a jedna roślina posiadała zarówno produkt 222 jak i 240 pz. Rośliny pozostałych genotypów charakteryzowały się występowaniem prążka o wielkości 222 pz

Badanie porażenia genotypów przez sprawców łamliwości źdźbła (*Oculimacula* spp.) polegało na ocenie objawów choroby na zróżnicowanej ilości źdźbeł. Wykonanie sztucznej infekcji wiosną w fazie BBCH30-32 z użyciem suspensji grzyba pozwalała wykazać zróżnicowanie porażenia badanych form przez *Oculimacula* spp – sprawców łamliwości źdźbła. Duże różnice obserwowano oceniając procent porażonych źdźbeł, a mniejsze zróżnicowanie stwierdzono w wielkości wartości wskaźnika porażenia K. Średni procent porażonych źdźbeł wynosił od 7,50–32% natomiast wielkość wskaźnika porażenia K znajdowała się w przedziale K=1,39 do K=7,41.

## WNIOSKI

1. Wyniki analiz potwierdzają konieczność wykonywania analiz molekularnych pojedynczych roślin z poszczególnych genotypów (zamiast analizowania zbiorczych prób reprezentujących dany genotyp) ze względu na możliwość występowania polimorficznych wzorów prążkowych w roślinach danego genotypu.
2. Genotypy, których wszystkie rośliny posiadały wzór prążkowy charakterystyczny dla endopeptydazy *EpD1b* są stabilnym źródłem genu odporności na łamliwość podstawy źdźbła
3. Marker *XustSSR2001-7DL* wykazał skuteczność w wysokości 99,88% w charakteryzowaniu obecności endopeptydazy *EpD1b* sprzężonej z genem *Pchl* warunkującym odporność na łamliwość podstawy źdźbła w badanej puli 810 roślin pochodzących z 162 genotypów.
4. Zakażenie suspensją mieszaniny zarodników i grzybni *Oculimacula yallundae* i *O. aciformis* w proporcji 1:1 oraz stężeniu wynoszącym 4,0 mln zarodników w 1 ml jest wystarczające do zróżnicowania genotypów pszenicy odpornych i wrażliwych na łamliwość podstawy źdźbła.
5. Wartości współczynnika K oraz średnie procentowe porażenie roślin pszenicy wzorcowej odmiany „Rendezvous” (odpowiednio K=3, średni procent porażonych roślin 13,33%) mogą stanowić punkt rozgraniczający genotypy o podwyższonej tolerancji od genotypów wrażliwych. Świadczą o tym wyniki analiz 6 genotypów niosących marker STS i endopeptydazę *EpD1b* oraz charakteryzującymi się niższymi wartościami wskaźnika K i procentowego porażenia roślin w porównaniu do roślin odmiany „Rendezvous”.
6. Ze względu na brak markerów genu *Pchl* w 12 genotypów, które wykazały niższy stopień porażenia niż wzorcowa odmiana odporności „Rendezvous” można przypuszczać, iż tolerancja na łamliwość podstawy źdźbła warunkowana jest przez inne czynniki genetyczne.
7. Nasilenie objawów łamliwości podstawy źdźbła obserwowane u roślin analizowanych w bieżącym roku spowodowane jest występowaniem innych patogenów (np.: grzyby z rodzaju *Fusarium*).