

Wykorzystanie markerów molekularnych i fenotypowych do identyfikacji genów odporności pszenicy na łamliwość źdźbła powodowaną przez *Oculimacula yallundae* i *O. aciformis*

Use of molecular and phenotypic markers to identify wheat eyespot resistance genes caused by *Oculimacula yallundae* and *O. aciformis*

Maciej Majka¹, Magdalena Gawłowska¹, Adriana Twardawska¹, Marek Korbas², Jakub Danielewicz², Tomasz Góral³, Bogusława Ługowska⁴, Jolanta Belter¹, Edward Witkowski⁵, Tadeusz Drzazga⁶, Przemysław Matysik⁷, Urszula Woźna-Pawlak⁸, Halina Wiśniewska¹ ✉

¹ Instytut Genetyki Roślin Polskiej Akademii Nauk, Strzeszyńska 34, 60-479 Poznań

² Instytut Ochrony Roślin — Państwowy Instytut Badawczy, Władysława Węgorka 20, 60-318 Poznań

³ Instytut Hodowli i Aklimatyzacji Roślin — Państwowy Instytut Badawczy, Radzików, 05-870 Błonie

⁴ DANKO Hodowla Roślin, Choryń 27, 64-000 Kościan

⁵ Hodowla Roślin Smolice, Grupa IHAR, Smolice 134, 63-740 Kobylin

⁶ Małopolska Hodowla Roślin, ul. Sportowa 21, 55-040 Kobierzyce

⁷ Hodowla Roślin Strzelce, Grupa IHAR, Główna 20, 99-307 Strzelce

⁸ Poznańska Hodowla Roślin, Antoniny 2, 64-100 Leszno

✉ e-mail: hwis@igr.poznan.pl

Łamliwość źdźbła to jedna z ważniejszych chorób pszenicy uprawnej (*Triticum aestivum* L.) powodowana przez dwa grzyby patogeniczne *Oculimacula yallundae* i *Oculimacula aciformis*. Istnieje kilka źródeł odporności na ten patogen, lecz jak dotąd tylko dwa geny *Pch1* i *Pch2* zostały przniesione do pszenicy uprawnej i warunkują odporność. Wybranie najkorzystniejszych markerów molekularnych dla określenia obecności genów odporności na łamliwość źdźbła u pszenicy może poprawić skuteczność i dokładność przy wyborze genotypów odpornych na tę chorobę. Celem pracy było określenie efektywności markerów molekularnych i markera izoenzymatycznego dla genów *Pch1* i *Pch2* oraz wytypowanie genotypów pszenicy ozimej o podwyższonej odporności w odniesieniu do porażenia roślin w testach inokulacyjnych przeprowadzonych w fazie siewki oraz rośliny dojrzałej. Materiał badawczy stanowiło 159 linii hodowlanych pszenicy ozimej oraz pięć odmian kontrolnych: Artist, Kilimanjaro, Kometa, Patras i Rendezvous. Do identyfikacji genów odporności wykorzystano pięć markerów, trzy do identyfikacji genu *Pch1* (*EpD1b*, *XustSSR2001-7DL*, *Xorw1*) oraz dwa dla genu *Pch2* (*Xcfa2040*, *Xwmc525*). Biorąc pod uwagę analizę molekularną genów, wyniki inokulacji siewek oraz wyniki porażenia źdźbeł dojrzałych roślin, stwierdzono brak objawów porażenia źdźbeł u linii/odmian pszenicy ozimej, u których zidentyfikowano oba geny *Pch1* i *Pch2*. Stwierdzono u nich również najniższe porażenie siewek. Najwyższy procent porażonych źdźbeł odnotowano u genotypów, gdzie nie stwierdzono genów *Pch1* i *Pch2*. U tych genotypów zaobserwowano również najwyższe porażenie w teście siewkowym. Wykazano, że obecność genów *Pch1* i *Pch2* lub ich brak nie wpływała istotnie na plon ziarna oraz na masę tysiąca ziarniaków (MTZ). U genotypów z genami *Pch1* i *Pch2* stwierdzono nieznacznie wyższe wartości dla obu parametrów technologicznych.

Słowa kluczowe: geny odporności, łamliwość źdźbła, *Pch1*, *Pch2*, *Triticum aestivum*

Eyespot is one of the most important diseases of wheat (*Triticum aestivum* L.), caused by two pathogenic fungi *Oculimacula yallundae* and *Oculimacula aciformis*. There are several sources of resistance to this pathogen, but so far only two genes *Pch1* and *Pch2* have been transferred to wheat and confer the resistance. The selection of the most favorable genetic markers for determining the presence of eyespot resistance genes may improve the efficiency and accuracy in the selection of wheat genotypes resistant for this disease. The aim of the work was to determine the effectiveness of molecular markers and protein marker for *Pch1* and *Pch2* genes and to select genotypes of winter wheat with increased resistance in relation to plant infection in inoculation tests carried out at the seedling and adult plant stage. Plant material consist of 159 breeding lines of winter wheat and five control varieties: Artist, Kilimanjaro, Kometa, Patras and Rendezvous. To identify resistant genes, five molecular markers were used. Three for *Pch1* gene (*EpD1b*, *XustSSR2001-7DL*, *Xorw1*) and two for *Pch2* gene (*Xcfa2040*, *Xwmc525*). Considering the molecular analysis of genes, results of seedlings inoculation and the results of plant stem infestation, it was found that there were no infection symptoms of stalks in the winter wheat lines and/or varieties, in which both *Pch1* and *Pch2* genes were identified. In these lines/varieties, the lowest infection of seedlings was also observed. The highest percentage of infected sheaths was identified in genotypes where *Pch1* and *Pch2* genes were not found. The highest seedling infection was also observed for these genotypes. It was shown that the presence of *Pch1* and *Pch2* genes or their absence did not significantly affect the grain yield and the thousands kernels weight (TKW). Genotypes with the *Pch1* and *Pch2* genes showed slightly higher values for both technological parameters.

Key words: resistance genes, eyespot, *Pch1*, *Pch2*, *Triticum aestivum*

Wstęp

Łamliwość źdźbła to jedna z ważniejszych chorób pszenicy uprawnej (*Triticum aestivum* L.) oraz innych zbóż. Powodowana jest przez dwa grzyby patogeniczne *Oculimacula yallundae* (Wallwork & Spooner) Crous & W. Gams i *Oculimacula aciformis* (Nirenberg) Y. Marin & Crous (Fron, 1912; Deighton, 1973). Występuje szczególnie podczas łagodnych zim i chłodnych wiosen, kiedy to na zewnętrznych pochwach liści pojawiają się 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 źdźbłę tworzy się watowata grzybnia. Podstawa źdźbła próchnieje, co może powodować zginanie lub łamanie się źdźbeł. Skutkuje to obniżką plonu nawet o 50% poprzez zmniejszenie długości kłosa, obniżenie masy 1000 ziarniaków oraz wyleganie (Fitt i in., 1988; Kwiatek i in., 2015; 2016; Korbas i in., 2017). Pszenica ozima jest w większym stopniu narażona na porażenie patogenicznymi grzybami z rodzaju *Oculimacula*, niż forma jara, ze względu na korzystne warunki środowiskowe dla infekcji w okresie jesiennym i zimowym (Murray, 2010).

Istnieje kilka źródeł odporności na łamliwość źdźbła m.in. odmiany Rendezvous, Annie, Hermann, Princeps, Manager (Dumalasova i in., 2015) oraz polska odmiana Kometa. Pomimo podwyższonej odporności roślin na patogeny grzybowe z rodzaju *Oculimacula*, odmiany te mogą cechować się niższą wartością technologiczną ze względu na połączenie z locus genów negatywnie wpływających na plonowanie (Dumalasova i in., 2015). Do tej pory tylko dwa geny *Pch1* i *Pch2* zostały przeniesione do pszenicy uprawnej i warunkują odporność. Najbardziej efektywny jest gen *Pch1*, który został zidentyfikowany w *Aegilops ventricosa* [$2n = 4x = 28$, $D^vD^vM^vM^v$] i translokowany do długiego ramienia chromosomu 7D pszenicy (Maia, 1967; Jahier i in., 1978; McMillin i in., 1986; Worland i in., 1988; Mena i in., 1992; Muranty i in., 2002). Nie zapewnia on całkowitej odporności rośliny, jednakże znacząco redukuje skalę porażenia oraz penetrację podstawy źdźbła przez grzyby z rodzaju *Oculimacula*. Dotychczas na rynek wprowadzono kilka odmian posiadających gen *Pch1*: Renan, Rendezvous, Roazon, Titlis (Dumalasova i in., 2015). Drugim genem, który w mniejszym stopniu warunkuje odporność na łamliwość źdźbła, jest *Pch2* zlokalizowany na długim ramieniu chromosomu 7A pszenicy odmiany Capelle-Desprez (Chapman i in., 2008), jednakże nie jest on homeologiem genu *Pch1*, znajdującego się w podobnej lokalizacji na chromosomie 7D (Pasquariello i in., 2017). Warunkuje on odporność w fazie siewki, jednak

posiada on mniejszą efektywność w zapobieganiu infekcji niż gen *Pch1* (Burt i in., 2014). Z tego względu gen *Pch2* może być traktowany jako dodatkowe źródło odporności pszenicy na łamliwość podstawy źdźbła.

Dotychczas opracowano kilka markerów sprzężonych z genem *Pch1* pozwalających na jego identyfikację. Jednym z nich jest translokowany do heksaploidalnej pszenicy, wraz z genem *Pch1*, locus kodujący endopeptydazę *EpD1b*. W pszenicy endopeptydaza 1 (*Ep-1*) jest kontrolowana przez 3 loci: *Ep-A1*, *Ep-B1* i *Ep-D1* zlokalizowane 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* prawie w 100% określa reakcję na porażenie grzybami *O. yallundae* i *O. aciformis* (Santra i in., 2006). Opracowano kilka markerów SSR dla genu *Pch1*, również powiązanych z locus *Ep-D1*: *XustSSR2001-7DL* (Santra i in., 2006; Leonard i in., 2008), *Xorw1*, *Xorw5*, *Xorw6*, *Xbarc97*, *Xwmc14*, *Xcfd175* i *Xgwm37* (Leonard i in., 2008). *Xorw1* to marker, który wykazuje całkowite sprzężenie z locus *Ep-D1* i genem *Pch1* (Leonard i in., 2008). *Xorw5* i *Xorw6* są również całkowicie sprzężone z genem *Pch1* wraz grupą loci mikrosatelitarnych *Xcfd175*, *Xbarc97* i *Xwmc14*. Markery *Xorw1*, *Xorw5* i *Xorw6* nie są polimorficzne dlatego ich dokładne położenie w długim ramieniu chromosomu 7D nie zostało określone. Natomiast locus markera *XustSSR2001-7DL*, leży w pewnej odległości od genu *Pch1* (4,1 cM). Leonard i in. (2008) określili, że markery *Xorw1*, *Xorw5* i *Xorw6* pozwalają na 100% określenie obecności lub braku genu *Pch1*, podczas gdy skuteczność markerów *Xgwm37*, *Xbarc76*, *XustSSR2001-7DL*, *Xwmc14*, *Xbarc97* i *Xcfd175* oszacowano na odpowiednio 95, 95, 98, 98, 93 i 77%. Zespół Meyer i in. (2011) badali korelacje występujące pomiędzy znanymi markerami. Określili, iż *Xorw1* w pełni pozwala na identyfikację genu *Pch1* u roślin, które wcześniej analizowano za pomocą markera *Ep-D1*, ze względu na ich pełną korelację ($r = 1,000$). *Xorw6* jak i *Xcfd175* również wykazują bardzo wysoką korelację, odpowiednio $r = 0,994$ i $r = 0,950$, natomiast *Xwmc14* oraz *Xbarc76* charakteryzuje niska korelacja względem *Ep-D1* ($r < 0,400$).

Drugim genem, który w mniejszym stopniu warunkuje odporność na łamliwość źdźbła jest *Pch2* zlokalizowany na dłuższym ramieniu chromosomu 7A pszenicy odmiany Capelle-Desprez.

Warunkuje on odporność już w fazie siewki. Mapowanie genetyczne chromosomu 7A przy użyciu kilku markerów SSR ujawniło iż dwa z nich, *Xcfa2040* oraz *Xwmc525* znajdują się w najbliższej odległości od genu *Pch2* oraz cechują się najwyższą istotnością w odporności na łamliwość źdźbła. Odpowiadają one za zmienność fenotypową badanych populacji odpowiednio w 30,7% i 36,3% (Chapman i in., 2008). Wybranie najkorzystniejszych markerów molekularnych dla określenia obecności genów odporności na łamliwość źdźbła u pszenicy może poprawić skuteczność i dokładność przy wyborze genotypów odpornych na tę chorobę.

Celem pracy było określenie efektywności markerów dla genów związanych z odpornością na łamliwość podstawy źdźbła powodowaną przez *O. yallundae* i *O. acufiformis* oraz wytypowanie genotypów pszenicy ozimej o podwyższonej odporności na łamliwość źdźbła na podstawie obecności markerów dla genów *Pch1* i *Pch2* oraz testów inokulacyjnych.

Material i metody

Material badawczy

Material badawczy stanowiło 159 linii hodowlanych pszenicy ozimej o zróżnicowanym podłożu genetycznym, uzyskanych z pięciu spółek hodowlanych (DANKO Hodowla Roślin Spółka z o.o., Hodowla Roślin Strzelce Grupa IHAR, Małopolska Hodowla Roślin Spółka z o.o., Poznańska Hodowla Roślin Spółka z o.o. oraz Hodowla Roślin Smolice-Grupa IHAR oraz pięć odmian kontrolnych: Artist, Kilimanjaro, Kometa, Patras i Rendezvous (wzorzec odporności).

Metody badawcze

W identyfikacji genów warunkujących odporność w badanych formach pszenicy wykorzystano pięć markerów. Dla genu *Pch1* dwa markery molekularne: *XustSSR2001-7DL* oraz *Xorw1*. Obecność genu *Pch1* była identyfikowana również przy użyciu markera izoenzymatycznego w postaci endopeptydazy *EpD1b*. Przy identyfikacji genu *Pch2* wykorzystano dwa markery molekularne: *Xwmc525* i *Xcfa2040* (tab. 1).

2a) Identyfikacja markera *EpD1b*

Analizę polimorfizmu enzymów prowadzono z młodych liści roślin rosnących w warunkach kontrolowanych w fitotronie (IGR PAN, Poznań). Rozcierano 2 cm² świeżej tkanki liściowej na blokach chłodzących w 0,5 ml buforu ekstrakcyjnego (glicyloglicyna pH 7,4). Fragmenty bibuły 6 × 4 mm nasączone ekstraktem roślinnym umieszczano w 10% żelu skrobiowego (bufor tris-citrate pH 7) i poddano wstępnej elektroforezie (20 min, 220 V, 40 mA). Po tym czasie usunięto bibuły i prowadzono elektroforezę przez ok. 4 godziny (240 V, 40 mA, 5°C). Żele cięto na plastry o grubości 1 mm i inkubowano w temperaturze 37°C przez godzinę w 0,7% roztworze niskotopliwej agarozы zawierającym 3 mg Fast Black K Salt i 5 mg BANA w 0,1 M Trizma maleate-NaOH — pH 6,4 (Santra i in., 2006; Wiśniewska i in., 2016, 2019).

2b) Identyfikacja markerów SSR: *XustSSR2001-7DL*, *Xorw1*, *Xcfa2040*, *Xwmc525*

Do badań nad identyfikacją markerów mikrosatelitarnych SSR (ang. Simple Sequence Repeats — proste sekwencje powtarzalne) pobierano oddzielnie material z każdej z pięciu

Tabela 1
Table 1

Markery molekularne wykorzystane w badaniach
Molecular markers used in the study

Lp. No.	Marker	Gen Gene	Sekwencje starterów (5'-3') Primers sequences (5'-3')	Lokalizacja w chromosomie Localization in chromosome	Literatura Literature	
1	<i>EpD1b</i>	<i>Pch1</i>		7D	McMillin i in. 1986	
2	<i>XustSSR2001-7DL</i>	<i>Pch1</i>	<i>XustSSR2001-7DL F</i>	CAT CGT GTG GCC AAC TTG TT	7D	Groenewald i in. 2003
			<i>XustSSR2001-7DL R</i>	TTC CTC GTG TCT AGT GTC TC		
3	<i>Xorw1</i>	<i>Pch1</i>	<i>Xorw1 F</i>	CTA TTA CAT GAA ATC TTA TTC TCC	7D	Leonard i in. 2008
			<i>Xorw1 R</i>	CAG CAG TAA CGA GAA TGT GG		
4	<i>Xcfa2040</i>	<i>Pch2</i>	<i>Xcfa2040 F</i>	TCA AAT GAT TTC AGG TAA CCA TA	7A	Chapman i in. 2008
			<i>Xcfa2040 R</i>	TTC CTG ATC CCA CCA AAC AT		
5	<i>Xwmc525</i>	<i>Pch2</i>	<i>Xwmc525 F</i>	GTT TGA CGT GTT TGC TGC TTA C	7A	Chapman i in. 2008
			<i>Xwmc525 R</i>	CTA CGG ATA ATG ATT GCT GGC T		

roślin badanego genotypu. Materiał roślinny w postaci liści 14-dniowych siewek pszenicy ozimej (faza rozwojowa: przed kłoszeniem) został zebrany do oddzielnych probówek typu Eppendorf (2 ml) i poddany głębokiemu mrożeniu (-80°C) w celu przechowania. Izolacja genomowego DNA z 5 roślin wszystkich analizowanych genotypów przeprowadzona była przy użyciu kitu do izolacji roślinnego genomowego DNA (EURx) według wytycznych producenta. Roztwór DNA przechowywany był w chłodziarce w temperaturze 4°C . Przedmiotem analiz była identyfikacja markerów *XustSSR2001-7DL* i *Xorw1* powiązanych z *locus* genu *Pch1*, warunkującego odporność na łamliwość podstawy źdźbła.

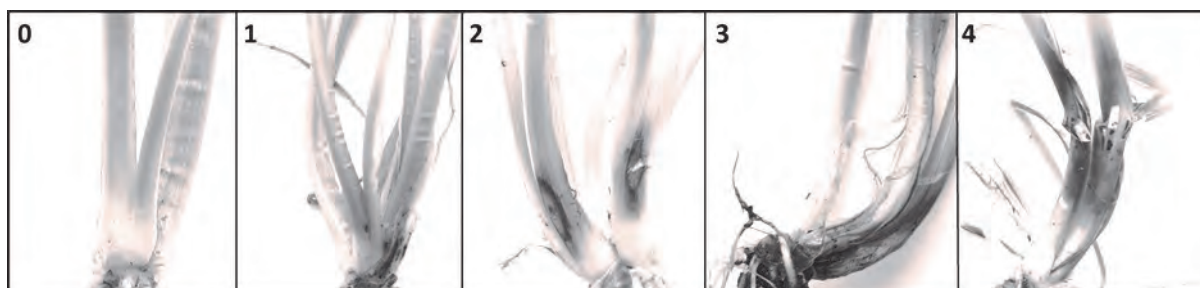
Ponadto wykonana została analiza molekularna obecności genu *Pch2*. Wykorzystane zostały również markery typu SSR: *Xwmc525* oraz *Xcfa2040* zlokalizowane na chromosomie 7A, które według map genetycznych są sprzężone z *locus* genu *Pch2*. Analizy markerów SSR sprzężonych z genami *Pch1* i *Pch2* polegały na amplifikacji fragmentów DNA za pomocą specyficznych starterów metodą PCR. Reakcję PCR wraz z elektroforezą wykonano na wyizolowanym DNA z wszystkich analizowanych genotypów w 5 powtórzeniach. Reakcje PCR zostały przeprowadzone zgodnie z procedurą dołączoną do 2x PCR TaqNovaHS PCR Master Mix (Blirt) w termocyklerze Labcycler Gradient (Sensoquest). Skład mieszaniny reakcyjnej obejmował Master Mix (zawierający polimerazę hot startową Taq), $10\ \mu\text{M}$ każdego startera F i R, matrycę DNA oraz wodę

dostarczoną przez producenta (Blirt). Temperatura przyłączenia starterów została ustalona empirycznie. Rozdział elektroforetyczny produktów amplifikacji przeprowadzono na żelu agarozowym (2–3%, Sigma), a wizualizację z wykorzystaniem systemu do archiwizacji (UVIsave HD5, Uvitec) (Kwiatak i in., 2012, 2015, 2016; Majka i in., 2018).

2c) Testy inokulacyjne

Testy inokulacyjne w fazie siewki (BBCH 12-13)

Testy inokulacyjne siewek w fazie trzech liści (164 genotypy) przeprowadzono w warunkach kontrolowanych w fitotronie (IGR PAN, Poznań). Do inokulacji wykorzystano szczepy *Oculimacula aciformis* i *O. yallundae* pochodzące z plantacji wielkoobszarowych pszenicy. Wyzolowane szczepy przechowywano na płytkach Petriego w laboratorium Zakładu Mykologii IOR — PIB w Poznaniu w temperaturze $4-5^{\circ}\text{C}$ i częściowo w zamrażarce (-70°C) na skosach. Szczepy namnażano na pożywce AGZ na szalkach Petriego przez 10–12 tygodni w temperaturze $12-14^{\circ}\text{C}$. Zarodnikowanie uzyskano poprzez poddawanie otrzymanych kultur czynnikom, takim jak promieniowanie ultrafioletowe (UV) i zmiany dobowe temperatury i światła w inkubatorach do hodowli grzybów 6h — UV, 12 światło. Zawiesinę grzybów do inokulacji wykonano poprzez zeskrobanie grzybni z płytek przerośniętych kulturami grzyba *O. yallundae* i *O. aciformis* w proporcji 1:1 oraz zmieszanie z wodą destylowaną. Liczbę zarodników ustalano przy pomocy komory Thoma (stężenie $4\ \text{mln}/1\ \text{ml}$). Inokulowano (pędzlowanie) po 5 siewek z każdego



Rys. 1. Ocena występowania objawów porażenia siewek z wykorzystaniem skali 0–4

- 0 — brak symptomów porażenia siewki
- 1 — niewielkie porażenie koleoptyla
- 2 — mniej niż 50% zainfekowanej powierzchni pochwy liściowej/obwodu źdźbła
- 3 — ponad 50% powierzchni obwodu źdźbła zainfekowanej
- 4 — 100% zainfekowanej powierzchni obwodu źdźbła (murszejąca tkanka)

Fig. 1. Evaluation of infection symptoms on seedlings using the 0–4 scale

- 0 — no symptoms of seedling infection
- 1 — slight coleoptile infection
- 2 — less than 50% of infected leaf sheaths
- 3 — more than 50% of the infected blade
- 4 — 100% of the infected blade (rotten tissue)

ze 164 genotypów pszenicy. Po inokulacji siewki hodowano w kontrolowanych warunkach temperatury (dzień 12°C — noc 10°C), oświetlenia (12 godz. długość dnia) i wilgotności (75%) przez okres 8 tygodni. Następnie siewki poddano wizualnej ocenie porażenia. Koleoptyle i pochwy liściowe odslaniano i oceniano występowanie objawów porażenia z wykorzystaniem skali zamieszczonej na rys. 1.

Testy inokulacyjne w fazie 1–2 kolanka (BBCH 31–32) — badanie odporności roślin dojrzałych

Testy inokulacyjne polowe wykonane zostały w Kopaszewie (Danko Hodowla Roślin Sp. z o.o.) w woj. wielkopolskim na 164 genotypach pszenicy ozimej w czterech powtórzeniach w drugiej dekadzie kwietnia 2018 roku. Poletka obejmowały 0,3 m² (na każde poletko wysiano 100 ziarniaków w dwóch rzędach). Przed siewem zastosowano nawożenie wieloskładnikowe: azotofosfor (Polidap) 60 kg/ha, potas i magnez (Kornkali) 80 kg/ha. Zastosowano także dwie dawki saletry, pierwsza 32% saletra amonowa (ZAKsan) 70 kg/ha oraz w drugiej dawce 27% saletra wapniowo-amonowa (CAN) z dodatkiem 4% MgO oraz 7% CaO. Zawiesina grzybni i zarodników użyta do inokulacji została wykonana w Zakładzie Mykologii Instytutu Ochrony Roślin — Państwowego Instytutu Badawczego w Poznaniu według metodyki zamieszczonej przy testach inokulacyjnych w fazie siewki. Inokulacja wykonana została za pomocą opryskiwacza polowego mieszaniną zarodników i grzybni *O. yallundae* i *O. acufiformis* w proporcji 1:1. Stężenie inokulum wynosiło 4,0 mln zarodników na 1 ml. Na każdy wariant badawczy inokulowano 300 roślin, natomiast kontrola stanowiła 100 roślin. Po zbiorze, żdźbła badanych genotypów pszenicy zostały poddane ocenie makroskopowej w Zakładzie Mykologii IOR — PIB w Poznaniu. Ocena uwzględniała określenie procentu porażonych żdźbeł badanych genotypów pszenicy oraz określenie wskaźnika porażenia — K według wzoru (EPPO nr PP 1/28; Kwiatek i in., 2012):

$$K = \frac{[n(II) \times 0,25] + [n(III) \times 0,75] + n(IV)}{n(I + II + III)}$$

gdzie:

I — brak symptomów porażenia,

II — mniej niż 50% powierzchni pochwy liściowej lub obwodu żdźbła porażone w miejscu, gdzie porażenie jest najsilniejsze,

III — ponad 50% powierzchni pochwy liściowej lub obwodu żdźbła porażone w miejscu, gdzie porażenie jest najsilniejsze przy nadal twardej tkance,

IV — 100% powierzchni pochwy liściowej lub obwodu żdźbła porażone, przy murszącej tkance,

n — liczba ocenianych żdźbeł.

2d) Analiza parametrów struktury plonu

Elementy struktury plonu zostały oznaczone w warunkach kontrolnych. Masę tysiąca ziarniaków (MTZ) oznaczano na podstawie 1000 losowo wybranych ziarniaków uzyskanych z całego 10 m² poletka. Plon oznaczano z masy ziarna z poletka (10 m²).

2e) Analiza statystyczna

Przeprowadzono jednoczynnikowe analizy wariancji dla porażenia siewek, współczynnika K, porażenia żdźbeł, plonu z poletka oraz MTZ. Czynnikiem (zmienną zależną) była obecność genów odporności na łamliwość żdźbła. Zmienna przyjmowała wartości: *Pch1*, *Pch2*, *Pch1+Pch2*, 0 (brak genów). Istotność różnic średnich dla poszczególnych poziomów czynnika porównano testem Tukeya. Analizę przeprowadzono za pomocą programu statystycznego Microsoft® Excel 2016/XLSTAT© Ecology (Version 2019.1.3, Addinsoft, Inc., Brooklyn, NY, USA).

Wyniki

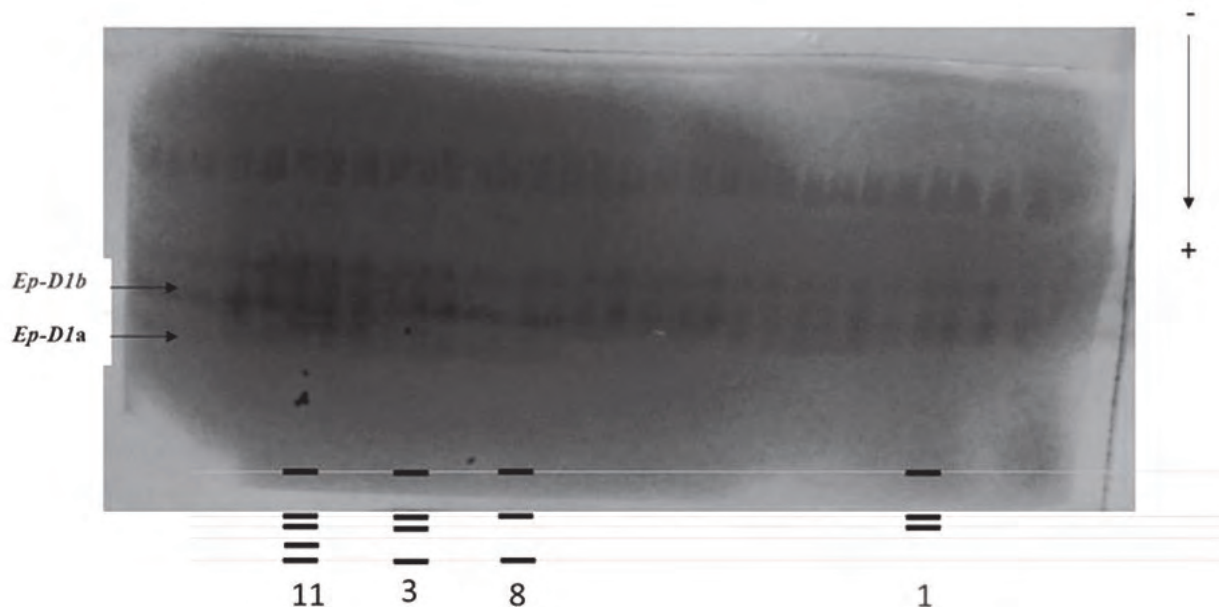
Prace związane z odpornością na łamliwość podstawy żdźbła powodowaną przez grzyby z rodzaju *Oculimacula* przeprowadzono na 159 liniach hodowlanych pszenicy ozimej uzyskanych z przekrzyżowań pszenic o różnym podłożu genetycznym. Do badań włączono również odmiany Artist, Kilimanjaro, Kometa, Patras oraz odmianę Rendezvous — jako wzorzec odporności. Badania prowadzono z wykorzystaniem 5 markerów molekularnych. Trzech dla genu *Pch1* warunkującego odporność rośliny w fazie dojrzewania, w tym jeden marker izoenzymatyczny (*EpD1b*) i dwa markery SSR: *XustSSR2001-7DL* i *Xorw1* oraz dwa markery *Xwmc525* i *Xcfa2040*, dla genu *Pch2*, który warunkuje odporność w fazie siewki i ma niewielki wpływ na odporność rośliny dojrzałej.

Tabela 2

Table 2

Klasy zymogramów stwierdzonych w badanych genotypach pszenicy ozimej w 2018 roku
Selected classes of zymograms in the genotypes of winter wheat analyzed in 2018

Typ wzoru Type of banding pattern	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13
<i>Ep-D1b</i> górny upper	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
środkowy middle	-	-	-	-	-	-	-	-	=	=	=	=	=
dolny lower	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
<i>Ep-D1a</i> górny upper	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
dolny lower	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Liczba genotypów No. of genotypes	29	0	75	0	2	0	14	25	1	0	17	0	0



Rys. 2. Wybrane klasy zymogramów w genotypach pszenicy (*Ep-D1b* — typ nr 1) — elektroforeza na żelu skrobiowym
 Fig. 2. Selected classes of zymograms in wheat genotypes (*Ep-D1b* — type no. 1) — starch gel electropho

W badaniach analizowano po pięć roślin z każdego badanego genotypu.

Identyfikacja obecności markera izoenzymatycznego *Ep-D1b* w badanych genotypach pszenic ozimych

U badanych genotypów obserwowano zymogramy, które można przypisać do 7 z 13 klas (tab. 2, rys. 2).

Typ pierwszy reprezentowany przez odmianę Rendezvous i Kometa, a także 27 (16,6%) badanych linii pszenicy charakteryzował się trzema prążkami dla *Ep-D1b*, które identyfikują formy odporne na infekcję grzybową powodowaną przez *O. yallundae* i *O. acufomis*. Większość badanych linii wykazywała typ wzoru nr 3 (46% genotypów). Kolejnymi kategoriami pod względem liczby genotypów były kategorie: 1, 8 i 11 (tab. 2, rys. 2).

Identyfikacja markerów SSR: *XustSSR2001-7DL*, *Xorw1*, *Xcfa2040*, *Xwmc525*

Analizy markerów SSR sprzężonych z genami *Pch1* i *Pch2* polegały na: amplifikacji fragmentów DNA za pomocą specyficznych starterów metodą PCR, rozdziale elektroforetycznym produktów amplifikacji w żelu agarozowym (2-3%) oraz wizualizacji z wykorzystaniem systemu do archiwizacji żeli.

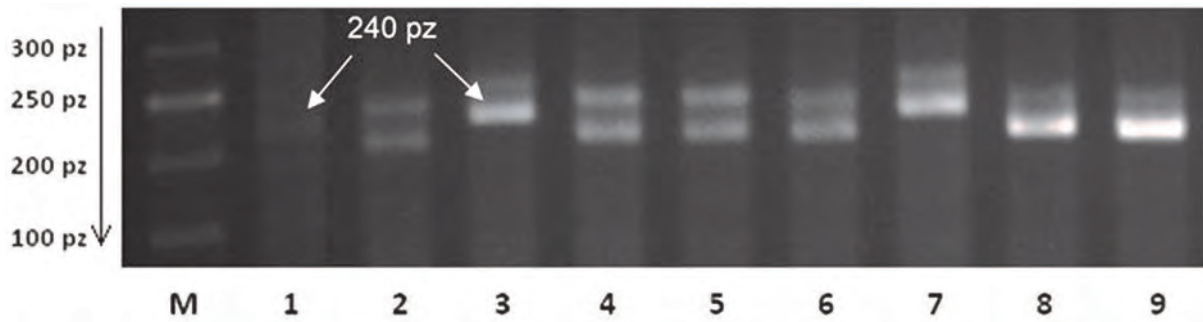
Scharakteryzowano dwa produkty amplifikacji *XustSSR2001-7DL* (markera dla genu *Pch1*) w postaci prążków o wielkości 240 par zasad (pz) oraz 220 pz (rys. 3). W rezultacie reakcji PCR

przeprowadzonej z wykorzystaniem DNA kontrolnej odmiany Rendezvous uzyskano produkt amplifikacji o wielkości 240 pz. W analizach poszczególnych genotypów obserwowano występowanie pojedynczych produktów 220 pz lub 240 pz. U czternastu (9%) genotypów stwierdzono produkt amplifikacji o wielkości 240 pz (taki jak u wzorcowej odmiany Rendezvous) (rys. 3).

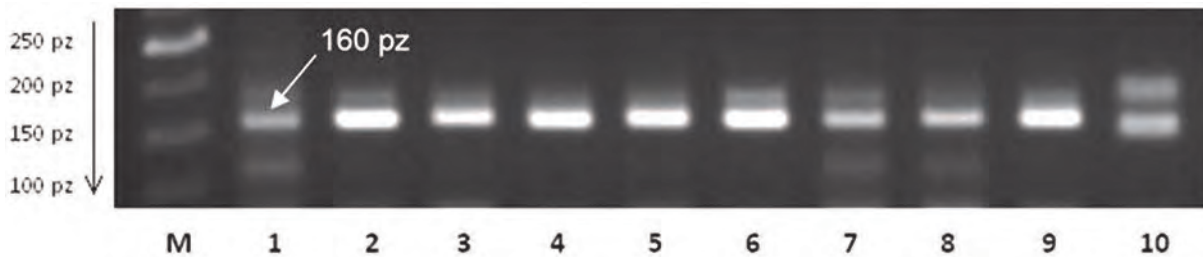
Drugi nowo opracowany marker dla genu *Pch1* — *Xorw1*, wykazujący całkowite sprzężenie z locus *Ep-D1* i genem *Pch1* charakteryzował się trzema produktami amplifikacji o wielkości 150, 160 i 170 pz (rys. 4). Odporna odmiana wzorcowa Rendezvous wykazywała obecność produktu o długości 160 pz i taki układ stwierdzono u 25 badanych genotypów pszenicy ozimej (rys. 4).

W badaniach genu *Pch2* wykorzystano dwa markery: *Xwmc525* i *Xcfa2040*. U odpornej odmiany Rendezvous po zastosowaniu markera *Xwmc525* stwierdzono produkt amplifikacji o długości 180 pz. Takie produkty amplifikacji stwierdzono również u 58 badanych genotypów (rys. 5).

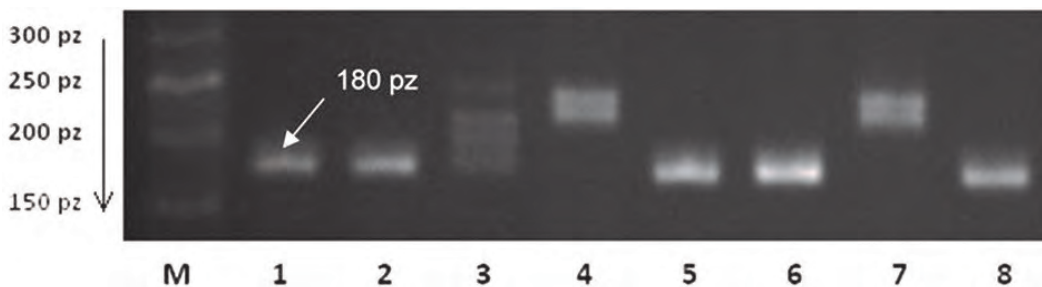
Drugi marker *Xcfa2040* podobnie jak marker *Xwmc525* zlokalizowany jest w obrębie locus *Pch2* (odległość 1.3 cM od *Xwmc525*). U odpornej odmiany Rendezvous stwierdzono produkt amplifikacji o długości 286 pz. Takie produkty amplifikacji stwierdzono również u 55 badanych genotypów. U genotypów, u których stwierdzono produkt właściwy dla markera *Xcfa2040*,



Rys. 3. Produkty amplifikacji markera *XustSSR2001-7DL* (240 pz — obecność *Pch1*, 220 pz — brak genu *Pch1*).
 1 — Rendezvous, 3 i 7 — obecność *Pch1*; 2, 4, 5, 8, 9 — brak *Pch1*, M — marker wielkości
 Fig. 3. Amplification products of marker *XustSSR2001-7DL* (240 bp — the presence of *Pch1*, 220 bp — lack of *Pch1*).
 1 — Rendezvous, 3 and 7 — the presence of *Pch1*; 2, 4, 5, 8, 9 — lack of *Pch1*, M — DNA ladder



Rys. 4. Produkty amplifikacji markera *Xorw1* (160 pz — obecność *Pch1*). 1 — Rendezvous, 2—9 — obecność *Pch1*;
 10 — brak *Pch1*, M — marker wielkości
 Fig. 4. Amplification products of marker *Xorw1* (160 bp — the presence of *Pch1*). 1 — Rendezvous, 2-9 — the presence of *Pch1*; 10 — lack of *Pch1*, M — DNA ladder



Rys. 5. Produkty amplifikacji markera *Xwmc525* (180 pz — obecność *Pch2*). 1 — Rendezvous, 2, 5, 6, 8 — obecność *Pch2*;
 3, 4, 7 — brak *Pch2*, M — marker wielkości
 Fig. 5. Amplification products of marker *Xwmc525* (180 bp — the presence of *Pch2*). 1 — Rendezvous, 2, 5, 6, 8 — the presence of *Pch2*; 3, 4, 7 — lack of *Pch2*, M — DNA ladder

stwierdzono również obecność produktu właściwego dla markera *Xwmc525*, co pozwala na prawidłową identyfikację genu *Pch2*.

W tabeli 3 zebrano genotypy pszenicy ozimej, w których stwierdzono geny *Pch1* i/lub *Pch2*.

Geny *Pch1* i *Pch2* (identyfikowane z użyciem wyżej wymienionych markerów dla genów *Pch1* i *Pch2*) stwierdzono u pięciu badanych genotypów pszenicy ozimej (4,19%): KBP 167, SMH 9662, KBP 1655, KBP 1656, STH 4431, odmianie Kometa oraz Rendezvous.

W czterech genotypach (2,39%): KBP 1622, KBP 1624, STH 5347 i STH 6157 z użyciem markera izoenzymatycznego i jednego markera molekularnego (*Xorw1*) zidentyfikowano gen *Pch1*. Wydaje się, że u tych genotypów najprawdopodobniej doszło do przełamania sprzężenia między *locus Pch1*, a *locus* markera *XustSSR2001-7DL*, który leży w większej odległości od genu *Pch1* (4,1 cM). Zidentyfikowano również gen *Pch2*, używając do identyfikacji dwóch markerów: *Xwmc525* i *Xcfa2040*.

W ośmiu liniach pszenicy ozimej (4,79%): KBP 16 5, KBP 16 29, KBP 16 31, NAD 15004, KBP 16 4, KBP 16 6, KBP 16 28 i SMH 9415 zidentyfikowano gen *Pch1* z użyciem markera

izoenzymatycznego oraz dwóch markerów SSR: *XustSSR2001-7DL* i *Xorw1*. Nie zidentyfikowano natomiast genu *Pch2*, prowadząc badania z użyciem dwóch markerów molekularnych: *Xwmc525* i *Xcfa2040*.

W kolejnych ośmiu liniach pszenicy ozimej (4,79%) zidentyfikowano tylko gen *Pch1* z użyciem markera izoenzymatycznego oraz jednego markera *Xorw1*. Nie identyfikowano markera *XustSSR2001-7DL*, gdzie najprawdopodobniej również doszło do przełamania sprzężenia między *locus Pch1*, a *locus* markera *XustSSR2001-7DL*. Nie identyfikowano również markerów dla genu *Pch2*.

U 49 linii pszenicy ozimej (29,35%) stwierdzono tylko gen *Pch2*.

W pozostałych 91 liniach hodowlanych pszenicy ozimej (54,49%) nie stwierdzono genów *Pch1* i *Pch2*.

Wyniki identyfikacji molekularnej genów *Pch1* i *Pch2*, związanych z odpornością pszenicy na łamliwość źdźbła, konfrontowano z wynikami testów po indukowanej inokulacji siewek. Wykonano ją zawieszając grzybnie i zarodniki *O. yallundae* i *O. acufiformis* w doświadczeniu prowadzonym w fitotronie w IGR PAN (test

Tabela 3
Table 3

Genotypy pszenicy ozimej, u których zidentyfikowano markery dla genów *Pch1* i *Pch2*
Genotypes of winter wheat, where the markers for genes *Pch1* and *Pch2* were identified

Nr No.	Genotyp Genotype	<i>Pch1</i>			<i>Pch2</i>	
		<i>EpD1b</i>	<i>XustSSR2001-7DL</i>	<i>Xorw1</i>	<i>Xwmc525</i>	<i>Xcfa2040</i>
1	Rendezvous (RV)	+	240	160	180	286
2	Kometa	+	240	160	180	286
3	KBP 167	+	240	160	180	286
4	KBP 1655	+	240	160	180	286
5	SMH 9662	+	240	160	180	286
6	KBP 1656	+	240	160	180	286
7	STH 4431	+	240	160	180	286
8	KBP 16 22	+	Brak	160	180	286
9	KBP 16 24	+	Brak	160	180	286
10	STH 5347	+	Brak	160	180	286
11	STH 6157	+	Brak	160	180	286
12	KBP 16 5	+	240	160	Brak	Brak
13	KBP 16 29	+	240	160	Brak	Brak
14	KBP 16 31	+	240	160	Brak	Brak
15	NAD 15004	+	240	160	Brak	Brak
16	KBP 16 4	+	240	160	Brak	Brak
17	KBP 16 6	+	240	160	Brak	Brak
18	KBP 16 28	+	240	160	Brak	Brak
19	SMH 9415	+	240	160	Brak	Brak
20	STH 6102	+	Brak	160	Brak	Brak
21	STH 6111	+	Brak	160	Brak	Brak
22	STH 6116	+	Brak	160	Brak	Brak
23	STH 6130	+	Brak	160	Brak	Brak
24	STH 6132	+	Brak	160	Brak	Brak
25	STH 6156	+	Brak	160	Brak	Brak
26	KBP 16 12	+	Brak	160	Brak	Brak
27	KBP 16 33	+	Brak	160	Brak	Brak

Tabela 4
Table 4

Identyfikacja genów odporności na łamliwość źdźbła, porażenie siewek i porażenie źdźbeł u linii/odmian pszenicy ozimej
Identification of genes determining resistance to eyespot, infection of seedlings and infection of stems in lines/varieties of winter wheat

Geny odporności Resistance genes	Liczba badanych linii/ odmian Number of analyzed lines/ varieties	Test siewkowy Seedling test			Test polowy Field test			
		porażenie infection			współczynnik K K index		% porażenia źdźbeł % of infected sheaths	
		średnia average	odchylenie standardowe std. dev.	zakres range	średnia average	odchylenie standardowe std. dev.	średnia average	odchylenie standardowe std. dev.
<i>Pch1 + Pch2</i>	11	1,18 b	0,58	0–3	0 b	0	0 b	0
<i>Pch1</i>	16	1,61 b	1,00	0–4	0,05 b	0,09	0,31 b	0,60
<i>Pch2</i>	49	1,77 b	1,14	0–4	0,23 a	0,20	1,35 a	1,03
Brak genu Lack of genes	88	2,31 a	1,03	0–4	0,29 a	0,23	1,66 a	1,24
	razem 164 total 164	1,71			0,14		0,83	

Średnie oznaczone tą samą literą nie różnią się istotnie statystycznie na poziomie $\alpha = 0,05$
Means marked with the same letter are not statistically significantly different at $P = 0.05$

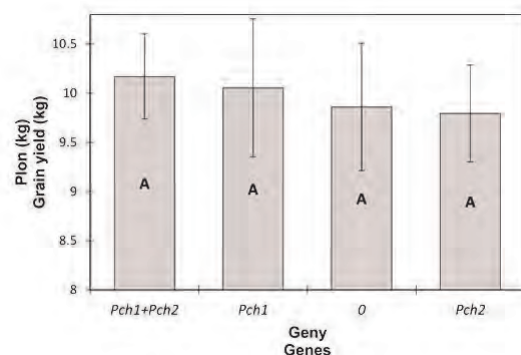
siewkowy) oraz w polowym teście inokulacyjnym (w fazie 1–2 kolanka z użyciem zawiesiny grzybnii i zarodników *O. yallundae* i *O. acuformis*) — poletka w Kopaszewie.

Testy inokulacyjne siewek prowadzono na 159 liniach hodowlanych i pięciu odmianach kontrolnych, w tym odmianie Rendezvous (wzorec odporności). Najmniejsze porażenie siewek w skali 0–5 stwierdzono u genotypów posiadających geny *Pch1* i *Pch2* (średnia 1,18), a najwyższe dla genotypów, u których nie stwierdzono genów *Pch1* i *Pch2* (średnia 2,31) (tab. 4).

W ocenianym sezonie (test polowy) pomimo początkowo dogodnych warunków do infekcji obserwowano niewielkie porażenie źdźbeł pszenicy przez grzyby z rodzaju *Oculimacula*. W dużej mierze wynikało to z warunków pogodowych panujących przez cały sezon wegetacyjny, które uniemożliwiły rozwój patogena na roślinach pomimo inokulacji szczepami *Oculimacula* sp., charakteryzującymi się wysoką zdolnością do infekowania roślin pszenicy (tab. 4). Biorąc pod uwagę analizę molekularną genów związanych z odpornością na łamliwość źdźbła, wyniki inokulacji siewek oraz wyniki porażenia źdźbeł dojrzałych roślin po inokulacji w fazie 1–2 kolanka (BBCH 31–32) stwierdzono brak porażenia źdźbeł u linii/odmian pszenicy ozimej, u których zidentyfikowano oba geny *Pch1* i *Pch2*. Stwierdzono u nich również najniższe porażenie siewek (1,18 w skali 0–6). Najwyższy procent porażonych źdźbeł (1,66%)

odnotowano u genotypów, u których badanymi markerami nie stwierdzono genów *Pch1* i *Pch2*. U tych genotypów odnotowano również najwyższe porażenie siewek w teście fitotronowym (2,31 w skali 0–6) (tab. 4).

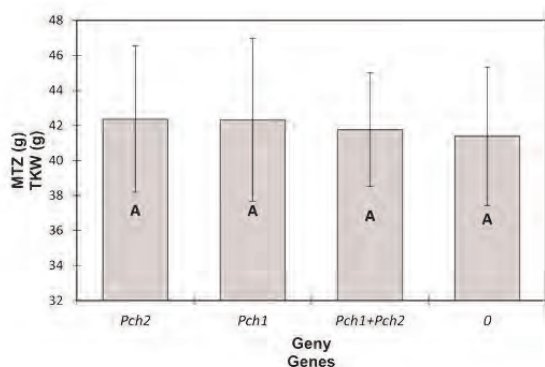
W celu oszacowania, czy obecność genów *Pch1* i *Pch2* w badanych genotypach ma istotny wpływ na wielkości komponentów struktury plonu, wykonano analizę wariancji dla masy tysiąca ziarniaków (MTZ) i plonu ziarna z poletka. Wykazano, że obecność genów *Pch1* i *Pch2* lub ich brak nie wpływała istotnie na plon ziarna, chociaż plon był najwyższy przy obecności obu genów (rys. 7).



Rys. 7. Porównanie średniego plonu dla grup genotypów posiadających gen *Pch1*, *Pch2*, *Pch1+Pch2* i nieposiadających genów *Pch1* i *Pch2*(0). Linie pokazują wartości odchylenia standardowego. Średnie oznaczone tą samą literą nie różnią się istotnie statystycznie na poziomie $\alpha = 0,05$

Fig. 7. Comparison of the average grain yield for groups of lines having the *Pch1* gene, *Pch2* gene, *Pch1+Pch2* genes and those lacking the *Pch1* and *Pch2* genes (0). Bars show values of standard deviation. Means marked with the same letter are not statistically significantly different at $P = 0.05$

Obserwowano również brak istotnego wpływu obecności genów *Pch1*, *Pch2* lub ich braku na masę tysiąca ziarniaków (MTZ). U genotypów z genami *Pch1* i *Pch2* stwierdzono nieznacznie wyższe wartości MTZ, niż u genotypów bez obu genów lub z jednym genem *Pch1* lub *Pch2* (rys. 8). Masa tysiąca ziaren rosła jeżeli był obecny gen *Pch1* i dodatkowo wzrastała, kiedy identyfikowana była obecność obu genów *Pch1* i *Pch2* (rys. 8).



Rys. 8. Porównanie masy tysiąca ziarniaków dla grup genotypów posiadających gen *Pch1*, *Pch2*, *Pch1+Pch2* i nieposiadających genów *Pch1* i *Pch2* (0). Linie pokazują wartości odchylenia standardowego. Średnie oznaczone tą samą literą nie różnią się istotnie statystycznie na poziomie $\alpha = 0,05$

Fig. 8. Comparison of the thousand kernel weight for groups of lines that have the *Pch1* gene, *Pch2* gene, *Pch1+Pch2* genes and those lacking the *Pch1* and *Pch2* genes (0). Bars show values of standard deviation. Means marked with the same letter are not statistically significantly different at $P = 0.05$

Dyskusja

Przeprowadzone badania wykazały, że najbardziej efektywny dla zapewnienia odporności na łamliwość źdźbła jest gen *Pch1*. Redukuje on znacząco skalę porażenia przez grzyby patogeniczne z rodzaju *Oculimacula* oraz ich penetrację podstawy źdźbła. Potwierdzono, że obecność genu *Pch1*, identyfikowanego trzema markerami molekularnymi, w liniach pszenicy ozimej wpływa na obniżenie porażenia dojrzałych źdźbeł pszenicy. Podobne wyniki nasz Zespół uzyskał w doświadczeniach prowadzonych na liniach hodowlanych pszenicy ozimej w 2017 roku (Majka i in., 2018). Stwierdzono również, że do identyfikacji genu *Pch1* najkorzystniejsze jest stosowanie markera izoenzymatycznego *EpD1* oraz *Xorw1*, ponieważ locus zastosowanego markera *XustSSR2001-7DL* leży w większej odległości od genu *Pch1* (4,1 cM). W liniach: KBP 1622, KBP 1624, STH 5347 i STH

6157 doszło najprawdopodobniej do przełamania sprzężenia między locus *Pch1*, a locus markera *XustSSR2001-7DL*. Markery *EpD1* i *Xorw1* leżące w niewielkiej odległości od genu *Pch1* potwierdziły jego obecność w badanych liniach pszenicy ozimej. Analizy z wykorzystaniem markera izoenzymatycznego *EpD1* pozwoliły na stwierdzenie, że żadna z linii nie reprezentuje typu 2, 4, 12 i 13 jakie uzyskano w 2017 roku u innych testowanych linii hodowlanych pszenicy. Jednakże w roku 2017 były to również najmniej liczne typy wzorów prążkowych (odpowiednio 1, 1, 3 i 1 linia). Co więcej, całkowita liczba roślin w których zidentyfikowano gen *Pch1* (typ 1 wzoru prążkowego — 29 linii) była wyższa w roku 2018, niż w badaniu linii hodowlanych w roku 2017 (16 linii) (Majka i in., 2018). Badania Santra i in. (2006) wykazały że, tylko obecność prążków dla *Ep-D1b* przy jednoczesnym braku prążków *Ep-D1a* gwarantuje odporność na łamliwość źdźbła. Gen *Pch1* zidentyfikowano u 14,1% badanych linii hodowlanych pszenicy, co w odniesieniu do 6,9% z roku 2017 stanowi sporą różnicę i świadczy o właściwym kierunku programów hodowlanych zorientowanych na zwiększenie wartości agronomicznej pszenicy w Polsce.

Zidentyfikowano również gen *Pch2*, używając do tego celu dwóch markerów: *Xwmc525* i *Xcfa2040*. Warunkuje on odporność w fazie siewki, jednak jego efektywność zapobiegania infekcji przez grzyby patogeniczne z rodzaju *Oculimacula* jest mniejsza od genu *Pch1* (Burt i in., 2014). Uzyskane przez nas wyniki potwierdzają niewielką rolę genu *Pch2* w zapewnieniu odporności na infekcję przez *Oculimacula* sp. Wyniki uzyskane dla obu markerów molekularnych były tożsame, co wskazuje, że są one równie skuteczne w identyfikacji obecności genu *Pch2*.

Gen *Pch1* jest wciąż efektywny i warunkuje podwyższoną odporność na łamliwość podstawy źdźbła, aczkolwiek istnieje efekt plejotropowy związany z przeniesieniem segmentu chromosomu 7D *Ae. ventricosa* do pszenicy, mający wpływ na wielkość plonu (Johnson, 1992). W pracach, gdzie badano wpływ genu *Pch1* na parametry struktury plonu, obserwowano negatywny wpływ tego genu na wielkość plonu oraz masę tysiąca ziarniaków (Koen i in., 2002; Kwiatek i in., 2016). Uzyskane w tej pracy wyniki pozwalają stwierdzić, że w badanych liniach obecność genu *Pch1* nie ma istotnego wpływu na plon ziarna i masę tysiąca ziarniaków, a nawet wartości te są nieznacznie wyższe w liniach posiadających gen *Pch1*, jak również w liniach posiadających zarówno gen *Pch1*, jak i *Pch2*. Jest to najprawdopodobniej związane z obecnością zredukowanego segmentu przeniesionego do pszenicy z *Ae. ventricosa*, gdzie

negatywne sprzężenie jest przełamane, o czym może również świadczyć przełamanie sprzężenia pomiędzy *XustSSR2001-7DL*, a genem *Pch1*. Dodatkowo wyjaśnienie może stanowić istnienie innego genetycznego źródła mającego wpływ na wielkość plonu w badanych liniach hodowlanych pszenicy.

Na podstawie wyników testów inokulacyjnych wykonanych zarówno w fazie siewki w fitotronie, jak i w doświadczeniu polowym zaobserwowano, że najniższe porażenie roślin obserwuje się w przypadku obecności obydwu genów *Pch1* i *Pch2*. W dalszej kolejności wysoka odporność roślin na infekcję przez *Oculimacula* sp. determinowana jest przez gen *Pch1*, a na końcu przez gen *Pch2*, przy czym różnica w stopniu porażenia siewek w przypadku obecności pojedynczych genów była mniejsza, niż w przypadku roślin dojrzałych, co wskazuje na ekspresję genu *Pch2* we wczesnej fazie rozwoju rośliny. Jest to zgodne z wcześniejszymi obserwacjami dotyczącymi wysokiej efektywności genu *Pch1* w zapewnieniu odporności pszenicy na łamliwość podstawy źdźbła oraz marginalnym wpływie genu *Pch2*, który może być traktowany jako dodatkowe źródło odporności pszenicy na łamliwość podstawy źdźbła (Burt i in., 2014; Kwiatek i in., 2016; Majka i in., 2018).

Przeprowadzone badania pozwoliły na wyselekcjonowanie 23 linii hodowlanych pszenicy, posiadających gen *Pch1*, w tym ośmiu posiadających również gen *Pch2*, o podwyższonej odporności na łamliwość podstawy źdźbła, bez negatywnego wpływu na elementy struktury plonu.

Literatura

- Burt C., Hollins T. W., Nicholas P. 2014. Identification of a QTL conferring seedling and adult plant resistance to eyespot on chromosome 5A of Cappelle Desprez. *Theor. Appl. Genet.* 122: 119 — 128.
- Chapman N., Burt C., Dong H., Nicholson P. 2008. The development of PCR-based markers for the selection of eyespot resistance genes *Pch1* and *Pch2*. *Theor Appl Genet* 117: 425 — 433.
- Deighton F. C. 1973. Studies on *Cercospora* and allied genera. IV. *Cercospora* Sacc., *Pseudocercospora* gen. nov. and *Pseudocercosporidium* gen. nov. *Mycological Papers* 133:1 — 62.
- Dumalasova V., Palicova J., Hanzalova A., Bizova I., Laisova-Svobodova L. 2015. Eyespot Resistance Gene *Pch1* and Methods of Study of its Effectiveness in Wheat Cultivars. *Czech J Genet Plant Breed*, 51 (4): 166 — 173.
- EPPO no. PP 1/28 — Standards — PP1 Efficiency of plant protection products — Summary list of approved Standards (2018 – 09).
- Fitt B. D. L., Goulds A., Polley R. W. 1988. Eyespot (*Pseudocercospora herpotrichoides*) epidemiology in relation to prediction of disease severity and yield loss in winter wheat — a Review. *Plant Pathology* 37: 311 — 328.
- Fron M. G. 1912. Contribution a l'etude de la maladie due 'piet noir des cereales' ou 'maladie du pietin'. *Annales de la Science Agronomique, France IV*: 1.
- Groenewald J. Z., Marais A. S., Marais G. F. 2003. Amplified fragment length polymorphism-derived microsatellite sequence linked to the *Pch1* and *Ep-D1* loci in common wheat. *Plant Breeding* 122(1): 83 — 85.
- Jahier J., Doussinault G., Dosba F., Bourgeois F. 1978. Monosomic analysis of resistance to eyespot in the variety „Roazon”. In: *Proceedings of the Fifth International Wheat Genetics Symposium*, Luty 23–28, New Delhi, Indie: 437 — 440.
- Johnson R. 1992. Past, present and future opportunities in breeding for disease resistance, with examples from wheat. *Euphytica* 63: 3 — 22.
- Koen E., Labuschagne, M. T., Viljoen, C. D. 2002. The influence of eyespot resistance genes on baking quality and yield in wheat. *Journal of the Science of Food and Agriculture* 82: 1537 — 1540.
- Korbas M., Parandowski A., Węgorok P., Jajor E., Horoszkiewicz-Janka J., Zamojska J., Danielewicz J., Czyżewski M., Dworzańska D. 2017. *Vademecum środków ochrony roślin*, Wyd. Agronom, Poznań.
- Kwiatek M., Pankiewicz K., Wiśniewska H., Korbas M., Danielewicz J. 2012. Identification of *Pch1* eyespot resistance gene in the collection of wheat lines (*Triticum Aestivum* L.). *Journal of Plant Protection Research* 52 (2): 254 — 258.
- Kwiatek M., Wiśniewska H., Kaczmarek Z., Korbas M., Gawłowska M., Majka M., Pankiewicz K., Danielewicz J., Belter J. 2015. Using markers and field evaluation to identify the source of eyespot resistance gene *Pch1* in the collection of wheat breeding lines. *Cereal Research Communications* 43: 638 — 648.
- Kwiatek M., Wiśniewska H., Korbas M., Gawłowska M., Belter J., Majka M., Danielewicz J. 2016. How do eyespot resistance genes transferred into winter wheat breeding lines affect their yield? *Journal of Plant Protection Research* 56: 319 — 322.
- Leonard J. M., Watson C. J., Carter A. H., Hansen J. L., Zemetra R. S., Santra D. K., Campbell K. G., Riera-Lizarazu O. 2008. Identification of a candidate gene for the wheat endopeptidase *EpD1* locus and two other STS markers linked to the eyespot resistance gene *Pch1*. *Theor. Appl. Genet.* 116: 261 — 270.
- Maia N. 1967. Obtention de blés tendres résistants au piétinverse (*Cercospora herpotrichoides*) par croisements interspécifiques blés x *Aegilops*. *Comptes Rendus de l'Académie d'Agriculture de France* 53: 149 — 155.
- Majka M., Kwiatek M., Korbas M., Danielewicz J., Gawłowska M., Góral T., Wiśniewska H. 2018. Eyespot resistance of winter wheat breeding lines evaluated with the marker-assisted selection and inoculation tests at the seedling and adult plant stage. *Journal of Plant Protection Research* 58:387 — 394.
- McMillin D. E., Allan R. E., Roberts D. E. 1986. Association of an isozyme locus and strawbreaker foot rot resistance derived from *Aegilops ventricosa* in wheat. *Theor. Appl. Genet.* 72: 743 — 747.
- Mena M., Doussinault G., Lopez-Braña I., Aguaded S., García-Olmedo F., Delibes A. 1992. Eyespot resistance gene *Pch-1* in H-93 wheat lines. Evidence of linkage to markers of chromosome group 7 and resolution from the endopeptidase locus *Ep-D1b*. *Theor. Appl. Genet.* 83: 1044 — 1047.
- Meyer N., Lind V., Heindorf M., Korzun V., Friedt W., Ordon F. 2011. Diagnostic value of molecular markers linked to the eyespot resistance gene *Pch1* in wheat. *Euphytica* 177: 267 — 275.

- Muranty H., Jahier J., Tanguy A. M., Worland A. J., Law C. 2002. Inheritance of resistance of wheat to eyespot at the adult stage. *Plant Breeding* 121: 536 — 538.
- Murray T. D. 2010. Eyespot (strawbreaker foot rot). In: *Compendium of Wheat Diseases and Pests* (Bockus W. W., Bowden R. L., Hunger R. M., Murray T. D., Smiley R. W., Morrill W. ed.). 3rd ed. APS Press, Minneapolis 171: 32 — 34.
- Pasquariello M., Ham J., Burt C., Jahier J., Paillard S., Uauy C., Nicholson P. 2017. The eyespot resistance genes *Pch1* and *Pch2* of wheat are not homoeoloci. *Theor. Appl. Genet.* 130: 91 — 107.
- Santra D. K., Watt C., Little L., Kidwell K. K., Campbell K. G. 2006. Comparison of a modified assay method for the endopeptidase marker *Ep-D1b* with the Sequence Tag Site marker *XustSSR2001-7DL*. *Plant Breeding* 125: 13 — 18.
- Wiśniewska H., Kwiatek M., Majka M., Gawłowska M., Belter J. 2016. Selekcja pszenicy odpornej na łamliwość podstawy źdźbła z wykorzystaniem markerów izoenzymatycznych i molekularnych. (W:) *Metody biotechnologiczne w hodowli pszenicy — wybrane zagadnienia* (red.) Surma M., Kuczyńska A., Adamski T., Wydawnictwo ProDRUK Poznań, ISBN 978-83-64246-33-3: 27 — 35.
- Wiśniewska H., Majka M., Kwiatek M., Gawłowska M., Surma M., Adamski T., Kaczmarek Z., Drzazga T., Ługowska B., Korbas M., Belter J. 2019. Production of wheat doubled haploids resistant to eyespot supported by marker-assisted selection, *Electronic Journal of Biotechnology* 37:11 — 17.
- Worland A. J., Law C. N., Hollins T. W., Koebner R. M. D., Giura A. 1988. Location of a gene for resistance to eyespot (*Pseudocercospora herpotrichoides*) on chromosome 7D of bread wheat. *Plant Breeding* 101: 43 — 51.