

Wrocław, dnia 8 grudnia 2009 r.

Dr hab. Henryk Bujak, prof. nadzw. UP  
Uniwersytet Przyrodniczy we Wrocławiu  
Katedra Genetyki, Hodowli Roślin i Nasiennictwa

## SPRAWOZDANIE

### **z badań finansowanych przez Ministerstwo Rolnictwa i Rozwoju Wsi pt. "Identyfikacja źródeł genetycznej odporności na mączniaka w kolekcji linii, rodów i odmian żyta" za 2009 rok**

Mączniak prawdziwy zbóż jest jedną z powszechnie występujących chorób w uprawie zbóż. Jego występowanie nie jest jednakowe w poszczególnych latach, ale w niektórych może być groźną chorobą żyta w znacznym stopniu ograniczającą plonowanie. Zdaniem Bojarczuka (1995) negatywny wpływ porażenia roślin przez mączniaka na plonowanie wzrasta zwłaszcza u odmian i linii o skróconym źdźbłę, bowiem wraz ze skracaniem źdźbła wzrasta udział liści w ogólnym bilansie asymilacji żyta. Żyto jest rośliną, która w znacznym stopniu asymiluje poprzez źdźbło, dlatego skrócenie źdźbła ośmiu wzrost udziału liści porażonych przez mączniak może spowodować spadek ogólnej powierzchni asymilacyjnej rośliny.

Dziedziczenie odporności na mączniaka u żyta jest bardziej skomplikowane niż u innych gatunków zbóż. Wyodrębniono jednak formy, u których stwierdzono monogeniczne (recesywne, dominujące lub częściowo dominujące) dziedziczenie się odporności żyta na mączniaka. U żyta regulacja odporności mączniaka nie jest tak dokładnie poznana (Rzepka-Plevnes i Bojarczuk, 1995). Oznaczono kilka genów warunkujących odporność na porażenie przez mączniaka prawdziwego u żyta (Schlegel i Melez 1996). Są to *Pm1*(1RS), *Pm2*(2RL), *Pm3*(3RS), *Pm4*(5RL), *Pm5*(6RL). Ponadto opisano *Pm6*, *Pm7* i *Pm8*, które występują odpowiednio na 3., 1. i 2. chromosomie, lecz nieznane jest ich położenie, oraz działające bardzo efektywnie i warunkujące pełną odporność żyta na wszystkie rasy fizjologiczne patogenna geny *Pm17* i *Pm20* (Bojarczuk, 1995; Wakuliński i wsp. 2007).

W roku bieżącym kontynuowano ocenę odporności na mączniaka prawdziwego (*Blumeria graminis*) w rodach hodowlanych z doświadczenia wstępnego, przesłanych przez hodowców materiałach genetycznych oraz materiałach pochodzących z własnej kolekcji genotypów żyta ozimego. Ponadto otrzymano populację, która może posłużyć do

wyprowadzenie form odpornych na tego patogenna i przekazanie ich do kolekcji materiałów wyjściowych. Przeprowadzono także charakterystykę molekularną i analizę podobieństwa genetycznego otrzymanych w poprzednim roku form żyta ozimego przy użyciu markerów molekularnych RAPD.

## **MATERIAŁ I METODY BADAŃ**

Materiał badawczy stanowiły przekazane przez hodowców formy żyta ozimego, materiały rody hodowlane z doświadczenia wstępnego oraz odmiany wzorcowe Balistic, Bosmo, Dańkowskie Diament, Minello, LPH 88.

Formy żyta ozimego przekazane przez:

1/ DANKO Hodowla Roślin Sp. z o. o.

CHD Ma 33 – CHD Ma 62 – DANKO Hodowla Roślin Sp. z o.o. Oddział w Choryni

LAD Ma4 – LAD Ma 23 - DANKO Hodowla Roślin Sp. z o.o. Oddział w Laskach

2/ Hodowlę Roślin Smolice Sp. z o. o.:

rody SMH oraz HRSM

3/ Rody z doświadczeń wstępnych.

4/ Własne genotypy z kolekcji linii wsobnych żyta ozimego:

UP 08/101 – UP 08/3/180

Łącznie przebadano 163 obiekty.

Ocenę podatności genotypów żyta na porażenie przez *Blumeria graminis* przeprowadzono w doświadczeniu szklarniowym zgodnie z metodyką przedstawioną w pracy Zamorski i wsp. (1994). Posługiwano się czterostopniową skalą porażenia (0–3), gdzie 0 – oznaczało brak objawów natomiast 3 – bardzo silne porażenie z koloniami mączniaka zajmującymi 75–100% powierzchni blaszek liściowych. Szklarniowe doświadczenia infekcyjne przeprowadzono wykorzystując do tego celu połowę populację patogena utrzymywaną na siewkach wrażliwej odmiany żyta. Materiał z namnożoną populacją mączniak prawdziwego otrzymano z Hodowli Roślin Smolice Sp. z o. o. Grupa IHAR. Inokulację przeprowadzano w fazie trzech liści metodą „miotłkową”. Następnie rośliny umieszczano w kamerze o wysokiej wilgotności. Dodatkowo obok ocenianego materiału ustawiono rośliny z namożonym patogemem, co sprzyjało porażeniu. Stopień porażenia roślin oceniano po dwóch tygodniach od inokulacji, posługując się wspomnianą skalą porażenia roślin.

Otrzymane z Hodowli DANKO rody CHD Ma 9 i CHD Ma 19 i CHD Ma 24 wykazujące największą odporność na mączniaka w roku 2008 przekrzyżowano z własnymi materiałami żyta posiadanymi w kolekcji Katedry. Wyniku tego programu krzyżowań uzyskano 43 nowe populacje mieszańców, z których można będzie wyprowadzić wartościowe odporne materiały wyjściowe. Ilość otrzymanych ziarniaków dla poszczególnych mieszańców jest różna i wynosi od kilku do kilkudziesięciu.

U wysianych w polu materiałów żyta otrzymanych w poprzednim roku nie udało się przeprowadzić oceny polowej odporności na mączniaka, ponieważ nie obserwowano objawów występowania tej choroby ani na ocenianym materiale, ani na żadnym ze znajdujących się w kolekcji Katedry genotypie żyta.

Ponieważ nie wszystkie materiały do oceny zostały przesłane na czas dodatkowo przeprowadzono drugie doświadczenia szklarniowe w celu oceny podatności genotypów żyta na porażenie przez *Blumeria graminis*.

Wyniki obserwacji porażenia mączniakiem prawdziwym tworzą układ nieciągły, dlatego w celu przeprowadzenia analiz statystycznych przeprowadzono transformację wyników obserwacji uzyskanych w skali wykorzystując wzór podany przez Węgrzyna i in. (1996):

$$x' = \arcsin \sqrt{0,125(x+1)}$$

Przeprowadzono także charakterystykę molekularną i analizę podobieństwa genetycznego otrzymanych w poprzednim roku form żyta ozimego przy użyciu markerów molekularnych RAPD. Materiał badawczy stanowiły liście młodych siewek 28 form żyta ozimego pochodzących z Hodowli Roślin DANKO Sp. z o. o. Oddziały Choryń i Laski.

Do izolacji całkowitego DNA z roślin wykorzystano metodę oczyszczania fenolem i chloroformem opracowaną przez Junghansa i Metzlaffa. Pobrane fragmenty liści były rozcierane w próbkach Eppendorfa przy użyciu ciekłego azotu, a następnie przechowywane w temperaturze  $-70^{\circ}\text{C}$ . Kolejne etapy izolacji wykonano zgodnie z opracowaną procedurą. Oznaczenie ilości oraz czystości wyizolowanego DNA przeprowadzono przy użyciu biofotometru firmy Eppendorff. Ilość DNA została zmierzona bezpośrednio w roztworze wodnym. Pomiar wykonano poprzez zmierzenie absorpcji fal świetlnych o długości 230, 260, 280 i 320 nm. Przy długości fali 260 nm znajduje się główne pasmo absorpcji dla oczyszczonego DNA, na podstawie tego odczytu określona została ilość wyizolowanego DNA. Do reakcji łańcuchowej polimerazy (PCR) użyty został

termocykler Tprofessional Basic firmy Biometra. Amplifikacja była prowadzona przy użyciu polimerazy Taq wraz z dodatkiem albuminy wołowej (BSA) firmy Fermentas. W reakcji PCR użyto następujących primerów: OPA 7, OPA 8, OPA 10, OPA 16, OPA 20 oraz OPY 18.

Do rozdziału produktów reakcji PCR użyto elektroforezy agarazowej. Rozdział był prowadzony w aparacie EC 330 o pojemności 120 ml i 40 studzienkach. Elektrolitem, w którym prowadzona była elektroforeza był bufor TBE o pH 8,0. Po rozdziale żele były wybarwiane w bromku etydyny, a obrazy, na których widoczny był polimorfizm lub jego brak otrzymano przy zastosowaniu kamery i światła UV.

Podobieństwo genetyczne i dendrogram otrzymano przy użyciu programu POPGENE i TREEVIEW, przy użyciu wzoru  $GS_{ij}$  (Nei i Li 1979) i zastosowaniu hierarchicznego algorytmu analizy skupień (UPGMA). Profile genetyczne, ze względu na dominujący charakter markerów RAPD, zapisywano w układzie zero – jedynkowym, gdzie 1 oznacza obecność prążka, a 0 – fenotyp null – bez prążka.

Wartość podobieństwa genetycznego pomiędzy parami genotypów została obliczona według wzoru ( $GS_{ij}$ ) [Nei i Li 1979]:

$$GS_{ij} = 2N_{ij} / (N_i + N_j)$$

gdzie:  $GS_{ij}$  to wartość podobieństwa między genotypem  $i$  oraz  $j$ ;  $N_{ij}$  to liczba wspólnych prążków dla  $i$  oraz  $j$ ;  $N_i + N_j$  określają liczbę wszystkich prążków obecnych odpowiednio u genotypów  $i$  oraz  $j$ .

## WYNIKI BADAŃ

Realizacja badań przebiegała zgodnie z harmonogramem. W przeprowadzonym teście szklarniowym oceną podatności na porażenie przez *Blumeria graminis* objęto ogółem 163 genotypy pochodzące z trzech stacji hodowli roślin (Choryń, Laski, Smolice) oraz Katedry Genetyki, Hodowli Roślin i Nasiennictwa Uniwersytetu Przyrodniczego we Wrocławiu. W pierwszym doświadczeniu oceniono stopień porażenia mączniakiem prawdziwym rodów z doświadczenia wstępnego, Smolic oraz Katedry. Średni stopień porażenia badanych materiałów żyta był istotnie różny i wynosił od 1,3 do 3 (zgodnie z przyjętą czterostopniową skalą podaną wcześniej). Wyniki oceny badanych genotypów przedstawiono w tabeli 1. Wśród badanych materiałów można wyróżnić formy wykazujące wyższą odporność na porażenie przez mączniaka od odmiany wzorcowej Bosmo, które uzyskało ocenę 2. Były to jedynie dwa genotypy UP 08/2/130 (ocena 1,3) i UP 08/2/171 (ocena 1,3). Ponadto dwie badane formy żyta dorównywały odpornością odmianie Bosmo. Pozostałe badane genotypy nie wykazały odporności na mączniaka prawdziwego w warunkach sztucznej inokulacji.

Przeprowadzono również analizę wariancji w celu sprawdzenia istotności zróżnicowania pod względem odporności na mączniaka badanych materiałów żyta. Ocena stopnia porażenia przeprowadzono w czterostopniowej skali bonitacyjnej, dlatego otrzymane wyniki nie spełniały warunków koniecznych do wykonania analizy wariancji. W celu uzyskania ciągłości rozkładu oraz rozkładu normalnego wyniki surowe poddano transformacji według wzoru podanego przez Węgrzyna in. 1996. Dopiero otrzymane po transformacji wyniki poddano obliczeniom statystycznym. Wykonana analiza wariancji pozwoliła na odrzucenie hipotezy zerowej o braku zróżnicowania genotypów pod względem odporności. Stwierdzono, zatem różną podatność badanych genotypów żyta ozimego na porażenie przez mączniaka prawdziwego (tabela 3).

Na podstawie średnich wartości z oceny porażenia przez mączniaka podzielono genotypy żyta na grupy jednorodne przy pomocy testu Duncana. Wyodrębnienie grup jednorodnych genotypów odbywało się na wartościach przetransponowanych, natomiast w tabeli 3 zestawiano również wartości po ponownym ich przeliczeniu na skalę oceny. Test Duncana pozwolił na podział ocenianych genotypów żyta ozimego na pięć rozdzielnych grup jednorodnych. Na wyróżnienie zasługują formy UP 08/2/130 i UP 08/2/171, które znalazły się jedynie w pierwszej grupie jednorodnej genotypów żyta o najwyższej odporności na mączniaka prawdziwego. Genotypy UP 08/107 i UP 08/2/140 utworzyły wraz z odmianą Bosmo drugą grupę jednorodną form o nieco niższej, jednak na poziomie odmiany wzorcowej, odporności. Pozostałe badane genotypy wykazały istotnie niższą odporność od odmiany wzorcowej Bosmo.

Wśród badanych materiałów żyta nie stwierdzono występowania form całkowicie odpornych na mączniaka prawdziwego (*Blumeria graminis*), jednak na uwagę jako źródło odporności, które nie obniżają wartości cech użytkowych mogą być wykorzystane w programach krzyżowań UP 08/2/130 i UP 08/2/171.

Wśród drugiej grupy testowanych genotypów wystąpiło 14 ocenionych lepiej od odmiany wzorcowej Bosmo. Na uwagę zasługuje genotyp CHD Ma 53, wykazujący dużą odporność na mączniaka prawdziwego, który w jednym powtórzeniu otrzymał ocenę najwyższą, a w drugim ocenę 1. Większość z badanych form żyta wykazywała większą wrażliwość na porażenie mączniakiem prawdziwym od odmian wzorcowych Bosmo i Dańkowskie Diament. Wykonana analiza wariancji wykazała istotne zróżnicowanie badanych genotypów żyta pod względem odporności na porażenie przez mączniaka prawdziwego. Porównanie średnich obiektów testem Duncana pozwoliło na podział genotypów żyta na cztery zachodzące na siebie grupy jednorodne. Do pierwszej grupy najbardziej odpornych na

mączniaka prawdziwego form zaliczono CHD Ma 53, a do drugiej CHD Ma 43. Pozostałe badane genotypy wykazują odporność na poziomie lub poniżej odmian.

Na bazie otrzymanych w poprzednim roku rodów CHD Ma 9 i CHD Ma 19 i CHD Ma 24 wykazujące największą odporność na mączniaka przekrzyżowano z własnymi materiałami żyta posiadanymi w kolekcji Katedry. Wyniku tego programu krzyżowań uzyskano nowe populacje mieszańców, z których można będzie wyprowadzić wartościowe odporne materiały wyjściowe.

W celu uzyskania informacji o genach odporności na mączniaka prawdziwego oraz przeprowadzić ich identyfikację w materiałach będących w posiadaniu Katedry i hodowców, przeprowadzona zostanie ich charakterystyka molekularna oraz dokonana zostanie próba opracowania skutecznego systemu weryfikacji tych materiałów przy pomocy markerów molekularnych. Wykorzystując znane z literatury markery SSR do genów odporności na mączniaka (Pm), przy użyciu posiadanych sekwencji primerów do genów Pm4, Pm5a-5e i Pm37 przeprowadzona zostanie identyfikacja tych genów w materiałach żyta ozimego. W tym celu z siewek żyta przed ich inokulacją został pobrany materiał do izolacji DNA. Wykorzystane zostaną następujące markery SSR:

1/ dla Pm4

marker Xgwm611

Forward

5'-CATGGAAACACCTACCGAAA-3'

Reverse

5'-CGTGCAAATCATGTGGTAGG-3'

2/ dla Pm5 -dla wszystkich alleli-od Pm5a do Pm5e

Xgwm577

5' ATGGCATAATTTGGTGAAATTG 3'

5' TGTTTCAAGCCCAACTTCTATT 3'

Xwmc581

Forward 5'-cATgTTgccATcAAAcTcgc-3'

Reverse 5'-gctaTTgAcATgcAAcTATggAcct-3'

3/ dla Pm37

Xgwm332

Forward primer:5'-AGCCAGCAAGTCACCAAAAC-3'

Reverse primer:5'-AGTGCTGGAAAGAGTAGTGAAGC-3'

Pozwoli to na weryfikację materiałów żyta pod kątem obecności genów odporności na mączniaka prawdziwego.

Przeprowadzono także charakterystykę molekularną i analizę podobieństwa genetycznego otrzymanych w poprzednim roku form żyta ozimego przy użyciu markerów molekularnych RAPD. Zastosowane startery RAPD wygenerowały ponad 40 polimorficznych markerów. Największą liczbą wygenerowanych markerów charakteryzował się starter OPA16 dając 14 produktów amplifikacji. Najmniej różnicujących markerów wytworzyły startery OPA8 oraz OPA20 dając po 7 produktów amplifikacji.

Na rysunkach 1- 3 przedstawiono przykładowe wyniki rozdziału produktów amplifikacji DNA linii żyta ozimego przy zastosowaniu różnych primerów. Prążki widoczne na rysunkach są charakterystyczne dla produktu amplifikacji i określonej wielkości par zasad. Część prążków jest wspólna dla wszystkich genotypów, a niektóre są tzw. prążkami charakterystycznymi tylko dla określonego genotypu.

Profile genetyczne, ze względu na dominujący charakter markerów RAPD, zapisywano w układzie zero – jedynkowym, gdzie 1 oznacza obecność prążka, a 0 – fenotyp null – bez prążka. Podobieństwo genetyczne i dendrogram otrzymano przy użyciu programu POPGENE i TREEVIEW, przy użyciu wzoru  $GS_{ij}$  (Nei i Li 1979) i zastosowaniu hierarchicznego algorytmu analizy skupień (UPGMA).

Obliczanie podobieństwa genetycznego porównywanych genotypów, linii, czy odmian sprowadza się do ustalania częstości wspólnych prążków. Wśród dystansów uzyskanych na podstawie analiz RAPD największa wartość dzieliła linie CHDMA 8 i CHDMA 23. Dystans genetyczny pomiędzy tymi liniami wynosił 1,0473. Najmniejsza odległość genetyczna odnotowana została dla linii CHDMA 16 i CHDMA 17, dystans wynosił 0,0357.

Uzyskany na podstawie rozdziału elektroforetycznego dendrogram podobieństwa (rys. 4) genetycznego wykazuje duże podobieństwo badanych form żyta. Posiadają one dość jednorodną strukturę genową pod względem zastosowanych markerów RAPD. Otrzymany dendrogram rozdzielił badane genotypy na dwie główne grupy skupień. Podział ten może stanowić wskazówkę przy doborze materiałów wyjściowych do hodowli nowych heterozyjnych odmian żyta. Spośród badanych genotypów żyta największą odległością genetyczną od pozostałych wykazała forma CHD Ma 8, która stanowi odrębną grupę filogenetyczną. Spośród zastosowanych starterów najwięcej polimorficznych prążków

różnicujących badane genotypy żyta dał OPA16, natomiast startery OPA8 i OPA20 nie różnicowały, bądź różnicowały w niewielkim stopniu badane genotypy żyta ozimego.

#### **CELE PROJEKTU:**

Ocena odporności na mączniaka prawdziwego (*Blumeria graminis*) genotypów żyta pod wpływem sztucznej inokulacji.

Wyprowadzenie form odpornych na tego patogenna i przekazanie ich do kolekcji materiałów wyjściowych.

Izolacja DNA z siewek żyta w celu identyfikacji genów odporności na mączniaka prawdziwego.

Wykorzystanie markerów molekularnych do identyfikacji genów odporności na mączniaka prawdziwego (Pm) w materiałach żyta.

Opracowanie skutecznego systemu weryfikacji materiałów genetycznych żyta pod kątem genów odporności na mączniaka prawdziwego przy pomocy markerów molekularnych.

Dr hab. Henryk Bujak prof. nadzw.

#### Literatura:

Arseniuk E., Oleksiak T., Strzębicka A., Reszka E., Poznań W. 2006. Occurrence and relative importance of triticale diseases in Poland. 6th International Triticale Symposium. Stellenbosch, South Africa, 3–7 September 2006, Programme and Abstracts, 22 ss.

Bojarczuk M., Bojarczuk J. 1985. Breeding of rye resistance to fungal diseases. Proc Eucarpia Meet Cereal Sect. On Rye, Svalov, Sveden., 351-364.

Bowen K.L., Everts K.L., Leath S. 1991. Reduction in yield of winter wheat in North Carolina due to powdery mildew and leaf rust. Phytopathology 81: 503–511.

Griffey C.A., Das M.K. 1994. Inheritance of adult-plant resistance to powdery mildew in Knox 62 and Massey winter wheats. Crop Sci. 34: 641–646.

Imani Y., Ouassou A., Griffey C.A. 2002. Review of investigations of *Erysiphe graminis* Dc. Ex Merat f. sp. *tritici* Em. Marchal population in Yugoslavia. Plant Dis. 86 (4): 383–388.

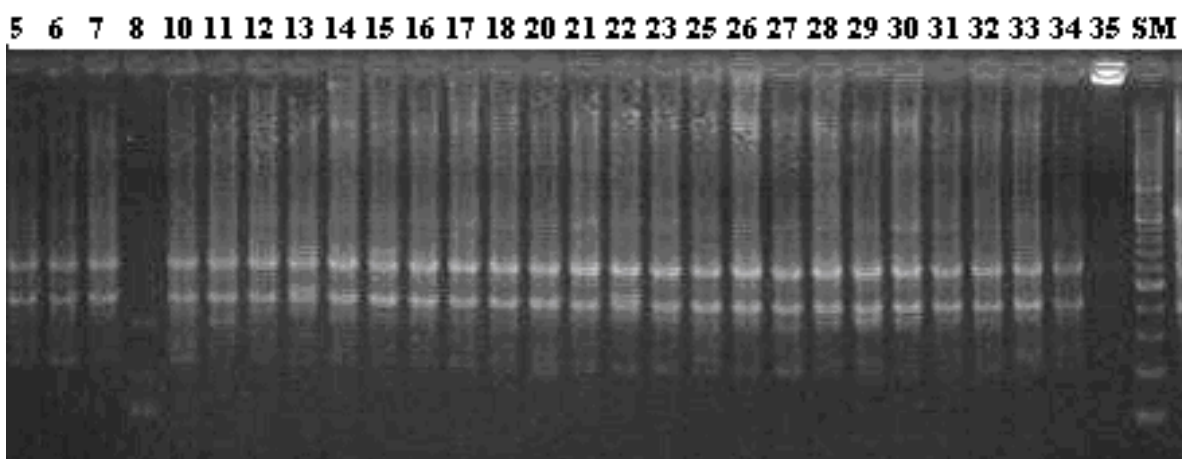
Leath S., Bowen K.L. 1989. Effects of powdery mildew, triadimenol seed treatment and triadimefon foliar sprays on yield of winter wheat in North Carolina. Phytopathology 79: 152–155.

Menzies J.G., MacNeill B.H., Gang P. 1989. Virulence spectrum of *Erysiphe graminis* f. sp. *tritici* in southern Ontario in 1986 and 1987. Can. J. Pl. Pathol. 11 (2): 148–152.



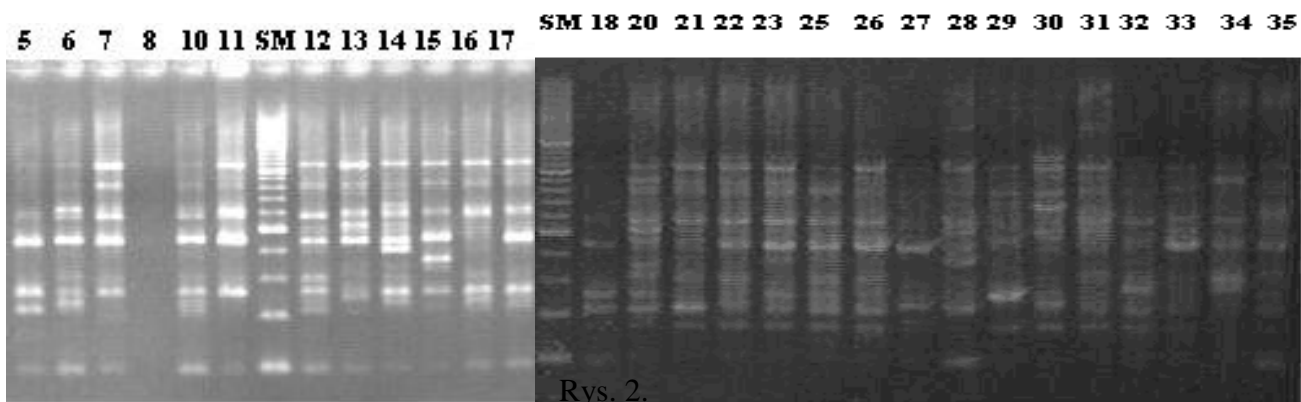
- Ralski E., Woźniak-Strzębicka A. 1972. Studia nad mączniakiem pszenicy (*Erysiphe graminis* DC. f. sp. *tritici*) I. Biologiczne zróżnicowanie patogena. II. Formy odporne. Biul. IHAR 3–4: 21–28.
- Roelfs A.P., Singh R.P., Saari E.E. 1992. Rust diseases of wheat; concepts and methods of disease management. Mexico D.F., CIMMYT, 81 ss.
- Schlegel R., Melz G. 1996. Genetic linkage map of ray (*Secale cereale* L.). Vortr. Pflanzenzuchtg. 35: 311–321.
- Rzepka – Plevnes D., Bojarczuk J. 1995. Trwałość odporności na mączniaka prawdziwego (*Erysiphe graminis* D.C. f. sp. *secalis* Marschal) w populacjach mieszańców międzygatunkowych żyta. Hod. Rośl. Akł. Nas., 39, 6, 51-65.
- Rzepka- Plevnes D., Łapiński M., Bojarczuk J. 1990. Odporność na mączniaka prawdziwego (*Erysiphe graminis* D.C. f. Sp. *Secalis* Marschal) mieszańców międzygatunkowych żyta. Hod. Rośl. Akł. Nas., 34, 5/6, 73-85.
- Stojanovic S., Stojanovic J., Ognjanovic R. 1990. Virulence spectrum of *Erysiphe graminis* f. sp. *graminis* in southern Ontario in 1986 and 1987. Zaštita Bilja 41 (4): 463–473.
- Strzębicka A. 2007. Występowanie mączniaka prawdziwego (*Blumeria graminis* sp.) na pszenżyte w Polsce. Konferencja Naukowa „Nauka dla hodowli roślin uprawnych”. Zakopane, 29.01.–02.02.2007, Streszczenia, s. 42.
- Wakuliński W., Zamorski Cz., Nowicki B., Schollenberger M., Mirzwa-Mróż E., Mikulski W., Konieczny M. 2005. Grzyb *Blumeria graminis* (DC) Speer poważnym zagrożeniem dla pszenżyta. Prog. Plant Protection/Post. Ochr. Roślin 45: 505–510.
- Wakuliński W., Zamorski Cz., Nowicki B. 2007. Podatność odmian i linii hodowlanych pszenżyta na porażenie przez *Blumeria graminis* (DC) Speer. Progress in Plant Protection / Postępy w Ochronie Roślin, 47: 361-365.
- Zamorski Cz., Schollenberger M., Nowicki B. 1994. The role of Triticale as host of wheat and rye pathogens. Genet. Pol. 35B: 143–155.

Tabela 1



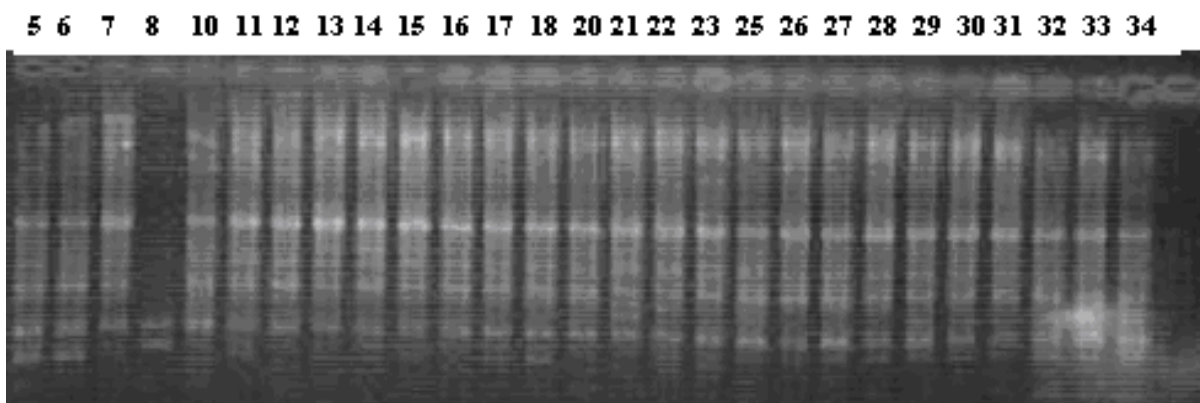
Rys. 1.

Rozdział produktów amplifikacji dla genotypów żyta przy użyciu startera OPA8



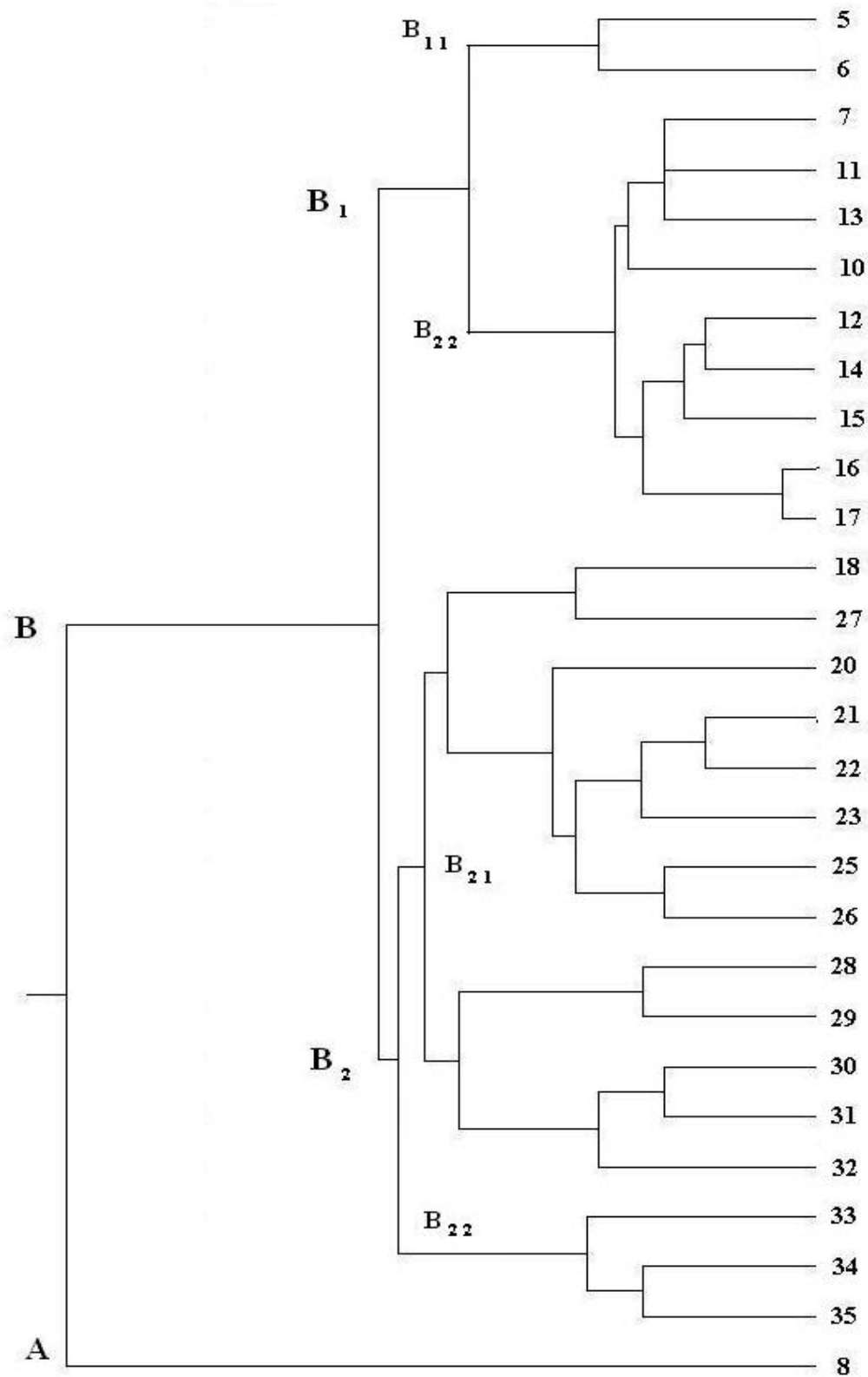
Rys. 2.

Rozdział produktów amplifikacji dla genotypów żyta przy użyciu startera OPA16



Rys. 3.

Rozdział produktów amplifikacji dla genotypów żyta przy użyciu startera OPA20



Rys. 4.  
 Podobieństwo genetyczne pomiędzy badanymi formami żyta ozimego

