

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 acuformis***”, w 2015 roku.

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

WPROWADZENIE

Łamliwość podstawy źdźbła jest jedną z najgroźniejszych chorób pszenicy. Występuje ona w rejonach, gdzie są łagodne zimy i chłodne wiosny. Na młodych roślinach pszenicy, na zewnętrznych pochwach liści występują początkowo bursztynowo-brązowe plamy rozwoju grzyba. 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. Wyleganie zbóż z powodu *Oculimacula yallundae* i *O. acuformis* jest znaczne. Nasilenie choroby próbowano w pewnych granicach zredukować poprzez środki skracające długość źdźbła, przyczyniające się w pewnej mierze do zmniejszenia wylegania. Zastosowanie genów karłowatości lub środków chemicznych w celu skrócenia długości źdźbeł jest coraz mniej zasadne, gdyż słoma znajduje zastosowanie jako materiał energetyczny. Do tej pory odkryto dwa efektywne geny odporności na omawianego patogena: *Pch1* i *Pch2*. Gen *Pch1* został zidentyfikowany w *Aegilops ventricosa* [$2n = 4x = 28$, D^yD^yM^yM^y] i translokowany do heksaploidalnej pszenicy wraz z locus kodującym endopeptydazę *EpD1b*. 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*. *Ep-D1b* jest użytecznym markerem izoenzymatycznym, dziedziczonym kodominacyjnie. Jego identyfikacja pozwala stwierdzić obecność genu *Pch1*, 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. acuformis*. Opracowano także marker STS (*Xust SSR2001-7DL*), którego locus jest ściśle powiązane z locus *Ep-D1*. Drugim genem, który w mniejszym stopniu warunkuje odporność na łamliwość źdźbła jest *Pch2* zlokalizowany na dłuższym ramieniu chromosomu 7A pszenicy odmiany Capelle-Deprez (Chapman i in. 2008). Warunkuje on odporność już w stadium siewki. W ramach niniejszego projektu podjęto próby identyfikacji nowych markerów sprzężonych z genem *Pch2*.

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. Testy *in vivo* z około 150 genotypami pszenicy ozimej i formami krewniaczymi z plemienia Triticeae oraz analiza naturalnego porażenia w danym roku doświadczalnym przez *O. acuformis* i *O. yallundae*), przygotowanie materiału roślinnego oraz monitoring temperatury i opadów w czasie trwania doświadczenia.
2. Badania molekularne z zastosowaniem markerów SSR w celu znalezienia markerów genu *Pch2*. Analiza występowania locus *XustSSR2001-7DL* sprzężonego z genem *Pch1* oraz badania izoenzymatyczne w celu określenia obecności endopeptydazy *EpD1b* sprzężonej z genem *Pch1*
3. Zbiór materiału roślinnego inokulowanego oraz analiza porażenia przez *O. acuformis* i *O. yallundae* w celu wybrania do dalszych badań genotypów odpornych a także genotypów wykazujących znaczne porażenie. Analiza korelacji między cechami fenotypowymi roślin a ich odpornością na łamliwość źdźbła.

METODY

Doświadczenie inokulacyjne

W fazie 1-2 kolanka (BBCH 31-32, druga dekada kwietnia 2015 roku) wykonano na 150 poletkach (w czterech powtórzeniach) zakażenie 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*. Stężenie inokulum wynosiło 4,0 mln zarodników w 1 ml.

Obserwacje naturalnego porażenia

Obserwacje naturalnego porażenia grzybami patogenicznymi wywołującym łamliwość podstawy źdźbła przeprowadzono w czterech lokalizacjach na terenie Polski, tj.: Smolice (Hodowla Roślin Smolice S.p. z. o.o.), Kobierzyce (Małopolska Hodowla Roślin S.p. z. o.o.), Strzelce (Hodowla Roślin Strzelce S.p. z. o.o.) i Nagradowice (Poznańska Hodowla Roślin S.p. z. o.o.)

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. Wartości średnie uzyskiwano dla trzech dekad każdego miesiąca.

Analiza izoenzymów

Do badań pobrano pięć roślin z każdego genotypu, co łącznie stanowiło 750 prób. Analizę polimorfizmu allozymów przeprowadzono w ekstraktach z 2 cm² świeżej tkanki liściowej. Izoenzymy analizowano za pomocą elektroforezy horyzontalnej na 10% żelu skrobiowym.

Analizy markerów SSR

Do badań pobierano pięć roślin z każdego genotypu, co łącznie stanowiło 750 prób. Izolację genomowego DNA analizowanych genotypów przeprowadzono przy użyciu metody CTAB. Analiza molekularna pod względem obecności markerów *Xust2001-7DL (Pch1)*, *Xcfa2040*, *Xwmc525*, *Xgwm346* polegała na:

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

Porównanie analiz występowania markerów z wynikami testów inokulacyjnych

Na podstawie wyników laboratoryjnych oraz wyników testów inokulacyjnych dokonano wyboru form, które były odporne na łamliwość podstawy źdźbła. Genotypy te zostały przekazane do banku genów IGR PAN i zostaną wykorzystane w krzyżowaniach mających na celu ulepszenie pszenicy zwyczajnej.

Wpływ cech fenotypowych i fizjologicznych do reakcji na porażenie przez *Oculimacula yallundae* i *O. aciformis*

Przeprowadzono analizę cech fenotypowych i fizjologicznych tj. wysokosc plonu z poletka, masa tysiąca ziaren oraz ocena stopnia wylegania w odniesieniu do reakcji na porażenie przez *Oculimacula yallundae* i *O. aciformis*, która pozwoliła na oszacowanie skali interakcji między patogenami a rośliną w bieżącym roku badawczym. W tym celu dokonano analiz korelacji między elementami struktury plonu w postaci masy tysiąca nasion (MTZ) i plonu z poletka (PLON) oraz stopnia wylegania (WYL; skala 9-cio stopniowa wg. COBORU) w porównaniu do współczynnika porażenia (K) oraz średniego procentu porażonych źdźbeł (Śr. % por.).

WYNIKI

Doświadczenie inokulacyjne

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. Ze względu na stopień porażenia badane genotypy podzielono na cztery grupy. Pierwsza grupa liczyła 19 genotypów, które charakteryzowały się bardzo niskim porażeniem. Współczynnik K w tej grupie genotypów wynosił od 0 do 1, a średnie procentowe porażenie źdźbeł wynosiło od 0 – 8%. Kolejną grupę stanowiło 56 genotypów o współczynniku K zawierającym się w przedziale $1 < K \leq 2$ i procentowym porażeniu źdźbeł wynoszącym od 8,1% do 12%. Do kolejnej grupy zaliczono 49 genotypów o wielkościach współczynnika K zawierających się w przedziale $2 < K \leq 3$ (12% – 17,5% porażonych źdźbeł). Ostatnia grupa genotypów o wartości współczynnika $2 < K \leq 3,75$ (17,6% – 22% porażonych źdźbeł) liczyła 26 roślin.

Obserwacje naturalnego porażenia

Badania miały na celu określenie naturalnego porażenia źdźbeł przez sprawców łamliwości źdźbła (*Oculimacula* spp.), co pozwoliło na stwierdzenie ich naturalnej wrażliwości na porażenie przez te patogeny w roku 2015. Ocena naturalnego porażenia badanych genotypów w Smolicach nie wykazała obecność objawów łamliwości podstawy źdźbła. Ocena fitopatologiczna wykonana w Kobierzycach wykazała brak wystąpienia porażenia chorobami podstawy źdźbła. Podobne wyniki uzyskano w Strzelcach, gdzie nie zaobserwowano wylegania roślin pszenicy badanych w doświadczeniu. Natomiast w NAGRADOWICACH obserwowano niewielkie placowe bielienie kłosów na poletkach pięciu genotypów badanych w doświadczeniach. Objawy te były spowodowane obecnością grzybów *Oculimacula yallundae* i *O. aciformis* powodujących łamliwość podstawy źdźbła.

Obserwacje temperatury i opadów

Biorąc pod uwagę odnotowane średnie wartości sum opadów oraz średnie temperatury można zauważyć, że jesienią roku 2014 we wszystkich lokalizacjach odnotowano niskie wartości sum opadów. Co więcej, w tym okresie średnie temperatury były niższe niż zakres temperatur optymalny dla infekcji, co miało dodatkowy wpływ na zahamowanie rozwoju grzybów *Oculimacula yallundae* i *O. aciformis* w warunkach naturalnych. Ponadto, wiosną 2015 roku również nie sprzyjała rozwojowi w/w grzybów patogenicznych biorąc pod uwagę niskie wartości opadów. Podsumowując, bardzo niskie porażenie naturalne grzybami *Oculimacula yallundae* i *O. aciformis* spowodowane było nieodpowiednimi warunkami środowiskowymi dla rozwoju i infekcji tych patogenów.

Analiza izoenzymów

Obserwowane u badanych 150 obiektów zymogramy można przypisać do 6 z 12 klas. Typ pierwszy reprezentowany przez odmianę „Rendezvous”, a także 8 badanych genotypów charakteryzował się trzema prążkami dla *Ep-D1b*, które identyfikują formy odporne na infekcję grzybową powodowaną przez *Oculimacula yallundae* i *Oculimacula aciformis*. Pozostałe typy zymogramów wyszczególnione są w tabeli 4. Żadna z linii nie reprezentowała typu 2, 4, 8, 9, 10 i 12 z 2014. W tym roku analizowano 5 roślin z każdego genotypu. 1 linia była polimorficzna (DD 982/11). Większość badanych linii wykazywała typ wzoru nr 3 (78% obiektów). Tylko 7% stanowiły obiekty o typie wzoru 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 podstawy źdźbła.

Analiza markerów SSR

Xust2001-7DL* jako marker genu *Pch1

Obserwowano dwa produkty amplifikacji markera *Xust SSR2001-7DL* 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 zarówno pojedynczych produktów (220 pz lub 240 pz) oraz obu produktów występujących jednocześnie. Amplifikacja w/w markera z DNA

każdej z pięciu analizowanych roślin 3 genotypów (AND 4006/13; DD770/11 i HRSM 890) dała produkt o wielkości 240 pz. Analizy molekularne 20 genotypów wykazały obecność zarówno produktu 220 jak i 240 pz.

Xcfa2040 jako marker flankujący gen Pch2

Rozdział elektroforetyczny produktów reakcji PCR w wykorzystaniu starterów markera *Xcfa2040* wykazał polimorficzność analizowanych linii. Obserwowano produkty o wielkościach 286, 300, 317 i 350 pz. W rezultacie reakcji PCR przeprowadzonej z wykorzystaniem DNA kontrolnej odmiany 'Rendezvous' uzyskano produkt o wielkości 317 pz. W 36 genotypach uzyskano pojedynczy produkt o wielkości 286 pz. W pozostałych przypadkach obserwowano dwa produkty reakcji PCR. 35 roślin charakteryzowały produkty o wielkości 286 i 317 pz. Reakcje przeprowadzone na reszcie genotypów skutkowały produktami o wielkościach 286 i 300 pz.

Xgwm346 jako marker flankujący gen Pch2

Analiza PCR tego markera skutkowała otrzymaniem dwóch typów produktu tj.: 210 lub 204 pz. W rezultacie reakcji PCR przeprowadzonej z wykorzystaniem DNA kontrolnej odmiany 'Rendezvous' uzyskano produkt o wielkości 204 pz. W przypadku trzech roślin nie uzyskano produktu. W analizach PCR 99 roślin obserwowano produkt o wielkości 204 pz. W pozostałych przypadkach produktem reakcji był prążek o wielkości 210 pz.

Xwmc525 jako marker flankujący gen Pch2

Reakcje PCR przeprowadzonej z primerami markera *Xwmc525* na DNA 10 roślin z każdego z 150 genotypów pszenicy skutkowały różnorodnymi wielkościami produktów. Ponadto, w większości przypadków obserwowano dwa lub trzy produkty reakcji jednocześnie. Uzyskano produkty o wielkościach: 206; 210; 240; 270 i 280 pz. W rezultacie reakcji PCR przeprowadzonej z wykorzystaniem DNA kontrolnej odmiany 'Rendezvous' uzyskano produkt o wielkości 206 pz. Taki sam produkt uzyskano u 61 badanych genotypów pszenicy. Ponadto 5 innych genotypów charakteryzowało się produktem o wielkości 206 pz. w towarzystwie innych produktów o wielkościach 210 lub/i 280 pz.

Porównanie analiz występowania markerów z wynikami testów inokulacyjnych

Porównanie wyników badań mających na celu identyfikację markerów izoenzymatycznych i molekularnych sprzężonych z genami odporności na łamliwość źdźbła. 19 genotypów charakteryzowało się bardzo niskim porażeniem ($0 < K \leq 1$ oraz 0% – 8% porażonych źdźbeł). W tej grupie znalazły się 2 genotypy DD770/11 i HRSM 890, których wszystkie rośliny posiadały wzór prążkowy charakterystyczny dla endopeptydazy *EpD1b* oraz produkt reakcji PCR z markerem *Xust2001-7DL* o wielkości 240 pz. W kolejnych 5 genotypach zakwalifikowanych do tej grupy zidentyfikowano endopeptydazę *EpD1b* i obserwowano produkty reakcji PCR (marker *Xust2001-7DL*) o wielkości 220 pz i 240 pz. Podsumowując, odporność na łamliwość podstawy źdźbła u 36,84% odpornych genotypów badanych w tegorocznym doświadczeniu była determinowana przez gen *Pch1*. W żadnej z badanych roślin nie uzyskano produktów amplifikacji markerów *Xwmc346*, *Xwmc525* i *Xcfa2040* o wielkościach odpowiednio: 204; 206 i 317 pz. – które charakteryzują genotypy posiadające gen *Pch2* (np. odmiana 'Rendezvous').

Wpływ cech fenotypowych i fizjologicznych do reakcji na porażenie przez *Oculimacula yallundae* i *O. aciformis*

Średni plon wszystkich genotypów ujętych w doświadczeniu wynosił 111,6. Natomiast średni plon genotypów posiadających gen *Pch1* wynosił 110,3 i był o 1,4 kg niższy od średniego plonu uzyskanego z genotypów pszenicy bez genu *Pch1*. Jednakże, średnia masa tysiąca nasion genotypów z genem *Pch1* wynosiła 48,2g i była wyższa od średniej MTZ genotypów bez *Pch1* o 0,7g. Średnia ocena wylegania nie różniła się między porównywanymi genotypami

WNIOSKI

- Jesienią 2014 odnotowano niskie wartości sum opadów, co miało wpływ na zahamowanie rozwoju grzybów *Oculimacula yallundae* i *O. aciformis* w warunkach naturalnych.
- Wiosna 2015 roku nie sprzyjała rozwojowi grzybów patogenicznych powodujących łamliwość podstawy źdźbła ze względu na niskie wartości średnich sum opadów.
- Sztuczne 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.
- Pięć genotypów wykazało wrażliwość na porażenie przez patogeny powodujące łamliwość podstawy źdźbła zarówno w doświadczeniach inokulacyjnych, jak i w doświadczeniach monitorujących naturalne porażenie.
- Genotypy **DD770/11** i **HRSM 890**, których wszystkie rośliny posiadały wzór prążkowy charakterystyczny dla endopeptydazy *EpD1b* oraz produkt reakcji PCR z markerem *Xust2001-7DL* o wielkości 240 pz. są stabilnym źródłem genu odporności na łamliwość podstawy źdźbła warunkowanym przez gen *Pch1*.
- Genotypy **STH 3010**; **STH 3222**; **DC 86/11**; **SMH 8925** i **POB 0714** charakteryzowały się niskim stopniem porażenia, lecz mają charakter heterozygotyczny pod względem genu *Pch1* i wymagają dalszej selekcji.
- W przypadku genotypu STH3222 obserwowano przełamanie sprzężenia między *locus* endopeptydazy a *locus* markera *Xust2001-7DL*, co świadczyć może o zmienności rekombinacyjnej w segmencie długiego ramienia chromosomu 7D, gdzie zlokalizowane są oba badane markery.
- 12 genotypów o wysokiej odporności na łamliwość podstawy źdźbła posiadają inne niż geny *Pch1* i *Pch2* mechanizmy odporności na porażenie przez *Oculimacula yallundae* i *O. aciformis*.
- Translokowany segment chromatyny *Aegilops ventricosa* z genem *Pch1* nie powoduje obniżki plonu.
- 25 badanych genotypów pszenicy można uznać za heterozygotyczne pod względem markera *Xcfa2040* sprzężonego z genem *Pch2*, stąd konieczna jest dalsza selekcja tych form pszenicy.