

SPRAWOZDANIE MERYTORYCZNE
z realizacji zadania na rzecz postępu biologicznego
w produkcji roślinnej w 2021 roku

Tytuł zadania

Występowanie *Puccinia graminis*
na pszenicy i pszenżycie, jego zróżnicowanie
oraz poszukiwanie fenotypowych, molekularnych
i metabolicznych markerów odporności na rdzę źdźbłową

Decyzja MRiRW:

KS.zb.802.13.2021 z dnia 20 maja 2021 r., zadanie nr 8

Okres realizacji zadania:

01.01.2021–31.12.2021

Podmiot realizujący zadanie:

Politechnika Bydgoska im. Jana i Jędrzeja Śniadeckich

Kierownik zadania:

dr hab. inż. Grzegorz Lemańczyk, prof. PBŚ

Pracownia Mykologii Molekularnej, Fitopatologii i Entomologii

Katedra Biologii i Ochrony Roślin

Wydział Rolnictwa i Biotechnologii PBŚ

Al. prof. Sylwestra Kaliskiego 7, 85-796 Bydgoszcz

tel.: +48 52 3749491 / +48 52 3749342

e-mail: Grzegorz.Lemanczyk@pbs.edu.pl

Wykonawcy zadania:

dr inż. Anna Baturó-Cieśniewska

dr inż. Dariusz Kulus

dr inż. Aleksander Łukanowski

dr inż. Natalia Miler

Pomoc techniczna:

mgr Karol Lisiecki

dr inż. Sebastian Sendel

1. Tytuł zadania

Występowanie *Puccinia graminis* na pszenicy i pszenżycie, jego zróżnicowanie oraz poszukiwanie fenotypowych, molekularnych i metabolicznych markerów odporności na rdzę żdźbłą

2. Cele zadania

Celem zadania jest określenie nasilenia występowania *Puccinia graminis* na pszenicy i pszenżycie w Polsce, stworzenie krajowej kolekcji izolatów tego patogena, zbadanie wrażliwości genotypów zbóż (odmian, rodów, linii hodowlanych) oraz poszukiwania markerów fenotypowych, molekularnych i metabolicznych do identyfikacji genów odporności na rdzę żdźbłą zbóż i traw.

3. Opis tematów badawczych

3. 1. Temat badawczy 1

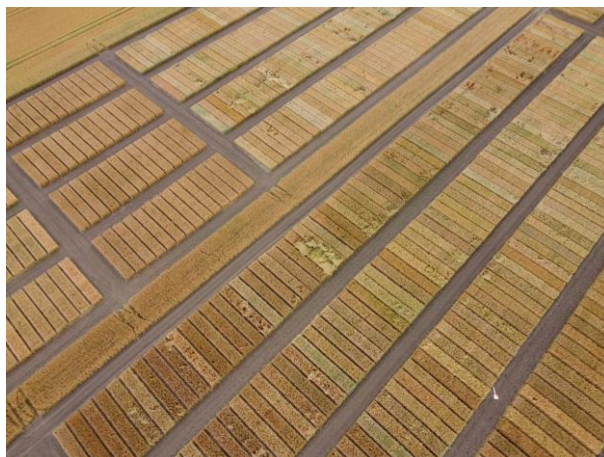
Określenie nasilenia występowania rdzy żdźbłowej w uprawach pszenicy i pszenżyta w Polsce

Cel tematu badawczego 1

Celem tematu było określenie nasilenia występowania rdzy żdźbłowej w uprawach pszenicy i pszenżyta w Polsce.

Materiały i metody

Przeprowadzono ocenę nasilenia występowania objawów chorobowych rdzy żdźbłowej zbóż i traw na pszenicy i pszenżycie na polach produkcyjnych oraz poletkach doświadczalnych należących głównie do Centralnego Ośrodka Badania Odmian Roślin Uprawnych (COBORU) zlokalizowanych w różnych rejonach Polski, reprezentujących powierzchnię kraju i poszczególne województwa. Kryterium wyboru pól do planowanych obserwacji nasilenia występowania rdzy żdźbłowej była wstępna informacja od pracowników COBORU poszczególnych Stacji Doświadczalnych Oceny Odmian dotycząca występowaniu objawów tej choroby. Ocenę wykonywano również w Zakładzie Hodowli Roślin w Dębnie należącym do DANKO Hodowla Roślin Sp. z o.o. Ponadto oceniano nasilenie objawów tej choroby na polach produkcyjnych pszenicy i pszenżyta. Założeniem było objęcie obserwacjami wszystkich województw Polski. Oceniano procent źdźbeł z objawami rdzy żdźbłowej. Przeprowadzono ją w lipcu. Ponadto pobierano próbki źdźbeł, na których widoczne były objawy rdzy żdźbłowej do dalszych etapów badań w ramach projektu.



Fot. 1. Doświadczenia z odmianami pszenicy i pszenżyta uprawianymi w SDOO COBORU w Pawłowicach – jedna ze stacji w których wykonywano oceny występowania objawów rdzy żdźbłowej.



Fot. 2. Doświadczenia z odmianami pszenicy i pszenżyta uprawianymi w ZDOO COBORU w Lućmierzu – jedna ze stacji w których wykonywano oceny występowania objawów rdzy żdźbłowej.

Wyniki

W trakcie obserwacji prowadzonych w 2021 roku nie stwierdzono występowania objawów rdzy żdźbłowej zarówno na pszenicy jak i pszenżycie uprawianych na polach produkcyjnych. Zapewne przyczyniła się do tego stosowana ochrona fungicydowa na tych polach gdyż w 2021 r. była duża presja ze strony rdzy brunatnej i rdzy żółtej. W związku z tym prowadzono intensywną ochronę przed tymi chorobami, która zapewne chroniła również przed rdzą żdźbłową.

Wyraźne objawy rdzy żdźbłowej obserwowano na poletkach doświadczalnych prowadzonych przez Centralny Ośrodek Badania Odmian Roślin Uprawnych oraz firmy zajmujące się hodowlą odmian zbóż. Na pszenicy najczęściej objawów rdzy żdźbłowej stwierdzono w województwie podkarpackim, następnie śląskim, świętokrzyskim, łódzkim, małopolskim, pomorskim, kujawsko-pomorskim, lubuskim, zachodniopomorskim i opolskim. Objawów tej choroby nie stwierdzono w województwie dolnośląskim, lubelskim, mazowieckim, podlaskim, warmińsko-mazurskim i wielkopolskim. Najwięcej objawów obserwowano na roślinach pszenicy uprawianych w Zakładzie Doświadczalnym COBORU w Dukli.



Fot. 3. Objawy rdzy żdźbłowej na roślinach pszenicy ozimej



Fot. 4. Objawy rdzy żółtej na roślinach pszenżyta ozimego

Średnio mniej objawów chorobowych rdzy żółtej obserwowano na pszenicy. Na tej roślinie najczęściej objawów choroby stwierdzono w województwie podkarpackim, następnie łódzkim, zachodniopomorskim, pomorskim i kujawsko-pomorskim. W pozostałych województwach nie stwierdzono objawów tej choroby na pszenicy. Spośród analizowanych miejscowości najczęściej objawów stwierdzono również w w Dukli.

Wnioski

- A) Przeprowadzone badania dostarczyły wstępnych informacji o aktualnym nasileniu występowania rdzy żółtej zbóż i traw na roślinach pszenicy i pszenżyte, we wszystkich województwach Polski.
- B) W 2021 roku nie stwierdzono występowania objawów rdzy żółtej zarówno na pszenicy jak i pszenżyte uprawianych na polach produkcyjnych.
- C) Wyraźne objawy rdzy żółtej obserwowano na poletkach doświadczalnych, z różnymi genotypami zbóż. Na pszenicy i pszenżyte najczęściej objawów rdzy żółtej stwierdzono w województwie podkarpackim.

3.2. Temat badawczy 2

Utworzenie krajowej kolekcji izolatów *Puccinia graminis*.

Cel tematu badawczego 2

Celem tematu jest utworzenie krajowej kolekcji izolatów *Puccinia graminis* przez pozyskanie zarodników letnich sprawcy rdzy żółtej (uredospor).

Materiały i metody

W celu utworzenia krajowej kolekcji izolatów *Puccinia graminis* podczas wykonywania ocen nasilenia występowania objawów rdzy żółtej pobierano próbki, na które składały się fragmenty źdźbeł roślin pszenicy, pszenżyta a także żyta z wyraźnymi objawami tej choroby. Próbkę te pobierano z odmianowych poletek doświadczalnych COBORU, zlokalizowanych w różnych rejonach Polski, w trakcie prowadzenia monitoringu, podczas obserwacji prowadzonych na zróżnicowanych genotypach zbóż. Ponadto otrzymywano je ze stacji doświadczalnych należących do firm zajmujących się hodowlą zbóż. Próbek takich nie pobrano z pól produkcyjnych zbóż ponieważ nie stwierdzono na nich występowania objawów rdzy żółtej na pszenicy i pszenżyte. Kilkunastocentymetrowe fragmenty źdźbeł badanych zbóż z objawami porażenia przez *P. graminis* / uredinia z uredosporami zostały

umieszczone w papierowych torebkach. W laboratorium została potwierdzona przynależność gatunkowa zebranych izolatów, a następnie ich zarodniki zostały przeniesione do probówek typu Eppendorf i umieszczone w zamrażarce w temperaturze -75°C . Tak zabezpieczone próbki przechowywane są następnym etapów badań.



Fot. 5. Fragment źdźbła z urediniami i uredosporami *P. graminis* pobierany do laboratorium w celu stworzenia kolekcji izolatów

Wyniki

W trakcie prowadzonych badań pozyskano 245 próbek źdźbeł z objawami rdzy źdźbłowej. Spośród nich przeprowadzono selekcję i wybrano 40 izolatów *P. graminis*. Pierwszym etapem była wstępna identyfikacja gatunkowa przy użyciu mikroskopu lub binokularu w celu upewnienia się czy zebrany materiał badawczy stanowi *P. graminis*. Do kolejnych analiz izolaty zostały namnożone na młodych siewkach odmiany wykazującej wysoką podatność na rdzę źdźbłową. Propagacja uredospor została przeprowadzona w komorze wilgotnościowej, w której zostały umieszczone siewki po zainfekowaniu zarodnikami uzyskanymi z fragmentów pobranych wcześniej roślin z objawami chorobowymi.

Została zweryfikowana patogeniczność poszczególnych izolatów, uzyskanych z różnych roślin żywicielskich, w stosunku do pszenicy i pszenżyta, co jest objęte kolejnym tematem badawczym (temat badawczy nr 3). Pojawiające się na roślinach uredospory są zbierane i kolekcjonowane. Jednak pojawiają się zanieczyszczenia pogarszają jakość tych izolatów. Nowe generacje uredospor uzyskane na liściach zostały z nich przeniesione do probówek typu Eppendorf i w celu długotrwałego przechowywania w zamrażarce (-75°C).

Wnioski

A. W trakcie prowadzonych badań pozyskano 245 próbek źdźbeł z objawami rdzy źdźbłowej. Spośród nich wytypowano 40 izolatów *P. graminis* do dalszych badań, stanowiących zaczątki kolekcji izolatów tego grzyba.

3.3. Temat badawczy 3

Badania zróżnicowania populacji *Puccinia graminis*

Cel tematu badawczego 3

Celem tematu było określenie stopnia zróżnicowania genetycznego populacji *Puccinia graminis*. Cel ten został osiągnięty częściowo.

Materiały i metody

W badaniach wykorzystano izolaty *P. graminis* zgromadzone w kolekcji. W pierwszym etapie przeprowadzono identyfikację w celu potwierdzenia przynależności izolatów do *P. graminis* za pomocą mikroskopu.

- Weryfikacja różnicowania genetycznego izolatów *Puccinia graminis*

Zostały podjęte próby przeprowadzenia analizy różnicowania genetycznego między uzyskanymi izolatami *P. graminis*. Analiza dotyczyć miała regionów ITS (Internal Transcribed Spacers) pozwalających na określenie polimorfizmu badanej populacji *P. graminis*. By przeprowadzić powyższe analizy konieczne było pozyskanie czystego materiału genetycznego *P. graminis*. W związku z czym przetestowano cztery różne metody pozyskiwania uredospor, uzyskiwanych na roślinach testowych po wykonaniu sztucznej inokulacji różnymi izolatami *P. graminis* zgromadzonymi w ramach kolekcji. Badania te prowadzono w komorze wzrostowej.

Reakcje PCR przeprowadzono w termocyklerze, w mieszaninie reakcyjnej zawierającej premiks, startery oraz matrycę DNA według protokołów reakcyjnych właściwych dla amplifikowanych fragmentów DNA. Obecność produktów reakcji została sprawdzona elektroforetycznie na żelu agarozowym. Produkty reakcji zostały poddane oczyszczeniu z pozostałości poreakcyjnych i sekwencjonowaniu. Niestety jakość pozyskanego DNA nie pozwoliła na wykonanie wszystkich analiz.

- Badania patogeniczności izolatów *P. graminis*

Badania dotyczące testowania patogeniczności/wirulencji izolatów *P. graminis* przeprowadzono w warunkach kontrolowanych, na roślinach pszenicy i pszenżyta, na odmianach wykazujących wysoką podatność na rdzę źdźbłową zaobserwowaną w trakcie prowadzenia obserwacji polowych, tj. odpowiednio SY Dubaj oraz SU Tadeus. Przebadano 40 izolatów *P. graminis* pozyskanych w ramach tworzonej kolekcji. Doświadczenie założono w szklarni. Ziarno zbóż wysiewano do podłoża specjalistycznego Klassman Substrate Select na bazie torfu wysokiego. Do przygotowanych doniczek 13x13 cm inokulację wybranymi izolatami *P. graminis* przeprowadzano w fazie dwóch-trzech liści.

Proces inokulacji poprzedzał zabieg aktywowania/pobudzenia urediniospor *P. graminis*, tak aby mogły zająć procesy infekcyjne. Proces ten przeprowadzono na podstawie zaadaptowanej metody Sørensen i in. (2017). Inokulację przeprowadzano poprzez nanoszenie atomizerem na powierzchnię roślin wspomnianej zawiesiny, według metodyki zaproponowanej przez Sørensen i in. (2017). Następnie rośliny okrywano foliowymi kapturkami

Po upływie 2 tygodni od inokulacji dokonano obserwacji objawów chorobowych na materiale roślinnym. W tym celu wykorzystano skalę zaproponowaną przez McNeal i in. (1971). Rośliny ewaluowano w skali od 0 do 10 na podstawie występujących objawów. Następnie nadziemną część rośliny pobierano i zabezpieczano do dalszych analiz poprzez zamrożenie w -75°C .



Fot. 6. Testowanie w szklarni patogeniczności izolatów *P. graminis*

Wyniki

- Weryfikacja zróżnicowania genetycznego izolatów *Puccinia graminis*

Zostały podjęte próby przeprowadzenia analizy zróżnicowania genetycznego między izolatów *Puccinia graminis*. Niestety jakość pozyskanego DNA nie pozwoliła na wykonanie wszystkich analiz. Wstępnie wykonane analizy nie dały czystego obrazu. W trakcie wzrostu roślin oprócz objawów rdzy pojawiła się również grzybnia *Blumeria graminis*, której DNA mogło zanieczyścić próbki. By uzyskać wiarygodne wyniki konieczne jest powtórzenie badań, począwszy od namnożenia zarodników poszczególnych izolatów *P. graminis*.

- Badania patogeniczności izolatów *P. graminis*

W trakcie badań obserwowano stosunkowo małe nasilenie objawów chorobowych powodowanych przez testowane izolaty *P. graminis*. Nie wszystkie izolaty *P. graminis* spowodowały wystąpienia objawów. Wartość indeksu chorobowego na pszenicy wahała się w granicach od 0,0 do 15,48%. Najsilniejsze objawy wywołał izolat Pg142, następnie Pg143. Wartość indeksu chorobowego na pszenicy wahała się w granicach od 0,0 do 21,14%. Najsilniejsze objawy wywołał izolat Pg208 (z pszenicy ozimego) oraz Pg337 (z żyta ozimego).

Wnioski

- A. Przeprowadzone analizy dowiodły zróżnicowania izolatów *P. graminis* pod względem ich patogeniczności. Dla pszenicy najbardziej wirulentnymi izolatami były Pg142 i Pg143, a dla pszenicy - Pg208 i Pg337.
- B. Ze względu na problemy, które pojawiły się podczas namnażania czystych kultur *P. graminis* na materiale roślinnym w warunkach laboratoryjnych niemożliwym było zbadanie zróżnicowania genetycznego populacji tego patogena.

3.4. Temat badawczy 4

Poszukiwanie markerów molekularnych do identyfikacji genów odporności zbóż na *Puccinia graminis*.

Cel tematu badawczego 4

Celem tematu było oznaczenie zróżnicowania genetycznego wyselekcjonowanych genotypów roślin (gatunków, odmian, linii hodowlanych), wskazanie najlepszego systemu markerowego do identyfikacji genotypów u badanych gatunków oraz wskazanie najlepszego systemu markerowego do identyfikacji zmienności pomiędzy genotypami badanych gatunków oraz wskazanie potencjalnych genetycznych markerów odporności wspomagających hodowlę opartą na markerach (marker-assisted breeding, MAS).

Materiały i metody

W 2021 roku dla 10 genotypów pszenicy i 10 genotypów pszenicy przeprowadzono analizy dotyczące molekularnych markerów odporności. Ze względu na brak genotypów mogących stanowić linie kontrolne w badaniach nie zastosowano obiektów kontrolnych, do których można by odnosić uzyskane wyniki. Również w literaturze nie znaleziono informacji o genotypach, które sklasyfikowano by jako bardzo wrażliwe lub odporne na porażenie przez *Puccinia graminis*. Genotypy do badań wybrano na podstawie danych uzyskanych w trakcie realizacji niniejszego projektu, jak również informacji przekazanych przez hodowców.

a) Charakterystyka zróżnicowania genetycznego badanych genotypów pszenicy i pszenicy

Badanie zróżnicowania genetycznego wyselekcjonowanych genotypów pszenicy i pszenicy oparto na systemach markerowych SCoT (Start Codon Targeted), RAPD

(Randomly Amplified Polymorphic DNA) i ISSR (Inter-Simple Sequence Repeat).

Nasiona wyselekcjonowanych genotypów (po 10 genotypów pszenicy i pszenżyta wysiano w szklarni Wydziału Rolnictwa i Biotechnologii, po około 10 dniach od skiełkowania, pobierano liście w celu izolacji genomowego DNA. Z każdego genotypu izolowano DNA z siedmiu roślin. Genomowe DNA wyizolowano przy użyciu zestawu kolumnowego Genomic Mini AX Plant Spin. DNA matrycowe zawieszono w buforze TE i przechowywano w temperaturze -80°C . Stężenie i czystość genomowego DNA oznaczano za pomocą QuantiFluor dsDNA System.

Spośród łącznie 30 starterów dla systemów markerów RAPD, ISSR i SCoT wybrano 15 starterów (po pięć dla każdego systemu markerowego) dających powtarzalne prążki na bazie DNA wyekstrahowanego z roślin pszenicy i pszenżyta. Amplifikowane fragmenty DNA rozdzielono na 1,5% żelu agarozowym, w buforze TBE. Detekcję prążków uzyskano dzięki barwieniu żelu bromkiem etydyny. Wizualizację produktów PCR przeprowadzono w świetle UV za pomocą GelDoc System. Obrazy żelu rejestrowano i analizowano przy użyciu oprogramowania GelAnalyzer 2010. Wielkość fragmentów DNA oszacowano przy użyciu wzorca DNA o wielkości 100-5000 pz. Wiarygodne, powtarzalne *loci* rejestrowano przy użyciu systemu binarnego, wskazując obecność lub brak prążków odpowiednio jako 1 i 0, na tej bazie utworzono macierze binarne służące dalszej analizie.

Analizę zmienności genetycznej i charakterystykę zróżnicowania genetycznego przeprowadzono z wykorzystaniem oprogramowania GenAlEx 6.5 oraz pakietu Statistica 13.3. Przeprowadzono analizę wariancji molekularnej (AMOVA).

Na podstawie współczynników dystansu genetycznego Neia przeprowadzono analizę skupień i wykreślono dendrogramy. Przeprowadzono analizę zróżnicowania pomiędzy genotypami w obrębie danego gatunku z wykorzystaniem metody analizy wielowymiarowej (PCoA) na podstawie matrycy binarnej i obliczonych euklidesowych odległości dystansu genetycznego. Obliczono stopień polimorfizmu wewnątrz genotypów (wyrażony jako udział procentowy *loci* polimorficznych) oraz poziom heterozygotyczności.

b) Poszukiwanie markerów odporności na *Puccinia graminis* Pers. u wybranych genotypów pszenicy i pszenżyta.

Z bazy internetowej maswheat.ucdavic.edu wybrano 10 markerów genów odporności. Przeprowadzono reakcję PCR z wykorzystaniem starterów flankujących wybrany gen odporności. Przebadano po trzy rośliny reprezentujące każdy genotyp pod kątem obecności markerów odporności. Na podstawie protokołów zawartych w bazie markerów przeprowadzono reakcje PCR, dostosowując temperaturę przyłączania do średniej temperatury T_m dla obu starterów. Produkty reakcji rozdzielano elektroforetycznie w żelu agarozowym oraz wizualizowano, zgodnie z procedurą opisaną powyżej. Wielkość produktów oznaczano z wykorzystaniem programu komputerowego GelAnalyzer 10.0. Wyniki amplifikacji porównywano z oczekiwanymi produktami wskazanymi w protokołach z bazy markerów odporności maswheat.ucdavic.edu. Oznaczano częstotliwość występowania danego markera odporności wśród badanych genotypów oraz łączną liczbę markerów w każdym genotypie.

Wyniki

a) Charakterystyka zróżnicowania genetycznego badanych genotypów pszenicy i pszenżyta

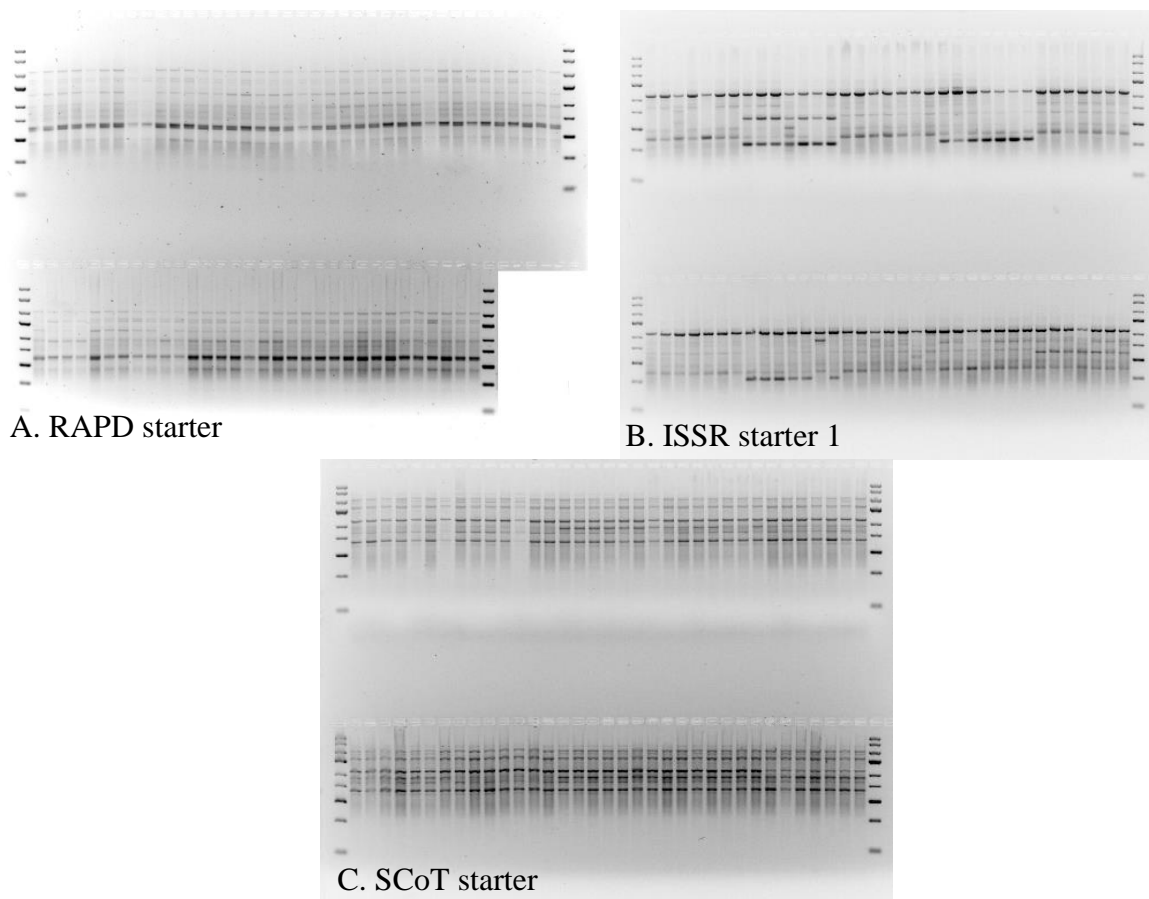
Pszenica

Analiza produktów PCR pozwoliła na wskazanie łącznie 116 *loci*, każdy starter średnio generował 7-8 *loci*. Liczba *loci* generowanych przez poszczególne systemy markerowe była zbliżona i wynosiła 41 dla RAPD, 38 dla ISSR oraz 37 dla SCoT. Informatywność poszczególnych systemów markerowych była różna: najwyższy średni stopień polimorfizmu wyrażony udziałem procentowym *loci* polimorficznych uzyskano po amplifikacji ze starterami ISSR. Wspólna analiza matrycy binarnej uzyskanych *loci* z trzech systemów markerowych pozwoliła na obliczenie ogólnego średniego poziomu polimorfizmu pomiędzy

roślinami reprezentującymi dany genotyp na poziomie 2,16%.

Wśród badanych genotypów najbardziej wyrównane okazały się SY Dubaj oraz STH 9 – żaden z systemów markerowych nie zidentyfikował polimorfizmu między badanymi roślinami w obrębie każdego z tych genotypów. Świadczy to o wysokim stopniu homozygotyczności tych dwóch genotypów i ma swoje odzwierciedlenie w zerowej wartości heterozygotyczności.

Najwyższy stopień zróżnicowania genetycznego między osobnikami jednego genotypu stwierdzono w genotypie SMH 378. Genotyp MHR-PP-6519 również cechował relatywnie wysoka heterozygotyczność oraz udział *loci* polimorficznych. Umiarkowanie wysoką zmiennością wewnątrzgenotypową charakteryzowały się genotypy POB 0521, DL 806/18 oraz AND 90/18. Powyższe wyniki sugerują wysokie ustabilizowanie genotypów SY Dubaj oraz STH 9, które mogą stanowić bardzo dobry materiał dla hodowli mieszańcowej.

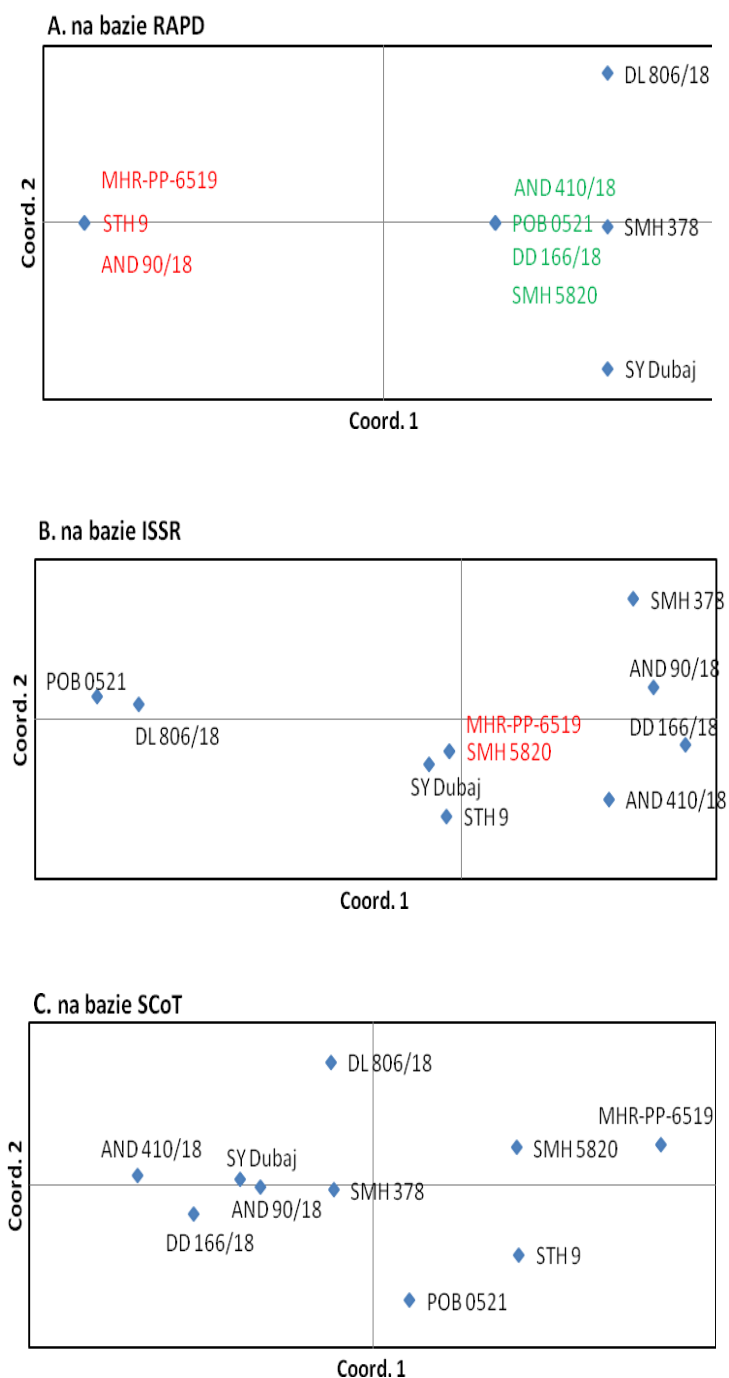


Ryc. 1. Przykładowe obrazy wzorów prążków DNA pszenicy uzyskane na żelu agarozowym po rozdziale elektroforetycznym produktów PCR wykonanych zgodnie z założeniami danego systemu markerowego: RAPD (A), ISSR (B) oraz SCoT (C).

Analiza zmienności molekularnej (AMOVA), zidentyfikowała zmienność wewnątrz genotypów na niewielkim poziomie 14% w analizie wspólnej dla wszystkich systemów markerowych. AMOVA wskazuje również jednoznacznie na istotne różnice między badanymi genotypami pszenicy, zmienność między genotypami oznaczono na poziomie 86% w analizie wspólnej dla trzech systemów markerowych. Każdy z wykorzystanych systemów markerów okazał się efektywny w segregowaniu badanych genotypów ($\Phi_{PT} > 0$), przy czym tylko system RAPD wskazał jako jedyne źródło zmienności, zmienność między genotypami, pozostałe (ISSR i SCoT) zidentyfikowały zmienność wewnątrz genotypów na poziomie (odpowiednio) 18% i 19%.

zróżnicowane między sobą, że możliwe jest ich zidentyfikowanie za pomocą markerów molekularnych RAPD, ISSR i SCoT. Jak pokazała analiza wielowymiarowa PCoA, w tym celu szczególnie efektywne były markery SCoT, za pomocą których możliwe było

wyodrębnienie każdego z badanych genotypów, podczas gdy markery RAPD wskazały istnienie dwóch grup identycznych genotypów (nie różnicowały genotypów MHR-PP-6519, STH, AND 90/18 oraz AND 410/18. POB 0521, DD 166/18 i SMH 5820), a markery ISSR nie różnicowały genotypów MHR-PP-6519 i SMH 5820.



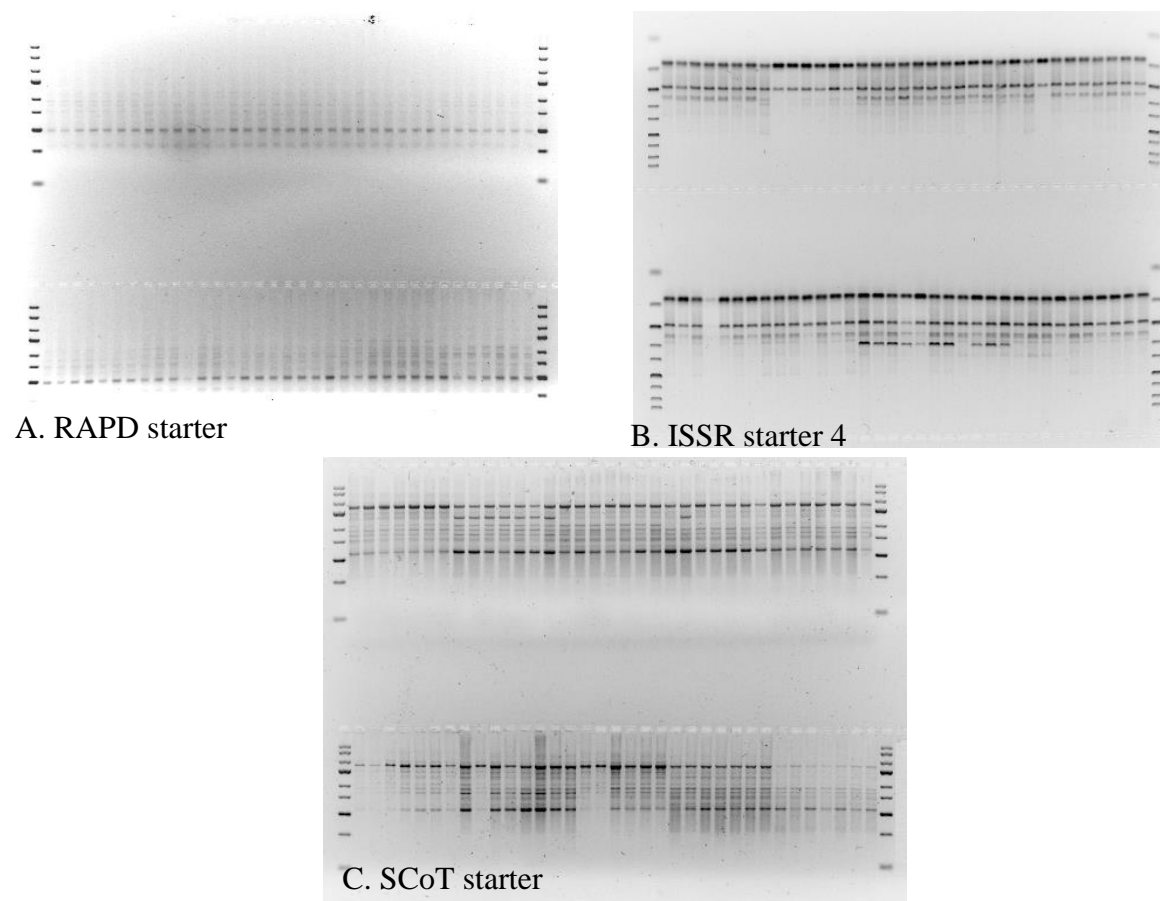
Ryc. 2. Analizy wielowymiarowe (PCoA) zmienności genetycznej pomiędzy badanymi genotypami pszenicy sporządzone na podstawie odległości euklidesowych wyliczonych na bazie markerów genetycznych RAPD (A), ISSR (B) oraz SCoT (C). Kolorem czerwonym i zielonym oznaczono genotypy, pomiędzy którymi nie stwierdzono różnic.

Analiza skupień przeprowadzona na podstawie współczynnika dystansu genetycznego Neia potwierdziła wyniki uzyskane w analizie wielowymiarowej, najwyższe współczynniki dystansu pomiędzy genotypami uzyskano na podstawie markerów SCoT, wszystkie genotypy różniły się między sobą.

Pszenżyto

Podobnie jak u pszenicy, także u pszenżyta efektywność systemów markerowych była zróżnicowana. Średnia liczba *loci* generowanych przez markery RAPD, ISSR i SCoT była zbliżona do wartości dla pszenicy. Jednakże szczegółowa analiza wzorów prążkowych ujawniła dużo niższy stopień polimorfizmu genotypów pszenżyta niż pszenicy pomiędzy roślinami należącymi do poszczególnych genotypów (wyrażony udziałem *loci* polimorficznych i wartością heterozygotyczności).

Brakiem zróżnicowania wewnątrz populacji roślin reprezentujących jeden genotyp charakteryzowała się połowa badanych genotypów: DC 67/14, Lombardo, Orinoko, SUTadeus i DC 15138-146. Największy udział *loci* polimorficznych i najwyższą heterozygotyczność stwierdzono u genotypu MAH 36642-3.



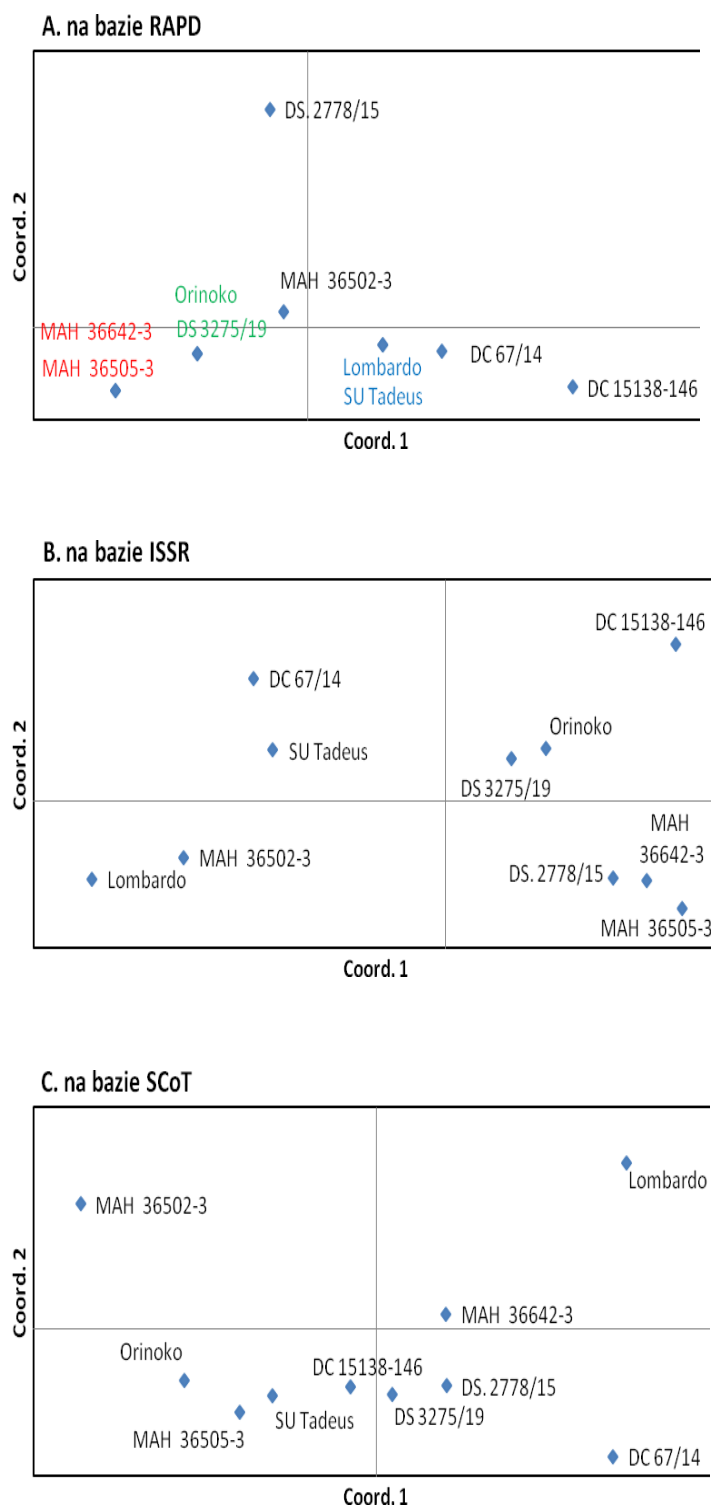
Ryc. 3. Przykładowe obrazy wzorów prążków DNA pszenicy uzyskane na żelu agarozowym po rozdziale elektroforetycznym produktów PCR wykonanych zgodnie z założeniami danego systemu markerowego: RAPD (A), ISSR (B) oraz SCoT (C).

Markery RAPD charakteryzowały się najmniejszą efektywnością różnicowania roślin należących do poszczególnych genotypów, wewnątrz żadnego genotypu nie ujawniły się *loci* polimorficzne. Najlepszą informatywnością charakteryzował się dla pszenżyta system ISSR, za pomocą którego zidentyfikowano *loci* polimorficzne u 3 genotypów.

Analiza zmienności molekularnej AMOVA wykazała wysoką efektywność zastosowanych systemów markerowych w segregacji poszczególnych genotypów, wskazując bardzo wysoki udział zmienności między genotypami. Należy to interpretować tak, że wyselekcjonowane do badań genotypy pszenżyta różnią się istotnie między sobą pod względem genetycznym, natomiast pomiędzy osobnikami należącymi do jednego genotypu zmienność genetyczna jest mała. Badane genotypy pszenżyta należy uznać za stabilne i homozygotyczne w wysokim stopniu.

Na podstawie analizy wielowymiarowej PCoA oraz dendrogramów wykreślonych na

bazie dystansu genetycznego Neia stwierdzono niską przydatność systemu RAPD do identyfikacji poszczególnych genotypów – uzyskano klastry genotypów o identycznej pozycji na wykresie analizy wielozmiennych oraz o zerowym współczynniku dystansu genetycznego. Za pomocą markerów RAPD nie można zróżnicować genotypów MAH 36642-3 i MAH 36502-3; Orinoko i DS 3275/19; Lombardo i SU Tadeus.



Ryc. 4. Analizy wielowymiarowe (PCoA) zmienności genetycznej pomiędzy badanymi genotypami pszenżyta sporządzone na podstawie odległości euklidesowych wyliczonych na bazie markerów genetycznych RAPD (A), ISSR (B) oraz SCoT (C). Kolorem czerwonym, zielonym i niebieskim oznaczono genotypy, pomiędzy którymi nie występują różnice.

Najbardziej równomierną dystrybucję genotypów pszenżyta w analizie wielozmiennych oraz najwyższe wartości współczynników dystansu genetycznego zaobserwowano po zastosowaniu markerów ISSR. System markerowy SCoT również skutecznie różnicował wszystkie badane genotypy, ale ich rozproszenie na wykresie analizy wielozmiennych było mniejsze, co znalazło także wyraz na dendrogramie w postaci klastra złożonego z genotypów: MAH 36505-3, DS 3275/19, MAH 36642-3, Orinoko, SU Tadeus, DC 15138-146 oraz DS. 2778/15.

b) Poszukiwanie markerów odporności na *Puccinia graminis* u wybranych genotypów pszenicy i pszenżyta

W wyniku reakcji łańcuchowej polimerazy z wybranymi starterami identyfikującymi geny odporności na rdzę żdźbłową w genomowym DNA badanych roślin stwierdzono różnice w występowaniu poszczególnych markerów odporności u różnych genotypów pszenicy i pszenżyta.

Stwierdzono obecność markerów odporności we wszystkich badanych genotypach obu gatunków zbóż, ale ich liczba była zróżnicowana. Najwięcej, pięć markerów odporności stwierdzono u trzech genotypów pszenicy AND 410/18, DL 806/18, STH 9 oraz aż u siedmiu genotypów pszenżyta DC 67/14, MAH 36505-3, DS 3275/19, MAH 36642-3, Lombardo, SU Tadeus, DS. 2778/15. Markery odporności genów *Sr32*, *Sr35* i *Sr49* były obecne we wszystkich badanych genotypach zarówno pszenicy, jak i pszenżyta, przy czym marker genu *Sr32* był polimorficzny dla dwóch genotypów pszenicy (POB 0521 i DD166/18), a także dla pszenżyta MAH 36505-3, tzn. nie u wszystkich roślin reprezentujących dane genotypy uzyskano produkty amplifikacji markera csSr32#1 o długości 184bp. Polimorficzne okazały się także markery genów *Sr35* dla genotypu AND90/18 oraz *Sr49* dla SY Dubaj.

Popularny marker genu odporności *Sr22* WMC633 nie został stwierdzony u żadnego genotypu pszenicy, natomiast był amplifikowany u wszystkich genotypów pszenżyta. Dodatkowo u jednej rośliny DC 67/14 oraz wszystkich roślin należących do genotypów Orinoko i DC15138-146 amplifikowany był fragment DNA o długości 260 bp, charakterystyczny dla genotypów wrażliwych na rdzę żdźbłową, co świadczy, że te rośliny są heterozygotami pod względem genu odporności *Sr22*.



Ryc. 5. Obraz elektroforetycznego rozdziału produktów PCR dla genu *Sr32* (marker csSr32#1) u pszenicy. O odporności na rdzę żdźbłową świadczy obecność prążka o długości 184 bp (czerwona strzałka).



Ryc. 6. Obraz elektroforetycznego rozdziału produktów PCR dla genu *Sr24* (marker Sr24#12) u pszenicy. O odporności na rdzę żdźbłową świadczy obecność prążka o długości 500 bp (czerwona strzałka).



Ryc. 7. Obraz elektroforetycznego rozdziału produktów PCR dla genu *Sr22* (marker WMC633) u pszenżyta. O odporności na rdzę żdźbłową świadczy obecność prążka o długości 117 bp (czerwona strzałka).

Wnioski

- A) Wyselekcjonowane do badań genotypy pszenicy i pszenżyta różnią się istotnie między sobą pod względem genetycznym, natomiast występująca w obrębie poszczególnych genotypów zmienność genetyczna jest mała.
- B) Badane genotypy należy uznać za stabilne i w wysokim stopniu homozygotyczne. Szczególnie wyrównane są genotypy pszenżyta, w przypadku pszenicy zmienność jest nieco większa.
- C) Przeprowadzone analizy dowiodły zróżnicowanej przydatności poszczególnych systemów markerów molekularnych w detekcji zmienności genetycznej u pszenicy i pszenżyta. Najbardziej skuteczne w identyfikowaniu odmian badanych gatunków są markery SCoT u pszenicy, natomiast u pszenżyta markery ISSR i SCoT. Najmniej efektywne w identyfikowaniu genotypów oraz w oznaczaniu polimorfizmu w obrębie genotypów są markery RAPD.
- D) Wszystkie badane genotypy pszenicy i pszenżyta posiadają markery odporności na rdzę żdźbłową. Markery genów *Sr 32*, *Sr 35* i *Sr 49* zidentyfikowano u wszystkich badanych genotypów. Świadczy to o wysokim potencjale odporności badanych genotypów na rdzę żdźbłową.
- E) Badane genotypy pszenżyta charakteryzują się większą częstotliwością występowania markerów genów odporności *Sr* niż badane genotypy pszenicy. Najwięcej (pięć) markerów odporności stwierdzono w trzech genotypach pszenicy: AND 410/18, DL 806/18, STH 9 oraz w siedmiu genotypach pszenżyta: DC 67/14, MAH 36505-3, DS 3275/19, MAH 36642-3, Lombardo, SU Tadeus, DS. 2778/15. Najmniej markerów odporności na rdzę żdźbłową zidentyfikowano w genotypie pszenicy POB 0521, u której potwierdzono obecność trzech markerów, w tym jeden polimorficzny.

3.5. Temat badawczy 5

Wrażliwość genotypów pszenicy i pszenżyta na *Puccinia graminis*

Cel tematu badawczego 5

Celem tematu badawczego jest scharakteryzowanie genotypów pszenicy i pszenżyta (odmian, rodów hodowlanych) pod kątem wrażliwości na rdzę żdźbłową. Cel ten został osiągnięty. Wytypowano odmiany o mniejszej wrażliwości na porażenie, jednakże nie wyodrębniono genotypów całkowicie odpornych.

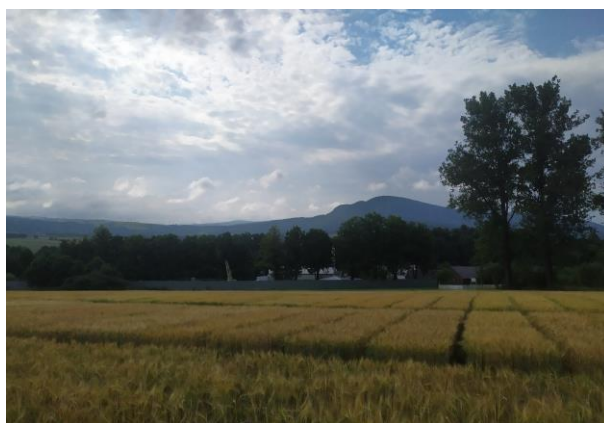
Materiały i metody

Badania dotyczące wrażliwości genotypów zbóż prowadzone będą w warunkach polowych i laboratoryjnych (laboratoryjne testy fizjologiczne żywicieli-patogen).

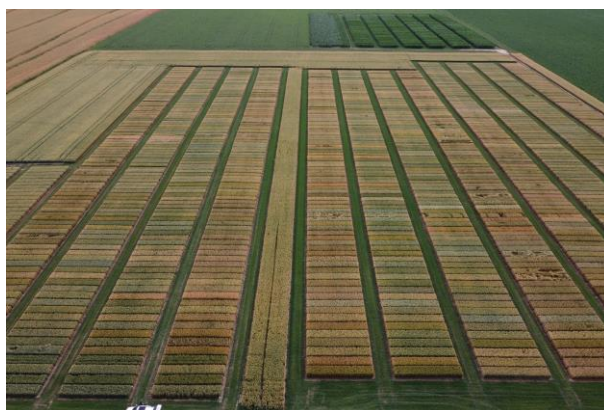
- Testy polowe

Obserwacje występowania rdzy żdźbłowej przeprowadzono na doświadczeniach należących do Centralnego Ośrodka Badania Odmian Roślin Uprawnych oraz firm zajmujących się hodowlą zbóż, będących partnerami projektu, tj. DANKO Hodowla Roślin Sp. z o.o., Hodowla Roślin Strzelce Sp. z o.o. Grupa IHAR, Hodowla Roślin Smolice Sp. z o.o. Grupa IHAR, Małopolska Hodowla Roślin Sp. z o.o., Poznańska Hodowla Roślin Sp. z o.o. W badaniach tych uwzględniono między innymi Stacje Doświadczalne Oceny Odmian, w których w trakcie realizacji tematu badawczego nr 1 zaobserwowano najwięcej objawów rdzy żdźbłowej. Obserwacje wrażliwości genotypów pszenicy i pszenżyta na *Puccinia graminis* prowadzono w miejscowościach, w których nasilenie objawów była większa, co pozwoliło na lepszą selekcję genotypów. Ze względu na to, iż najwięcej objawów chorobowych stwierdzono w Zakładzie Doświadczalnym Oceny Odmian w Dukli, dlatego dokładne wnioskowanie co do wrażliwości genotypów zbóż na *P. graminis* oparto na podstawie danych uzyskanych z tej miejscowości. Ponadto dokładną ocenę nasilenia

objawów rdzy źdźbłowej wykonano również w Stacji Doświadczalnej Oceny Odmian w Głubczycach. Ocena porażenia przez *P. graminis* w uprawach pszenicy i pszenżyta wykonana została w lipcu.



Fot. 7. Doświadczenia z genotypami pszenicy i pszenżyta uprawianymi w Zakładzie Doświadczalnym Oceny Odmian COBORU w Dukli



Fot. 8. Doświadczenia z genotypami pszenicy i pszenżyta uprawianymi w w Stacji Doświadczalnej Oceny Odmian w Głubczycach



Fot. 9. Objawy rdzy źdźbłowej na roślinach pszenicy ozimej (MHR-PP-6519) uprawianych w Zakład Doświadczalny Oceny Odmian COBORU w Dukli



Fot. 10. Objawy rdzy źdźbłowej na roślinach pszenżyta ozimego (DS 2778/15) uprawianych w Zakład Doświadczalny Oceny Odmian COBORU w Dukli

- Testy laboratoryjne - testy fizjologiczne żywiciel-patogen

Doświadczenia te prowadzone są w warunkach szklarniowych. Wrażliwość genotypów na rdzę źdźbłową oceniana jest w testach liściowych na roślinach pszenicy i pszenżyta. Badaniami objęte są już zarejestrowane odmiany pszenicy i pszenżyta oraz rody i linie hodowlane, udostępnione przez hodowców zbóż. W pierwszym etapie na młodych siewkach zbóż namnożono zarodniki wybranych izolatów *P. graminis*. W celu stworzenia warunków sprzyjających rozwojowi infekcji rośliny po inokulacji zostały przykryte na 48 godzin torebkami foliowymi. Wrażliwość poszczególnych genotypów zbóż została określona na podstawie obserwowanych zmian chorobowych stwierdzonych na liściach (na podstawie pojawienia się uredyniów, nekroz lub chloroz).

Wyniki

- Testy polowe

W 2021 roku w warunkach polowych najwięcej objawów chorobowych rdzy źdźbłowej na pszenicy i pszenżycie stwierdzono w Zakładzie Doświadczalnym Oceny Odmian w Dukli, dlatego wnioskowanie co do wrażliwości genotypów zbóż na *P. graminis* oparto głównie na podstawie danych uzyskanych z tej miejscowości. Spośród genotypów pszenicy najwięcej objawów chorobowych rdzy źdźbłowej obserwowano dla genotypu MHR-PP-6519. Objawów chorobowych nie obserwowano dla genotypów Chevignon i DNKO 55. Spośród genotypów pszenżyta najwięcej objawów chorobowych rdzy źdźbłowej obserwowano dla genotypu DS 2778/15. Dokładną ocenę nasilenia objawów rdzy źdźbłowej wykonano również w Stacji Doświadczalnej Oceny Odmian w Głubczycach. Objawy tej choroby obserwowano jednak tylko na roślinach pszenicy, nie było ich na roślinach pszenżyta. Jednak spośród 70 przebadanych genotypów stwierdzono je jedynie na 17 genotypach. W tej miejscowości ze względu na małą ilość objawów rdzy źdźbłowej nie można było jednoznacznie wytypować genotypów najbardziej wrażliwych na porażenie.

- Testy laboratoryjne - testy fizjologiczne żywiciel-patogen

Pomimo zastosowanej inokulacji roślin zarodnikami grzyba *P. graminis* na roślinach pszenicy oraz pszenżyta nie obserwowano objawów chorobowych rdzy źdźbłowej zbóż i traw. Może to sugerować, iż żaden z 80 genotypów pszenicy i 40 genotypów pszenżyta nie został porażony.

Wnioski

- A) W warunkach doświadczeń poletkowych stwierdzono zróżnicowanie w podatności genotypów pszenicy i pszenżyta na porażenie przez *P. graminis*. Na pszenicy najczęściej objawów chorobowych rdzy żdźbłowej obserwowano dla genotypu MHR-PP-6519, a spośród genotypów pszenżyta najczęściej było ich na roślinach genotypu DS 2778/15.
- B) Brak objawów rdzy żdźbłowej w teście laboratoryjnym nie pozwolił na określenie wrażliwości genotypów pszenicy i pszenżyta na porażenie przez *P. graminis*.

3.6. Temat badawczy 6

Poszukiwanie markerów metabolicznych wpływających na odporność zbóż na *Puccinia graminis*

Cel tematu badawczego 6

Celem tematu było wytypowanie potencjalnych mechanizmów obronnych przeciw *P. graminis* wśród badanych roślin na podstawie obecności i aktywności markerów molekularnych.

Materiały i metody

Prowadzono poszukiwania metabolicznych i enzymatycznych markerów, które mogą być odpowiedzialne za cechy odporności roślin na badanego patogena. Badania te przeprowadzono dla 10 genotypów pszenicy i 10 genotypów pszenżyta. Rośliny do badań uprawiano w komorze wzrostowej. Inokulację przeprowadzano poprzez nanoszenie atomizerem na powierzchnię roślin zawiesiny, według metodyki zaproponowanej przez Sørensen i in. (2017).

Po 7 dniach od procesu inokulacji dokonywano obserwacji objawów chorobowych na materiale roślinnym. W tym celu wykorzystano skalę zaproponowaną przez McNeal i in. (1971). Rośliny ewaluowano w skali od 0 (brak objawów) do 10 stopni (krytyczne porażenie ponad 90% powierzchni żdźbła) na podstawie występujących objawów. Następnie nadziemną część rośliny pobierano i zabezpieczano do dalszych analiz poprzez zamrożenie w -75°C .

Pozyskiwanie markerów odporności z tkanek genotypów roślin prowadzono wieloetapowo w zależności od kompleksu enzymatycznego (markery enzymatyczne) czy też grupy analitów (markery nieenzymatyczne). Oznaczane jest m. in. aktywność enzymów oraz zawartość wytypowanych związków organicznych biorących udział w odpowiedzi na infekcję *P. graminis*, t.j. chitynazy, β -1,3-glukanazy, zawartość reaktywnych form tlenu generowanych w czasie patogenez, zawartość metabolitów aktywnie biorących udział w mechanizmach obronnych czy stan lignifikacji ściany komórkowej. Metody analityczne oparte będą na spektrofotometrii, detekcji *in vivo*.

Chitynazy i β -1,3-Glukanazy (markery enzymatyczne CHI, β -GLU)

W celu wyekstrahowania markerów badanej grupy enzymatycznej wykorzystano zaadaptowane metody Zhang i in. (2013) będącej rozwinięciem metody według Miller (1959). Ekstrakcję markerów wykonano poprzez homogenizację naważki tkanki roślin. Otrzymany homogenat wirowano przy $15000 \times g$, w 4°C , przez 30 minut. Otrzymany supernatant zlewano i traktowano jako źródło markerów. W celu określenia aktywności enzymów chitynolitycznych wykorzystana została chityna koloidalna najwyższej czystości. Po inkubacji w celu wybarwienia ekwiwalentów glukozy uwalnianych z koloidalnej chityny wykorzystano reakcję z 1% kwasem 3,5-dinitrosalicylowym. Zawartość została odczytana na podstawie sporządzonej krzywej wzorcowej. W celu określenia aktywności β -1,3-glukanaz zastosowany został roztwór laminaryny pochodzącej od *Laminaria digitata*. Zawartość uwalnianych cukrów redukujących odczytano na podstawie krzywej kalibracyjnej.

Analiza zawartości wolnych cukrów

W celu analizy stopnia uwalniania wolnych cukrów (stanu zapotrzebowania

energetycznego tkanek) zastosowano zaadaptowaną metodę Manes (2010) i Bacete i in. (2017). Naważkę tkanki ucierano w alkoholu etylowym. Otrzymany supernatant stanowił źródło analitu. W celu oznaczenia wolnych cukrów ekstrakty alkoholowe wybarwione zostały za pomocą reakcji z 5% fenolem oraz stężonym kwasem siarkowym. Zawartość cukrów odczytana została z krzywej wzorcowej. Natomiast w celu oznaczenia skrobi w tkankach roślin osad pochodzący z etapu ekstrakcji alkoholowej wolnych cukrów poddany został hydrolizie w celu rozbicia wiązań w zawartej w tkankach skrobi. Zawartość cukrów prostych odczytana została na podstawie krzywej kalibracyjnej.

Analiza zawartości wolnych związków fenolowych

Analiza zawartości wolnych związków fenolowych przeprowadzona została za pomocą zaadaptowanej metody Dragišić-Maksimovic i Živanović (2012). Zawartość odczytano na podstawie krzywej kalibracyjnej sporządzonej na podstawie kwasu galusowego (GA), w czasie nie dłuższym niż 1 godzina.

Analiza zawartości H₂O₂

Analiza zawartości H₂O₂ w tkankach przeprowadzona została z wykorzystaniem zaadaptowanej metody Khakdan i in. (2016). Zawartość H₂O₂ w tkankach odczytano na podstawie krzywej kalibracyjnej.

Analiza stopnia lignifikacji tkanek

Analiza stopnia lignifikacji tkanek (LTGA) przeprowadzona została z wykorzystaniem zaadaptowanej metody Lloyd i in. (2017). Zawartość lignin odczytano z krzywej wzorcowej.

Wyniki

Markery enzymatyczne

Aktywność chitynolityczna na podstawie aktywności chitynaz.

W przypadku roślin pszenicy zaobserwowano największą aktywność chitynolityczną w tkankach pszenicy o numerze DD 166/18. Najmniejszą aktywnością charakteryzowały się natomiast tkanki pszenicy AND 410/18. W przypadku roślin pszenżyta, zaobserwowano, iż dwa genotypy charakteryzowało się zbliżoną aktywnością chitynolityczną, tj. DS 32 75/19 i SU Tadeus. Najmniejszą aktywnością charakteryzowały MAH 36505-3 oraz MAH 3664-3 jak również Lombardo.

Aktywność chitynolityczna na podstawie aktywności glukana

Największą, wyróżniającą aktywność glukana w czasie ekspozycji roślin na *P. graminis* zaobserwowano w tkankach roślin DD 166/18. Jednocześnie najmniejszą aktywnością charakteryzowały się rośliny AND 410/18. W przypadku roślin pszenżyta obserwowano zbliżoną aktywność dwóch genotypów w czasie ekspozycji roślin na patogeny. Największą aktywność obserwowano dla tkanek roślin DS. 27 78/15 oraz DS. 32 75/19. Najmniejszą aktywność obserwowano dla tkanek roślin MAH 36505-3.

Markery metaboliczne

Zawartość wolnych związków fenolowych

W przypadku parametru jakim była zawartość wolnych (niezwiązanych) związków o charakterze fenolowym obserwowano, że tkanki roślin DL 806/18 oraz STH 9 charakteryzowało się największą ilością badanego analitu. Najmniejszą zawartością charakteryzowały się tkanki roślin SMH 378 oraz POB 0521.

W przypadku roślin pszenżyta obserwowano największe stężenie badanego markera w tkankach DC 67/14. Najmniejsze stężenie obserwowano natomiast w tkankach trzech genotypów Orinoko, DC 15138-146 oraz MAH 36505-3.

Zawartość wolnych cukrów uwalnianych w tkankach roślin pszenicy w czasie trwania infekcji charakteryzowała się mniejszym zróżnicowaniem jak w przypadku wolnych

związków fenolowych. Najwięcej cukrów obserwowano w tkankach AND 410/18. Najmniej natomiast w tkankach MHR-PP-6519 oraz STH 9.

Bardzo podobny rozkład cechy obserwowano w przypadku roślin pszenżyta. Największą zawartość wolnych cukrów obserwowano w tkankach DS 3275/19, natomiast najmniejszą w DS 2778/15 oraz SU Tadeus.

Zawartość pochodnych lignin wyekstrahowanych ze świeżych tkanek roślin zaobserwowano iż genotyp SMH 5820 charakteryzował się najwyższą obserwowaną ilością. Najmniejszymi wartościami charakteryzowały się z kolei trzy genotypy POB 0521, SY Dubaj oraz DD 166/18.

W przypadku tkanek badanych genotypów pszenżyta, największą zawartością pochodnych lignin charakteryzowały się tkanki genotypu DS. 2778/15. Co istotne, obserwowano kilka genotypów pszenżyta, które charakteryzowały się wyraźnie mniejszą zawartością lignin. Były to takie genotypy jak MAH 36642-3, Orinoko, DC 15138-146, MAH 36505-3.

Zawartość wolnych reaktywnych form tlenu jest istotnym markerem stresu jakiemu poddane są tkanki roślin. Zaobserwowano pewne zróżnicowanie pod względem ilości generowanych RFT przez tkanki pszenicy. Największe ilości obserwowano w tkankach genotypu DD 166/18. Drugim genotypem pod względem ilości RFT okazał się DL 806/18. Najmniejszą zawartością charakteryzowały się trzy badane genotypy, SMH 378, AND 90/18 oraz POB 0521.

W przypadku roślin pszenżyta dało się zaobserwować pewne podobieństwa pod względem badanej cechy jak miało to miejsce w przypadku pszenicy. Największymi wartościami uwalnianych RFT charakteryzował się jeden genotyp DC 67/14, drugim w kolejności okazał się MAH 36502-3. Ponownie dało się zaobserwować genotypy o wyraźnej, mniejszej ilości generowanych RFT. Takie genotypy jak DC 15138-146 oraz SU Tadeus charakteryzowały się najniższymi obserwowanymi wartościami.

Wnioski

- B. Na podstawie przeprowadzonych badań zaobserwowano synergistyczne działanie niektórych markerów w odpowiedzi na inokulację badanym patogenem.
- C. Dotychczas przeprowadzone badania nie pozwalają na jednoznaczne wytypowanie potencjalnych mechanizmów obronnych przeciw *P. graminis* wśród badanych roślin na podstawie obecności i aktywności markerów molekularnych.