

Zadanie MRiRW nr 89

Poszukiwanie nowych źródeł odporności na mączniaka rzekomego i opracowanie mechanizmu dziedziczenia tej cechy u ogórka

Kierownik: Mgr Urszula Kłosińska

Celem badań jest poszukiwanie nowych źródeł z wyższym niż dotychczas poznanym poziomem odporności i opracowanie mechanizmu dziedziczenia cechy odporności na mączniaka rzekomego oraz określenie czynników warunkujących odporność/podatność na mączniaka rzekomego na podstawie cech anatomicznych liści linii odpornych i podatnych. Ponadto prowadzone są prace nad opracowywaniem metodologii testowania odporności na mączniaka rzekomego w warunkach sztucznej inokulacji.

W roku 2011 w ramach projektu realizowano cztery zadania, których celem była:

- ocena stabilności wybranych populacji mieszańcowych i linii ogórka pod względem odporności na mączniaka rzekomego,
- analiza genetyczna cechy odporności ogórka na mączniaka rzekomego na wybranych populacjach mieszańcowych,
- porównanie różnych metod testowania odporności/podatności na mączniaka rzekomego w warunkach fitotronowych,
- ocena zmian w budowie anatomicznej liści ogórka porażonych przez *Pseudoperonospora cubensis*.

Badanie stabilności linii ogórka pod względem odporności/podatności przeprowadzono w warunkach naturalnej infekcji *P. cubensis* na polach doświadczalnych IO w Skierniewicach i w SDOO Węgrzce oraz w warunkach sztucznej inokulacji w fitotronie. Obiektem badań było sześć genotypów. Oceny podatności na mączniaka rzekomego dokonano pod koniec okresu wegetacji (06 września w Skierniewicach, 13 września w Węgrzce) oceniając każdą roślinę osobno według 10. stopniowej skali porażenia (0-brak objawów, 9-roślina całkowicie porażona). Dla każdej linii/odmiany obliczono wskaźnik podatności (DSI). Natomiast w bioteście w fitotronie obserwacje porażenia przeprowadzono na trzech pierwszych liściach po dwunastu dniach od inokulacji według wyżej opisanej skali. Najwyższy i stabilny poziom odporności w warunkach naturalnej infekcji mączniakiem rzekomym na polach w dwóch lokalizacjach (Skierniewice i Węgrzce) stwierdzono w trzech nowych źródłach odporności na tę chorobę: DM 8, DM 9 i DM 48). Wyniki otrzymane w doświadczeniach polowych były silnie skorelowane z testami przeprowadzonymi w warunkach fitotronowych, o czym świadczy bardzo wysoka wartość współczynnika korelacji liniowej Pearsona ($r=0,97-0,99$).

Oceniono również stabilność/zmienność badanej cechy u pięciu populacji mieszańcowych pokolenia F4Bc1P1, F4Bc1P2, F3Bc2P2 otrzymanych z pojedynczych odpornych na mączniaka rzekomego (DSI = 0-2) genotypów pokoleń wcześniejszych wyselekcjonowanych po teście biologicznym oraz rozmnożonych w roku 2010. Ocenę porażenia przeprowadzono w warunkach fitotronowych na pierwszym liściu po siedmiu dniach od inokulacji. Populacje mieszańcowe oceniono na tle dwóch komponentów rodzicielskich B 6106 (podatny) i B 6115 (odporny). Do najbardziej odpornych zaliczono trzy populacje otrzymane pierwotnie ze skrzyżowania wstecznego do komponenta odpornego B 6115 (P2). Ich wskaźniki podatności były na poziomie odporności rodzica odpornego B 6115 (DSI=1,9) i wynosiły odpowiednio: 1.5, 1.8 i 2.0 oraz istotnie przewyższały wskaźniki dwóch pozostałych populacji F4Bc1P1,

które charakteryzowały się średnim nasileniem objawów chorobowych (DSI=3,9) Ocena poziomu odporności na mączniaka rzekomego wykazała mniejszą, w porównaniu do roku poprzedniego, zmienność wewnątrzliniową w przetestowanych pięciu populacjach mieszańcowych w warunkach sztucznej inokulacji *P. cubensis*.

Analizę mechanizmu dziedziczenia cechy odporności na mączniaka rzekomego przeprowadzono na otrzymanych w latach wcześniejszych populacjach mieszańcowych F1, F2, BcP1, Bc1P2 pochodzących ze skrzyżowania odpornej linii DM 8 (P1) z podatną linią DM 1 (P2). Badania te wykonano w warunkach sztucznej inokulacji w szklarni i fitotronie zakładając pięć testów różniących się założeniami metodycznymi. W zależności od rodzaju testu, rośliny w fazie od 1-ego do 3-ego liścia opryskano inokulum o stężeniu 5×10^4 zarodników $\cdot \text{ml}^{-1}$ a następnie po 8-20 dniach inkubacji przeprowadzono obserwacje porażenia przez mączniaka rzekomego według 10. stopniowej skali (0-brak objawów, 9-roślina całkowicie porażona) i policzono wskaźnik podatności (DSI).

We wszystkich pięciu testach wykazano, że zarówno populacja F1, jak i RF1 wykazała średni poziom odporności, a rozkład genotypów obejmował klasy od 2 do 7, ze znaczną przewagą klasy 3, 4 i 5, stanowiących ponad 70% tych populacji. W trzech testach (I, IV i V) w pokoleniu F2 otrzymano osobniki w klasach porażenia od 1 do 8, w teście nr II zanotowano rozkład roślin pokolenia F2 w klasach 1-9, natomiast w teście nr III rozkład ten obejmował klasy 2-9. Ciągły rozkład osobników w pokoleniu F2 w przeprowadzonych biotestach wskazuje, że cecha odporności na mączniaka rzekomego u ogórka warunkowana jest poligenicznie. Na podstawie przeprowadzonej analizy statystyczno-genetycznej z wykorzystaniem testów skali A, B, C Mathera oraz sześcioparametrowego modelu dziedziczenia Jinksa i Jonesa stwierdzono, że w dziedziczeniu odporności na tę chorobę istotną rolę odgrywa addytywne działanie genów i współdziałanie genów nieallelicznych o charakterze epistatycznym.

W warunkach fitotronowych porównano różne metody testowania odporności na mączniaka rzekomego: I - nanoszenie kropli inokulum na odcięte liścienie, II - opryskiwanie inokulum odciętych liścieni, III - opryskiwanie roślin inokulum w fazie pierwszego dobrze wykształconego liścia. Stwierdzono, że wyniki otrzymane w trzech metodach testowania dla grupy genotypów odpornych i podatnych są silnie ze sobą skorelowane, o czym świadczą bardzo wysokie wartości współczynników korelacji liniowej Pearsona ($r=0,84-0,92$). Natomiast w grupie genotypów średniopodatnych i średniopodatnych zanotowano bardzo słabą korelację metody I z II i III ($r=0,1-0,2$) oraz średnią korelację metody II z III ($r=0,4$). Najmniej skuteczną metodą okazała się metoda I (nanoszenie kropli inokulum na liścienie). Traktowane w ten sposób liścienie bardzo różnie reagowały w obrębie tej samej populacji charakteryzującej się średnim poziomem odporności/podatności na mączniaka rzekomego. Ponadto metoda ta była najslabiej skorelowana z pozostałymi metodami. Opryskiwanie roślin inokulum w fazie pierwszego liścia (metoda III) okazało się najbardziej wiarygodne ze względu na małe zróżnicowanie objawów chorobowych.

Przeprowadzono również badania w laboratorium cytologicznym Pracowni Hodowli i Biotechnologii z użyciem mikroskopu świetlnego NIKON ECLIPSE 80i z systemem cyfrowej rejestracji obrazu, mikroskopu stereoskopowego oraz mikroskopu elektronowego skaningowego JEOL JSM-S1. Materiałem do badań było sześć linii ogórka o zróżnicowanym poziomie odporności na mączniaka rzekomego. Z liści roślin ogórka, które rosły w warunkach fitotronowych wykonano pięcioma metodami preparaty mikroskopowe. Analiza procesu infekcji, porażania i stopnia zniszczenia tkanek liści po inokulacji *P. cubensis*

wykazała, że mniejsza liczba aparatów szparkowych, które są miejscem wnikania zarodników infekcyjnych i wyrastania strzępek konidiotwórczych patogena jest cechą charakterystyczną dla odpornych roślin ogórka. Natomiast charakterystyczne dla roślin linii podatnych luźno ułożone komórki miękiszu stanowią strukturę bardziej dostępną dla penetrujących i rozrastających się międzykomórkowo strzępek grzybni, które w dalszym etapie rozwoju tworzą liczne wypustki (haustoria) przerastające ściany komórkowe miękiszu liścia degradując struktury wewnątrz komórkowe. Postępujące zmiany nekrotyczne liści linii podatnych prowadzą do deformacji komórek epidermy i komórek miękiszu liściowego, a w rezultacie do utraty prawidłowej struktury wszystkich tkanek liścia, co wiąże się z zamieraniem całego liścia