

SPRAWOZDANIE O STANIE REALIZACJI ZADANIA

z wykonania badań podstawowych na rzecz postępu biologicznego w produkcji roślinnej
w 2012 roku

1. Nr decyzji MRiRW: **HORhn-801-10/12 zadanie nr 22**
2. Nazwa tematu: **Identyfikacja źródeł odporności na mączniaka i rdzę w kolekcji linii, rodów i odmian żyta**
3. Podmiot realizujący temat: Uniwersytet Przyrodniczy we Wrocławiu
4. Wydział/Pracownia/ Pracownie: Wydział Przyrodniczo-Technologiczny, Katedra Genetyki, Hodowli Roślin i Nasiennictwa
5. Kierownik tematu: dr hab. prof. nadzw. Henryk Bujak
Wykonawcy: dr inż. Kamila Nowosad
dr Andrzej Jurkowski

6. Informacja o realizacji prac w roku 2012

a) Materiały i metody:

Materiał badawczy stanowiły przekazane przez hodowców materiały hodowlane żyta ozimego oraz odmiany Bosmo i Dańkowskie Diament, które stanowiły wzorce.

1. Rody z doświadczeń wstępnych. 42 obiekty, w tym 2 odmiany wzorcowe;

2. Formy żyta ozimego przekazane przez:

2.1. DANKO Hodowla Roślin Sp. z o. o.

CHD Ma 165 – CHD Ma 204,

LAD Ma 38- LAD Ma77,

SOA Mącz70 – SOA Mącz 112

2.2. Poznańska Hodowla Roślin Sp. z o.o.

WM18R - WM44R,

1382B - 1480 B

NS2104 - NR2116C

Łącznie w testowaniu na odporność na mączniaka prawdziwego i rdzę brunatną poddano 257 genotypów dostarczonych przez hodowców, wśród których były linie wsobne, populacje oraz odmiany wzorcowe (Bosmo, Dańkowskie Diament) żyta ozimego.

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

Ocenę podatności genotypów żyta na porażenie przez rdzę brunatną (*Puccinia recondita*) wykonano metodą laboratoryjną. Na szlakah Petriego przygotowano pożywkę skadającą się z agaru z dodatkiem benzimidazolu. Liście dziesięciodniowych siewk żyta układano na pożywce, a

następnie infekowano przygotowanym wcześniej inokulatem rdzy brunatnej. Materiał do inokulacji zbierano w różnych miejscowościach (Wrocław, Smolice, Kondratowice), aby otrzymać szeroką populację zarodników patogena. Oceny porażenia dokonywano po dziesięciu dniach od inokulacji. Oceny dokonano w skali czterostopniowej, gdzie 1 – brak porażenia i 4 – silne objawy porażenia rdzą brunatną na liściu.

Ocene polową porażenia rodów żyta ozimego wykonano zgodnie z przyjętą przez CBOBORU metodyką w skali 9-cio stopniowej. Ocena 9-pełna odporność, brak objawów porażenia, ocena 1-brak odporności, silne porażenie liści obejmujące większość blaszek liściowych.

Do statystycznego opracowania wyników obserwacji przeprowadzono transformację wyników, w celu uzyskania ciągłości rozkładu oraz rozkładu normalnego, gdyż obserwacje tworzyły nieciągły układ wartości. Wyniki surowe poddano transformacji, a przetransformowane wyniki poddano analizom statystycznym. Przeprowadzono jednoczynnikową analizę wariancji zgodnie z modelem kompletnej randomizacji (ANOVA) w celu sprawdzenia istotności zróżnicowania pod względem odporności na mączniaka prawdziwego badanych materiałów żyta ozimego.

Transformację wyników obserwacji uzyskanych w skali wykorzystując wzór podany przez Węgrzyna i in. (1996):

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

W celu poszukiwania markerów molekularnych sprzężonych z genami odporności na mączniaka prawdziwego irdze brunatną u przesłanych przez hodowców form żyta ozimego wyizolowano DNA genomowe. Ponieważ dla żyta nie ma opracowanych markerów molekularnych sprzężonych z genami odporności na mączniaka prawdziwego sprawdzano przydatność kolejnych markerów opracowanych dla innych zbóż, w tym pszenicy i pszenżyta.

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

Analizom molekularnym poddawano genotypy żyta najmniej podatne na porażenie mączniakiem prawdziwym, a następnie wykonywano amplifikację dla genotypów wrażliwych, w celu analizy różnic uzyskiwanych produktów.

Dla żyta ozimego brak jest informacji o sprzężeniach markerów molekularnych z poszczególnymi genami odporności na mączniaka prawdziwego, dlatego postanowiono sprawdzić przydatność opracowanych markerów dla pszenicy. W tabeli 1 zestawiono użyte w reakcjach PCR startery dla poszczególnych markerów molekularnych sprzężonych z genami odporności na mączniaka prawdziwego u pszenicy. Przedstawiono sekwencje starterów, nazwę markera, sprzężenie markera z poszczególnymi allelami genów odporności Pm, wielkość amplifikowanego produktu oraz źródło literaturowe pochodzenia informacji.

Skład mieszaniny reakcyjnej oraz warunki termiczne reakcji PCR dla wykazania obecności poszczególnych markerów były zgodne z danymi dostępnymi w opracowaniach naukowych. Do oceny swoistości reakcji PCR dla każdej serii użyto referencyjnych odmian i linii pszenicy, z których opracowano poszczególne markery, które pozwoliły na weryfikację materiałów żyta pod kątem obecności genów odporności na mączniaka prawdziwego.

Tabela 1. Charakterystyka użytych primerów do reakcji PCR.

Sprzężenie z genem odporności na mączniaka	Nazwa markera	Sekwencja nukleotydowa primerów (5'→3')	Wielkość amplifikowanego produktu (pz)	Referencje
<i>Pm1</i>	STS638	ACA GCG ATG AAG CAA TGA AA GTC CAG TTG GTT GAT GGA AT	542	Neu i in. 2002
<i>Pm2</i>	Xcfd81-5D	TATCCCAATCCCCTCTTTC GTCAATTGTGGCTTGCCCT	283	Qiu i in. 2006
<i>Pm3a</i>	specyficzny dla <i>Pm3a</i>	GGA GTC TCT TCG CAT AGA CAG CTT CTA AGA TCA AGG AT	624	Tommasini i in. 2006
<i>Pm3b</i>	specyficzny dla <i>Pm3b</i>	GGC ACA GAC AAA GCT CTG TCG AGT AGC TCG GGA ATC	1382	Tommasini i in. 2006
<i>Pm3c</i>	specyficzny dla <i>Pm3c</i>	CTA GTG GAG GTA GTT GAC AGT CGT TCA AGA GAA CGG C	846	Tommasini i in. 2006
<i>Pm3d</i>	specyficzny dla <i>Pm3d</i>	TGA CTA TTC GTG GGT GCA GAC TGC GGC ACA GTT CAG C	1109	Tommasini i in. 2006
<i>Pm3e</i>	specyficzny dla <i>Pm3e</i>	GGA ATC CCT TTG GCT TGT CTA GCA GAG CAG TGC AAG	524	Tommasini i in. 2006
<i>Pm3f</i>	specyficzny dla <i>Pm3f</i>	GGA GTC TCT TTG CTT AAG CAG CTT CTA AGA TCA AGG AT	624	Tommasini i in. 2006
<i>Pm3g</i>	specyficzny dla <i>Pm3g</i>	GAA TCC CTT TAT CTT GAC ATT CCC CTA GCA GAG CAG AA	540	Tommasini i in. 2006
<i>Pm4</i>	ResPm4	TGT CCG GTT TGG TTA CCT TTC TTC GGG ACG CTT CCT ATA ATC ACG C	218	Schmolke i in. 2012
<i>Pm4a</i>	Xgwm356	AGCGTTCTTGGAATTAGAGA CCAATCAGCCTGCAACAAC	130	GrainGenes
<i>Pm13</i>	UTV14	CGCCAGCCAATTATCTCCATGA AGCCATGCGCGGTGTCATGTGAA	520	Cenci i in. 1999
<i>Pm16</i>	Xgwm159	GGCCAACACTGGAACAC GCAGAAGCTTGTGGTAGGC	189	Chen i in. 2005
<i>Pm17</i>	IAG95	AGCAACCAACACACCCATC ATACTACGAACACACACCCC	1150	Mohler i in. 2001
<i>Pm34</i>	Xbarc144	GCGTTTTAGGTGGACGACATAGATAGA GCGCCACGGGCATTTCTCATAC	238	Miranda i in. 2006
<i>Pm43</i>	Xwmc41	TCCCTCTTCCAAGCGCGGATAG GGAGGAAGATCTCCCGGAGCAG	190	He i in. 2009

- b) Szczegółowe omówienie wykonanych prac i uzyskanych wyników (łącznie dla wszystkich Pracowni realizujących temat).

Celem badań jest określenie

Celem badań była identyfikacja źródeł genetycznej odporności na aktualnie występujące rasy mączniaka prawdziwego oraz rdzy brunatnej w liniach, odmianach i rodach żyta. Oceniona została odporność materiałów roślinnych żyta w warunkach szklarniowych i laboratoryjnych pod wpływem naturalnej i sztucznej inokulacji. Wyizolowane DNA genomowe posłużyło do

poszukiwania markerów molekularnych genów odporności na mączniaka prawdziwego i rdzę brunatną. W tym celu wykorzystano znane z literatury markery molekularne sprzężone z genami odporności na rdzę brunatną oraz na mączniaka prawdziwego.

Harmonogram prac w bieżącym roku sprawozdawczym był realizowany zgodnie z planem i obejmował:

- ocenę porażenia genotypów żyta ozimego przez mączniaka prawdziwego w warunkach sztucznej inokulacji i w warunkach polowych,
- ocenę porażenia genotypów żyta ozimego przez rdzę brunatną w warunkach sztucznej inokulacji i w warunkach polowych,
- izolację genomowego DNA żyta ozimego z kolekcji linii, odmian i rodów,
- użycie markerów molekularnych do poszukiwania genów odporności na mączniaka prawdziwego u badanych form żyta,
- użycie markerów molekularnych do poszukiwania genów odporności na rdzę brunatną u badanych form żyta.

W jakim stopniu cel badania został osiągnięty

W roku bieżącym ocenę odporności na mączniaka prawdziwego (*Blumeria graminis*) oraz rdzę brunatną (*Puccinia recondita*) w przesłanych przez hodowców materiałach genetycznych żyta ozimego. Otrzymano także nowe populacje żyta o poprawionej odporności, które mogą stanowić materiał wyjściowy do wyprowadzania linii i populacji odpornych na mączniaka prawdziwego. Z materiałów przesłanych przez hodowców wyizolowano DNA genomowe, które posłuży do poszukiwania markerów molekularnych sprzężonych z genami odporności na mączniaka prawdziwego i rdzę brunatną

Realizacja badań przebiegała zgodnie z harmonogramem. W przeprowadzonych testach szklarniowych oceną podatności na porażenie przez *Blumeria graminis* objęto ogółem 215 genotypów pochodzących z czterech stacji hodowli roślin (Choryń, Laski, Sobiejuchy, Nagradowice, Smolice).

W pierwszym doświadczeniu oceniono stopień porażenia mączniakiem prawdziwym rodów z doświadczenia wstępnego. Analizie poddano 41 rodów oraz 2 odmiany wzorcowe (Bosmo, Dańkowskie Diament). Średni stopień porażenia badanych materiałów żyta, zgodnie z przyjętą czterostopniową skalą oceny, nie był mocno zróżnicowany, chociaż wykazał statystycznie istotne różnice (tabela 3) i wynosił od 1,7 (rody HRSM 58, DC 1127) do 3 (u 32 obiektów). Wyniki oceny porażenia mączniakiem prawdziwym badanych genotypów wraz z ich podziałem na grupy jednorodne przedstawiono w tabeli 2. Wśród badanych materiałów można wyróżnić formy wykazujące wyższą odporność na porażenie przez mączniaka od najmniej porażonej odmiany wzorcowej Bosmo (2,3). Można wyróżnić rody HRSM 58 i DC 1127, który uzyskały ocenę na średnim poziomie 1,7. Ponadto nie było rodów żyta, które dorównywały odpornością odmianie wzorcowej Bosmo. Pozostałe badane genotypy nie wykazały wysokiej odporności na mączniaka prawdziwego w warunkach sztucznej inokulacji. U tych form porażenie blaszek liściowych ocenianych siewek wynosiło powyżej 75%. Wykonana analiza analizę wariancji wykazała istotne zróżnicowanie stopnia porażenia badanych genotypów żyta pod względem odporności na mączniaka, ale jedynie na poziomie istotności co najmniej $\alpha = 0,05$ (tabela 3). Ocenę stopnia porażenia przeprowadzono w czterostopniowej skali bonitacyjnej, dlatego otrzymane wyniki nie spełniały warunków koniecznych do wykonania analizy wariancji. W celu uzyskania ciągłości rozkładu oraz rozkładu normalnego, wyniki surowe poddano

transformacji według wzoru podanego przez Węgrzyna in. 1996. Dopiero otrzymane po transformacji wyniki poddano obliczeniom statystycznym.

Przy użyciu testu Duncana porównano średnich wartości z oceny porażenia przez mączniaka podzielono genotypy żyta na grupy jednorodne. Wyodrębnienie grup jednorodnych genotypów odbywało się na wartościach przetransponowanych, natomiast w tabeli 4 zestawiano dodatkowo wartości po ponownym ich przeliczeniu na skalę oceny. Podana wartość najmniejszej istotnej różnicy (NIR) dotyczy wartości poddanych transformacji. Test Duncana pozwolił na podział ocenianych genotypów żyta ozimego na cztery zachodzące na siebie grupy jednorodne. Na wyróżnienie zasługują rody HRSM 58 i DC 1127, które wykazały wyższą odporność od odmiany Bosmo i utworzyły pierwszą niezachodzącą grupę jednorodną. Ponadto 8 badanych genotypów charakteryzowało się odpornością na poziomie populacyjnej odmiany wzorcowej Bosmo. Pozostałe rody oraz odmiana wzorcowa Dańkowskie Diament charakteryzowały się brakiem odporności na mączniak prawdziwego i zostały zaliczone do ostatniej grupy jednorodnej.

Wśród badanych materiałów żyta nie stwierdzono występowania form całkowicie odpornych na mączniaka prawdziwego (*Blumeria graminis*), jednak na uwagę jako źródło odporności, które nie będzie obniżało plonu i wartości cech użytkowych mogą zostać wykorzystane rody HRSM 58 i DC 1127, który wykazał istotnie wyższą odporność od odmian wzorcowych.

Ocena porażenia materiałów genetycznych przez mączniaka prawdziwego w warunkach polowych przeprowadzona została we wszystkich miejscowościach, w których założono doświadczenia wstępne. Średnie porażenie badanych obiektów wynosiło 6,7 i mieściło się w granicach od 5,1 (RPD 271) do 7,9 (SMH 175, HRSM 18). Niewiele obiektów było bardziej tolerancyjnych od najlepszej z odmian wzorcowych Bosmo (7,5). Można wyróżnić zatem rody o poprawionej tolerancji na mączniaka prawdziwego, których ocena była wyższa SMH 175 (7,9), HRSM 18 (7,9), SMH 172 (7,2) lub dorównywała HRSM 60, HRSM 60, DC 45 i DC 91 odmianie Bosmo.

Wartości oceny odporności na mączniaka prawdziwego genotypów przesłanych przez hodowców zestawiono w tabeli 4. Jako wzorce odporności użyto odmiany populacyjne Bosmo i Dańkowskie Diament. Oceny nie udało się przeprowadzić dla 19 genotypów żyta ozimego, dla których nie uzyskano wschodów roślin, a dla kilku wschody roślin wystąpiły w jednym lub dwóch powtórzeniach. Większość badanych genotypów była podatna na porażenie przez mączniak prawdziwego, ale stwierdzono także formy odporne.

Przeprowadzona analiza wariancji wykazała istotne zróżnicowanie badanych genotypów żyta pod względem odporności na porażenie przez mączniaka prawdziwego (tabela 5). Porównanie średnich obiektowych testem Duncana pozwoliło na podział badanych genotypów żyta na pięć grup jednorodnych. Wśród tej grupy testowanych genotypów przesłanych do badań przez hodowców wystąpiły obiekty o wysokiej odporności na mączniaka prawdziwego, które uzyskały średnią ocenę 1. W sumie były trzy takie genotypy: CHD Ma 165, CHD Ma 182 oraz SOA Mącz 86, które utworzyły pierwszą grupę jednorodną form o najmniejszym stopniu porażenia przez mączniaka prawdziwego (tabela 6). Drugą grupę jednorodną genotypów o wysokiej odporności nie jest zbyt liczna i składa się z 3 obiektów (SOA Mącz 80, NR 2118A, WM 42R). Pozostałe badane genotypy nie wykazywały dobrej odporności na mączniaka prawdziwego i były silnie porażane.

Analizując stopień porażenia liści przez rdzę brunatną można stwierdzić, że badane genotypy nie charakteryzowały się pożądaną odpornością na tego patogena. W zestawieniu przedstawionym w tabeli 7 mieniono na 3 lub 4 w skali porażenia. Wystąpiły także obiekty bez

śladów zarodników rdzy brunatnej na liściach (SOA Mącz 98), które można uznać za odporne na porażenie przez tego patogena. Z informacji literaturowych można wywnioskować, że istnieje wysoka korelacja pomiędzy odpornością określoną metodą laboratoryjną a polową odpornością na rdzę brunatną.

Badane genotypy były silnie porażone przez rdzę brunatną w warunkach polowych (średnie porażenie 4,1). Podobnie jak w warunkach sztucznej inokulacji trudno jest znaleźć genotypy żyta o poprawionej odporności na rdzę brunatną. Porażenie badanych genotypów żyta było dość silne i wynosiło od 2,7 (DC 1133, NAD 675) do 6,1 (DC 42). Najbardziej tolerancyjnym z testerów okazała się odmiana Minello (5,9). Spośród badanych genotypów najbardziej tolerancyjnym na porażenie przez rdzę brunatną okazał się ród DC42 (6,1). Pozostałe rody były bardziej porażone niż odmiany wzorcowe Minello i Bosmo. Wyniki te potwierdzają konieczność intensyfikacji badań nad poszukiwaniem nowych źródeł odporności żyta na tego patogena.

W celu uzyskania informacji o genach odporności na mączniaka prawdziwego oraz rdzę brunatną, przeprowadzona została próba weryfikacji tych materiałów przy pomocy markerów molekularnych. Ponieważ u żyta nie ma opracowanych markerów sprzężonych z genami odporności na mączniak w pierwszym etapie wykorzystane są opracowane dla innych gatunków zbóż markery molekularne sprzężone z genami odporności na mączniaka prawdziwego. W przypadku odporności na rdzę brunatną sprawdzono występowanie wybrane starterów, które zgodnie z literaturą sprzężone są z genami odporności. Po dopracowaniu warunków reakcji PCR, ustalone zostały składy mieszanin reakcyjnych i profile termiczne dla poszczególnych par starterów. Zoptymalizowanie warunków reakcji pozwoli na wyodrębnienie linii posiadających markery sprzężone z genami odporności na rdzę po przeprowadzeniu analizy na wszystkich badanych obiektach. Startery do reakcji amplifikacji zostały już przetestowane i określone jako sprzężone z genami odporności na rdzę przez Nocente i wsp. 2007 (Euphytica 2007 155:329-336). Testowane startery stworzone zostały na bazie sekwencji genów związanych z odpornością na rdzę brunatną u żyta (geny oznaczone LR) oraz u pszenicy (geny oznaczone TC).

Poszukiwanie markerów sprzężonych z genami odporności na mączniaka prawdziwego

Wybrano genotypy żyta o najniższej odporności oraz genotypy charakteryzujące się najwyższą odpornością na porażenie mączniakiem prawdziwym. Z genotypów tych wyizolowano DNA do dalszych analiz molekularnych. Wybrane genotypy testowane są na obecność markerów sprzężonych z genami odporności na mączniaka prawdziwego. W celu sprawdzenia poprawności analiz molekularnych w zgromadzono kolekcję linii pszenicy posiadających poszukiwane u żyta geny *Pm*. Wspomniane wyżej odmiany i linie posłużą w badaniach molekularnych jako formy referencyjne, dla wykazania swoistości przeprowadzonych reakcji PCR.

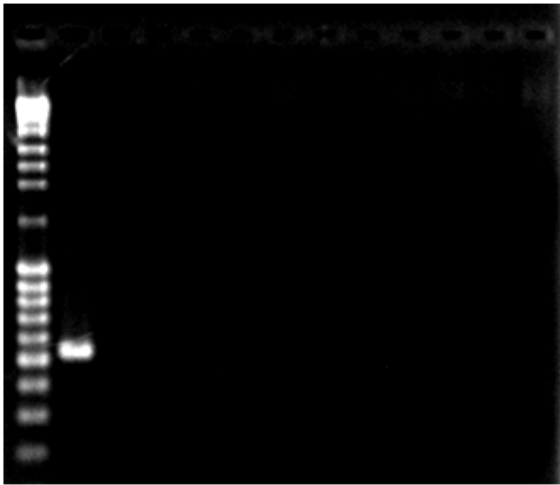
Posiadając informacje naukowe dotyczące markerów molekularnych sprzężonych z genami odporności na mączniaka prawdziwego u innych gatunków zbóż, a zwłaszcza pszenicy możliwe było przeprowadzenie analizy obecności wybranych markerów wśród badanych genotypów żyta ozimego. Postanowiono, podobnie jak w przypadku pszenżyta (Kowalczyk i in. 2011), wykorzystać markery molekularne określone jako sprzężone z poszczególnymi genami odporności *Pm* u pszenicy.

Dla wybranych linii wsobnych żyta o najniższym i o najwyższym stopniu porażenia mączniakiem prawdziwym przeprowadzono analizy molekularne stosując odpowiednie startery. Przeprowadzona analiza produktów amplifikacji dla linii wykazujących odporność (tolerancję) i wrażliwych na porażenie przez mączniaka prawdziwego z zastosowaniem w reakcjach PCR starterów właściwych dla poszukiwanych markerów molekularnych, wykazała:

- brak produktów amplifikacji,
- obecność produktów amplifikacji o oczekiwanej wielkości, wraz z dodatkowymi niespecyficznymi produktami,
- obecność niespecyficznymi produktów amplifikacji,
- obecność produktów o oczekiwanej wielkości.

W reakcjach PCR z określonymi dla genów odporności starterami zawsze brały udział również linie i odmiany referencyjne pszenicy, w celu stwierdzenia swoistości otrzymanych produktów amplifikacji. Obecność prążka o oczekiwanej wielkości u linii lub odmiany referencyjnej świadczyło o właściwych warunkach reakcji PCR.

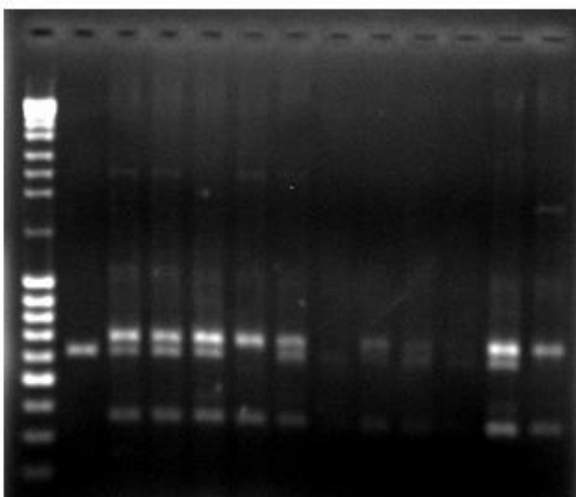
M K 1 2 3 4 5 6 7 8 9 10 11



Fot. 1. Rozdział elektroforetyczny produktów amplifikacji z zastosowaniem starterów właściwych dla markera specyficznego dla *Pm3e* dla genotypów żyta ozimego o najmniejszej podatności na porażenie mączniakiem prawdziwym. M – marker, K – kontrola- W150.

Brak produktów amplifikacji otrzymano dla przeprowadzonych reakcji PCR z zastosowaniem starterów właściwych dla markerów: specyficznego dla *Pm3e* oraz UTV14 (sprzężonego z *Pm13*). Jednakowe wyniki otrzymano zarówno dla linii żyta odpornego jak i dla linii żyta wrażliwego na porażenie mączniakiem prawdziwym. Może to świadczyć o braku obecności tych genów odporności w analizowanym materiale.

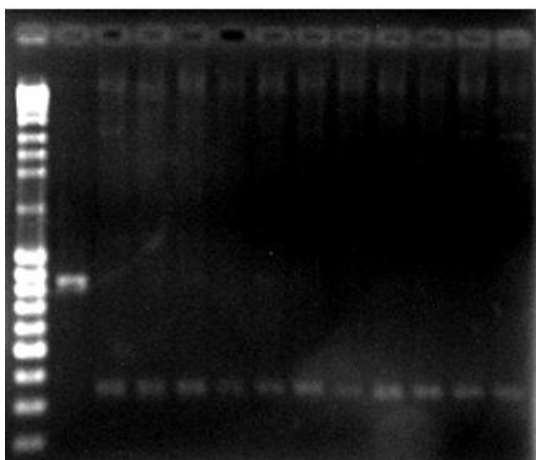
M K 1 2 3 4 5 6 7 8 9 10 11



Fot. 2. Rozdział elektroforetyczny produktów amplifikacji z zastosowaniem starterów właściwych dla markera specyficznego dla *Pm3f* dla genotypów żyta ozimego o najmniejszej podatności na porażenie mączniakiem prawdziwym. M – marker, K – kontrola- Michigan Amber/8*CC

Dla przeprowadzonych reakcji PCR z zastosowaniem starterów właściwych dla markera specyficznego dla *Pm3f* otrzymano produkty o oczekiwanej wielkości zarówno u linii odpornych jak i wrażliwych na porażenie mączniakiem prawdziwym, jednak w tym przypadkach wystąpiły także dodatkowe produkty amplifikacji.

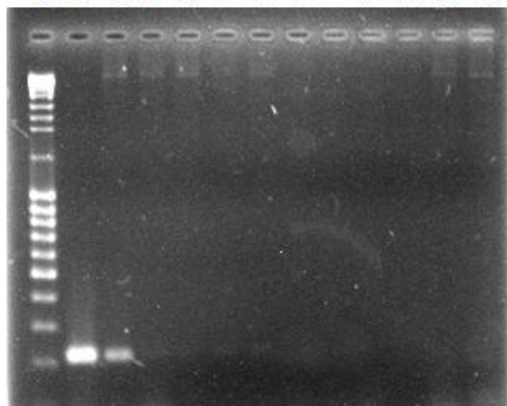
M K 1 2 3 4 5 6 7 8 9 10 11



Fot. 3. Rozdział elektroforetyczny produktów amplifikacji z zastosowaniem starterów właściwych dla markera specyficznego dla *Pm3c* dla genotypów żyta ozimego o najmniejszej podatności na porażenie mączniakiem prawdziwym. M – marker, K – kontrola- Sonora/8*CC

Stwierdzono powstawanie niespecyficzných produktów amplifikacji dla reakcji PCR przeprowadzonych z zastosowaniem starterów właściwych dla markerów: STS638 (*Pm1*), specyficznego dla *Pm3b*, specyficznego dla *Pm3c*, specyficznego dla *Pm3d*, specyficznego dla *Pm3g*.

M K 1 2 3 4 5 6 7 8 9 10 11



Fot. 4. Rozdział elektroforetyczny produktów amplifikacji z zastosowaniem starterów właściwych dla markera ResPm4 dla genotypów żyta ozimego o najmniejszej podatności na porażenie mączniakiem prawdziwym. M – marker, K – kontrola- Khapli/8*CC

Obecność produktów o oczekiwanej wielkości otrzymano dla przeprowadzonych reakcji PCR z zastosowaniem starterów właściwych dla markerów: Xcfd81-5D (*Pm2*), specyficznego dla *Pm3a*, Xgwmc356 (*Pm4a*), ResPm4 (*Pm4*), Xgwml59 (*Pm16*), IAG95 (*Pm17*), Xbarc144 (*Pm34*), Xwmc41 (*Pm43*). Za wyjątkiem markera ResPm4 (*Pm4*) i markera specyficznego dla *Pm3a* obecność wszystkich wyżej wymienionych markerów stwierdzono zarówno wśród linii wsobnych o najniższym jak i o najwyższym stopniu porażenia mączniakiem prawdziwym. Marker specyficzny dla *Pm3a* otrzymano tylko dla trzech genotypów wrażliwych na porażenie mączniakiem prawdziwym. Obecność markera ResPm4 stwierdzono u dwóch form należących do genotypów o najniższym stopniu porażenia mączniakiem prawdziwym. Natomiast marker Xgwml59 sprzężony z allelem *Pm4a* występował wśród wszystkich genotypów żyta ozimego, zarówno odpornych jak i wrażliwych na porażenie mączniakiem prawdziwym.

Wśród szesnastu testowanych markerów molekularnych znajdował się marker IAG95 sprzężony z genem *Pm17* u pszenicy. Gen *Pm17* jest jednym z czterech genów (*Pm7*, *Pm8*, *Pm17* i *Pm20*) przeniesionych do genomu pszenicy zwyczajnej z genomu żyta ozimego (Friebe i in. 1994; Heun i Fribe 1990; Heun i in. 1990). Wśród badanych genotypów żyta ozimego stwierdzono występowanie markera IAG95 zarówno wśród linii odpornych na porażenie jak i podatnych na porażenia przez *Blumeria graminis* f. sp. *secalis*. Zatem gen *Pm17* warunkujący odporność u pszenicy, nie warunkuje u żyta ozimego odporności na zastosowaną do inokulacji populację mączniaka prawdziwego.

Przeprowadzone analizy molekularne wskazują, że spośród wszystkich przebadanych markerów molekularnych sprzężonych z genami odporności na mączniaka prawdziwego u pszenicy, jedynie marker ResPm4 występuje tylko u genotypów żyta ozimego odpornych na porażenie mączniakiem prawdziwym. Marker ten może być wykorzystywany do selekcji materiałów hodowlanych żyta z genem odporności *Pm4* na mączniaka prawdziwego.

Na uwagę zasługują także markery dające specyficzne produkty amplifikacji charakterystyczne dla markerów sprzężonych z genami odporności *Pm2*, *Pm4a*, *Pm16*, *Pm17*, *Pm34* i *Pm43*, ale były one stwierdzane zarówno u genotypów tolerancyjnych, jak i wrażliwych na porażenie przez mączniaka prawdziwego. Wykazanie obecności markerów sprzężonych z tymi genami może świadczyć o ich obecności u analizowanych linii żyta ozimego, jednak nie warunkują one odporności na zastosowaną do sztucznej inokulacji populację patogena.

Markery molekularne sprzężone z genami *Pm* u pszenicy były dotychczas wykorzystywane w badaniach odpornościowych innych zbóż jedynie dla pszenżyta i dzikich gatunków należących do *Triticae*. Zespół Kowalczyk i in. (2011) przeprowadził charakteryzację mieszańców pszenżyta z pszenicą zawierających geny *Pm4b* i *Pm6*. Obecność wspomnianych genów odporności na mączniaka prawdziwego wśród badanych obiektów analizował za pomocą markerów molekularnych sprzężonych z tymi genami, opracowanymi przez Yi i in. (2008) oraz Ji i in. (2008). Także zespół Li i in. (2007) wykorzystywał w swoich badaniach nad mieszańcami pszenżyta z pszenicą markery molekularne sprzężone z genami odporności na mączniaka prawdziwego u pszenicy. Natomiast zespół Stępień i in. (2002) wykorzystał cztery markery STS sprzężone z genami *Pm1*, *Pm2*, *Pm3* i *Pm13* do analizy obecności tych genów wśród dzikich gatunków należących do *Triticae*. Dla dwóch spośród nich wykazano sprzężenie z genami odporności na mączniaka prawdziwego wśród dzikich gatunków należących do *Triticae*, i tym samym wykazano przydatność stosowania markerów opracowanych dla pszenicy w badaniach innych gatunków.

Nie było natomiast prób zastosowania w badaniach molekularnych żyta ozimego markerów molekularnych sprzężonych z genami odporności na mączniaka prawdziwego u pszenicy. Opisane w pracy badania były pierwszymi mającymi na celu zastosowanie tych

markerów molekularnych w celu wykazania obecności genów odporności na mączniaka prawdziwego u żyta ozimego. W badanych genotypach żyta ozimego wykazano obecność dziewięciu markerów sprzężonych z genami odporności na mączniaka prawdziwego u pszenicy [Xcfd81-5D (*Pm2*), specyficzny dla *Pm3a*, specyficzny dla *Pm3f*, Xgwmc356 (*Pm4a*), ResPm4 (*Pm4*), Xgwm159 (*Pm16*), IAG95 (*Pm17*), Xbarc144 (*Pm34*), Xwmc41 (*Pm43*)]. Markery te występowały zarówno wśród linii żyta ozimego odpornych jak i podatnych na porażenie mączniakiem prawdziwym, za wyjątkiem markera ResPm4 i markera specyficznego dla *Pm3a*. Marker specyficzny dla *Pm3a* występował tylko u trzech genotypów żyta podatnych na porażenie. Natomiast marker ResPm4 jako jedyny występował tylko u genotypów odpornych, a nie występował u genotypów podatnych na porażenie *Blumeria graminis* f. sp. *secalis*. Stwierdzono zatem sprzężenie tego markera z odpornością na mączniaka prawdziwego u żyta ozimego, a tym samym możliwość wykorzystywania markera ResPm4 w programach hodowlanych żyta ozimego wykorzystujących selekcję przy użyciu markerów (MAS).

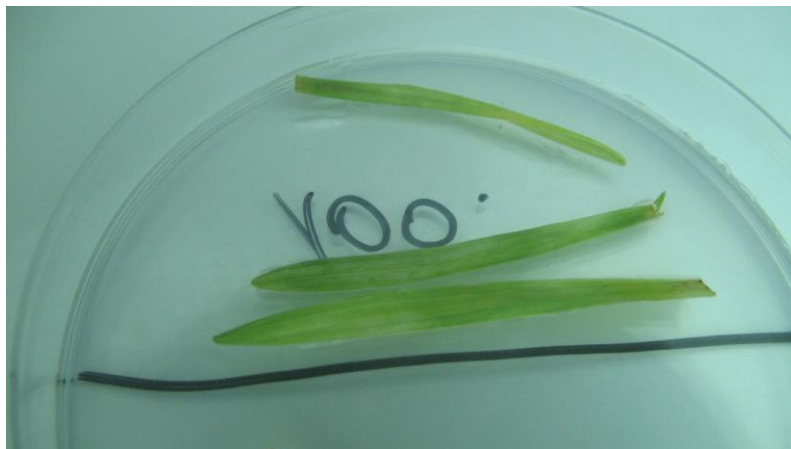
Wykazano również w ten sposób zasadność dalszego poszukiwania markerów molekularnych sprzężonych z genami odporności u żyta ozimego wśród markerów już zidentyfikowanych jako sprzężone z odpornością na tego patogena u innych spokrewnionych gatunków zbóż. Jest to metoda tańsza i bardziej wydajna niż testowanie wielu tysięcy nowych markerów.

Poszukiwanie markerów sprzężonych z genami odporności na rdzę brunatną

Badania wstępne, po izolacji genomowego DNA, obejmowały ustalenie optymalnych warunków reakcji łańcuchowej polimerazy dla wybranych starterów, które zgodnie z literaturą sprzężone są z genami odporności na rdzę brunatną. Do analizy, której wyniki przedstawione zostały poniżej, wykorzystane zostało DNA genotypów wykazujących odporność w testach laboratoryjnych oraz odmian wzorowych: Bosmo i Agrikolo. Na podstawie otrzymanych wyników, po dopracowaniu warunków, ustalone zostały składy mieszanin reakcyjnych i profile termiczne dla poszczególnych par starterów. Zoptymalizowanie warunków reakcji pozwoliło na wyodrębnienie linii posiadających markery sprzężone z genami odporności na rdzę po przeprowadzeniu analizy na wszystkich badanych obiektach. Startery do reakcji amplifikacji zostały już przetestowane i określone jako sprzężone z genami odporności na rdzę przez Nocente i wsp. 2007 (*Euphytica* 2007 155:329-336). Testowane startery stworzone zostały na bazie sekwencji genów związanych z odpornością na rdzę brunatną u żyta (geny oznaczone LR) oraz u pszenicy (geny oznaczone TC).

Wyniki reakcji PCR dla pary starterów Lr1. Marker sprzężony z genem odporności na rdzę Lr1 powinien posiadać długość około 560 pz. Wstępne testowanie starterów nie pozwoliło uzyskać ampikonu o tej długości u badanych genotypów. Jednak obecność prążków o innych długościach wskazuje na prawidłowe dobranie warunków reakcji. Konieczne jest przeprowadzenie analizy na innych obiektach.

Po przeprowadzeniu testów porażenia rdzą brunatną wśród materiałów hodowlanych przesłanych w 2012 roku do analiz molekularnych wybrana została tylko jedna forma SOA Mącz89. Tylko ten genotyp wykazywał odporność na rdzę brunatną w testach porażeniowych

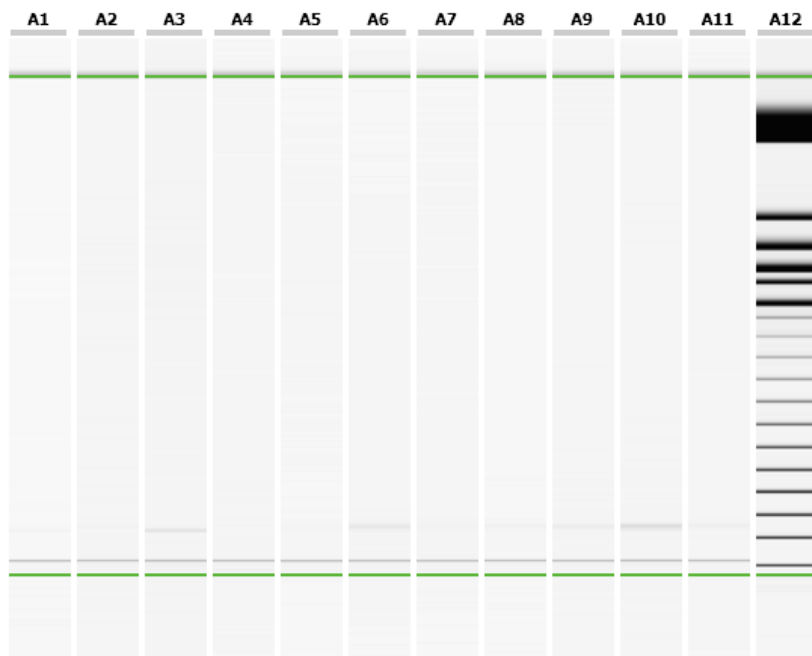


Fot. 5. Ocena porażenia przez rdzę brunatną genotypów żyta ozimego (SOA Mącz89) Dodatkowo ze względu na niską podatność na porażenie do analiz włączono DNA odmian: Słowiańskie, Agrikolo i Bosmo.

W analizach zastosowane zostały stratory stworzone na bazie sekwencji genów związanych z odpornością na rdzę brunatną u żyta (geny oznaczone LR) oraz u pszenicy (geny oznaczone TC): Lr1, Lr9, Lr24, Lr47, Lr10, TC680078, TC72745, TC76051 oraz TC77841.

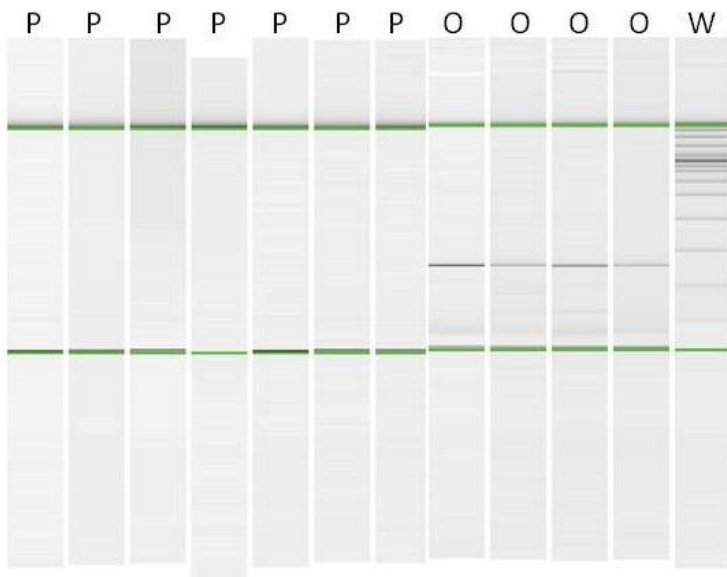
Wyniki reakcji PCR z zastosowaniem starterów Lr1, Lr9, Lr24, Lr47, nie dają jednoznacznych wyników ponieważ amplifikacja produktu następuje zarówno u form podatnych jak i odpornych na porażenie rdzą.

W grupie starterów związanych z genami odporności u pszenicy wyróżniał się marker sprzężony z genem odporności na rdzę TC72745. Produkt reakcji powinien posiadać długość ok. 740 pz. Testowanie starterów wykazało obecność ampikonów o podobnej długości ok. 800 pz u wybranych genotypów o wysokiej odporności. Nie obserwowano występowania markera u form podatnych na porażenie rdza brunatną. Powinien on jednak zostać sprawdzony na większej liczbie genotypów odpornych w celu weryfikacji jego stabilności.



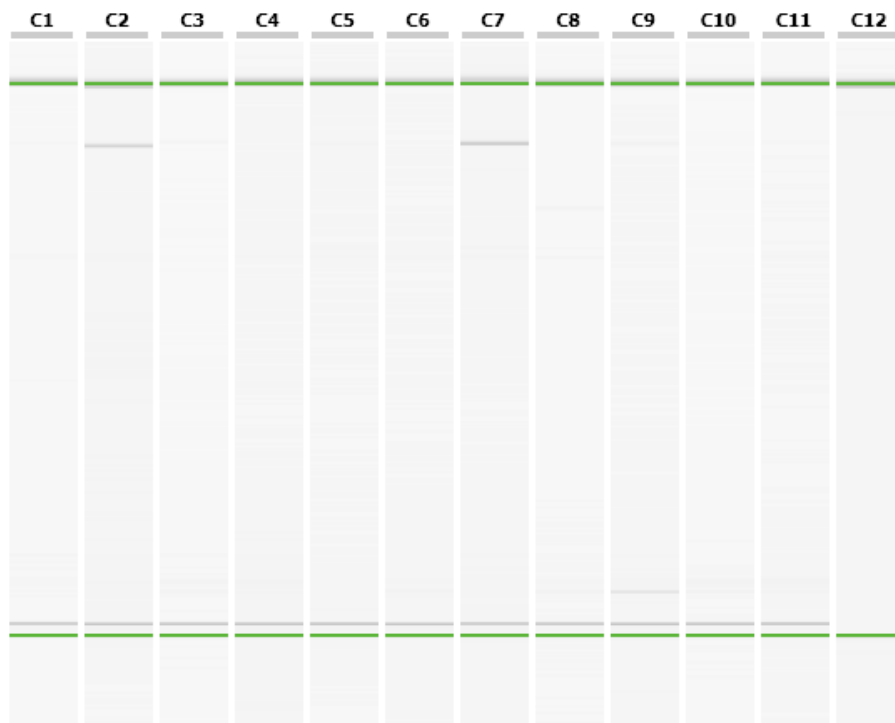
Fot. 6. Rozdział elektroforetyczny produktów amplifikacji z zastosowaniem starterów właściwych dla markera specyficznego dla Lrk10 dla genotypów żyta ozimego o najmniejszej podatności na porażenie przez rdzę brunatną

Wyniki reakcji PCR dla pary starterów Lrk10. Marker sprzężony z genem odporności na rdzę brunatną Lrk10 powinien posiadać długość ok. 650 pz. Wstępne testowanie starterów wykazało obecność ampikonów o długości ok. 1000 i więcej pz u przeanalizowanych genotypów. Poza przeprowadzeniem analizy na wszystkich genotypach konieczne będzie sprawdzenie wyników odporności na sztuczną inokulację aby sprawdzić czy marker o większej liczbie par zasad jest rzeczywiście związany z genem odporności.

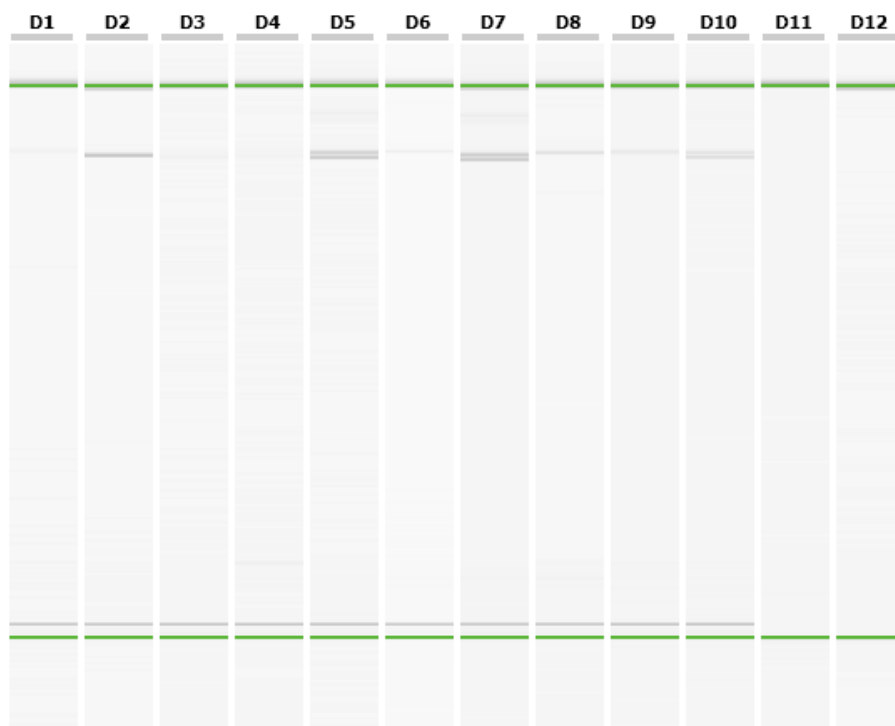


Fot. 7. Rozdział elektroforetyczny produktów amplifikacji z zastosowaniem starterów właściwych dla markera specyficznego dla TC 72745 dla genotypów żyta ozimego o najmniejszej podatności na porażenie przez rdzę brunatną

Wyniki reakcji PCR dla pary starterów TC72745. Marker sprzężony z genem odporności na rdzę TC72745 powinien posiadać długość ok. 740 pz. Wstępne testowanie starterów wykazało obecność ampikonów o podobnej długości ok. 800 pz u wybranych genotypów.



Fot. 8. Rozdział elektroforetyczny produktów amplifikacji z zastosowaniem starterów właściwych dla markera specyficznego dla TC 76051 dla genotypów żyta ozimego o najmniejszej podatności na porażenie przez rdzę brunatną
W przypadku tej pary starterów spodziewana długość amplicjonu to 816 pz i fragmenty o takiej długości zostały powielane w trakcie reakcji.



Fot. 9. Rozdział elektroforetyczny produktów amplifikacji z zastosowaniem starterów właściwych dla markera specyficznego dla TC 77841 dla genotypów żyta ozimego o najmniejszej podatności na porażenie przez rdzę brunatną

Startery TC77841 powinny umożliwiać amplifikację fragmentu DNA sprzężonego z genem odporności na rdzę TC77841 o długości 506. Próbną reakcją łańcuchowej polimerazy nie pozwolono na uzyskanie fragmentów o tej długości.

W analizach zastosowane zostały startery stworzone na bazie sekwencji genów związanych z odpornością na rdzę brunatną u żyta (geny oznaczone LR) oraz u pszenicy (geny oznaczone TC): Lr1, Lr9, Lr24, Lr47, Lr10, TC680078, TC72745, TC76051 oraz TC77841.

Wyniki reakcji PCR z zastosowaniem starterów Lr1, Lr9, Lr24, Lr47, nie dają jednoznacznych wyników ponieważ amplifikacja produktu następuje zarówno u form podatnych jak i odpornych na porażenie rdzą.

W grupie starterów związanych z genami odporności u pszenicy wyróżniał się marker sprzężony z genem odporności na rdzę TC72745. Produkt reakcji powinien posiadać długość ok. 740 pz. Testowanie starterów wykazało obecność ampikonów o podobnej długości ok. 800 pz u wybranych genotypów o wysokiej odporności. Nie obserwowano występowania markera u form podatnych na porażenie rdzą brunatną. Powinien on zostać sprawdzony na większej liczbie genotypów odpornych w celu weryfikacji jego stabilności.

Podsumownie i wnioski

- Wśród badanych genotypów żyta ozimego nie stwierdzono występowania form całkowicie odpornych na porażenie mączniakiem prawdziwym.
- Cenny materiał wyjściowy w programach hodowli odpornościowej żyta ozimego na mączniaka prawdziwego (*Bumeria graminis* f. sp. *secalis*) mogą stanowić formy CHD Ma 165, CHD Ma 182 i SOA Mącz 86 oraz SOA Mącz 80, NR 2118A i WM 42R, które wykazały wysoką tolerancję na porażenie przez tego patogena.
- Analiza występowania markerów molekularnych wykazała obecność oczekiwanych produktów amplifikacji dla markerów sprzężonych z genami *Pm2*, *Pm3a*, *Pm3f*, *Pm4*, *Pm4a*, *Pm16*, *Pm17*, *Pm34*, *Pm43*. Występowanie wszystkich wyżej wymienionych markerów z wyjątkiem markera ResPm4 (*Pm4*) i markera specyficznego dla *Pm3a* stwierdzono wśród linii wsobnych o najniższym i o najwyższym stopniu porażenia mączniakiem prawdziwym.
- Spośród przebadanych 16 markerów sprzężonych z genami odporności na mączniaka prawdziwego u pszenicy, wykazano przydatność jednego markera do poszukiwania genów odporności Pm4 na mączniaka prawdziwego. Występowanie markera ResPm4 w grupie linii żyta najmniej podatnych na porażenie mączniakiem prawdziwym, wskazuje na jego sprzężenie z cechą odporności na mączniaka prawdziwego u żyta ozimego.
- Marker ResPm4 może być wykorzystywany w programach hodowlanych żyta ozimego wykorzystujących selekcję przy użyciu markerów molekularnych (MAS), w celu szybkiej identyfikacji, wśród badanych genotypów żyta, genów odporności na mączniaka prawdziwego. Obecność markera wskazuje na tolerancję danego genotypu na tego patogena.
- Wśród badanych genotypów żyta wystąpiła silna podatność na porażenie przez rdzę brunatną (*Puccinia recondita*), jednak na uwagę jako źródło odporności, które nie będzie obniżać plonu i wartości cech użytkowych może zostać wykorzystany ród SOA Mącz 89, u którego nie zauważono objawów zarodników grzyba.
- Użyte startery mikrosatelitarne SSR pozwoliły na wykazanie obecności genów odporności na rdzę brunatną Lr1 oraz Lrk 10 u niektórych z analizowanych genotypów

żyta ozimego. Wymagają one jednak weryfikacji, ponieważ występowały one także u niektórych genotypów podatnych na porażenie rdzą brunatną.

- Otrzymano kilka nowych populacji żyta o poprawionej odporności, które mogą stanowić materiał wyjściowy do wyprowadzania linii i populacji odpornych na mączniaka prawdziwego i rdzę brunatną.
- W grupie starterów związanych z genami odporności na rdzę brunatną wyróżniał się marker sprzężony z genem odporności na rdzę TC72745. Produkt reakcji powinien posiadać długość ok. 740 pz. Testowanie starterów wykazało obecność ampikonów o podobnej długości ok. 800 pz u wybranych genotypów o wysokiej odporności. Nie obserwowano występowania markera u form podatnych na porażenie rdzą brunatną. Powinien on jednak zostać sprawdzony na większej liczbie genotypów odpornych w celu weryfikacji jego stabilności
- Wyniki badań potwierdzają zasadność dalszego ich kontynuowania, w celu poszukiwania markerów sprzężonych z genami odporności na mączniaka prawdziwego i rdzę brunatną u żyta.

7. Najważniejsze osiągnięcia.

- Wykazano przydatność markera *ResPm4* do poszukiwania genów odporności Pm4 na mączniaka prawdziwego w materiałach hodowlanych żyta. Marker może być wykorzystywany w programach hodowlanych żyta ozimego prowadzących selekcję przy użyciu markerów molekularnych (MAS), w celu szybkiej identyfikacji, wśród badanych genotypów żyta, genów odporności na mączniaka prawdziwego. Obecność markera wskazuje na tolerancję danego genotypu na tego patogena.
- Laboratoryjna metoda oceny podatności genotypów żyta na porażenie przez rdzę brunatną (*Puccinia recondita*) okazała się szybka, dającą obiektywne wyniki i przydatna w poszukiwaniu genotypów żyta odpornych na tego patogena. Potwierdzeniem przydatności tej metody były wyniki badania obecności markerów molekularnych sprzężonych z genami odporności na rdzę brunatną u form żyta tolerancyjnych na tego patogena.

8. Forma upowszechnienia wyników

Wyniki będą dostępne na specjalnej stronie internetowej Wydziału Przyrodniczo-Technologicznego Uniwersytetu Przyrodniczego we Wrocławiu, w zakładce Katedra Genetyki, Hodowli Roślin i Nasiennictwa:

http://www.up.wroc.pl/uczelnia/9643/katedra_genetyki_hodowli_roslin_i_nasiennictwa.html

9. Wykaz prac opublikowanych w roku sprawozdawczym dot. danego tematu:

W bieżącym roku opublikowano następujące prace będących wynikiem realizacji tematu:

Bujak H., Nowosad K., Kozak B., Galek R., Sawicka-Sienkiewicz E. 2012.

Wykorzystanie markerów molekularnych w badaniach nad obiektami z rodzaju *Secale* i *Lupinus*. Materiały Konferencji Naukowej „Hodowla” Kraków,

Bujak H., Nowosad K., Jurkowski A. 2012. Poszukiwanie genów odporności na mączniaka prawdziwego i rdzę brunatną w materiałach hodowlanych żyta ozimego.

10. Wykaz prac złożonych do druku.

Bujak, H., Jurkowski A. 2012. Estimation of winter rye *Secale cereale* L. susceptibility to infection by the powdery mildew *Blumeria graminis* f. sp. *Secalis*. Acta Agrobotanica (praca po pozytywnych recenzjach).

11. Przyczyny ewentualnych odstępstw od harmonogramu zapisanego w karcie realizacji tematu.

12. Informacja o wynikach współpracy naukowo-technicznej krajowej i z zagranicą (przy współpracy z zagranicą podać kraj, firmę, temat).

W realizacji tematu podjęto współpracę z stacjami hodowli, które prowadzą hodowlę twórczą odmian żyta ozimego. Materiały do badań pochodzą między innymi z Hodowli Roślin DANKO Sp. z o. o., Poznańskiej Hodowli Roślin Sp. z o.o. oraz Hodowli Roślin Smolice Sp. z o. o. Grupa IHAR. Współpracujące jednostki dostarczają potrzebnych materiałów do badań, prowadzą obserwacje polowe oraz dostarczają potrzebnego inokulatu patogenów potrzebnego do sztucznej inokulacji i oceny podatności genotypów w warunkach szklarniowych i laboratoryjnych.

13. W przypadku udziału w konferencjach, sympoziach, szkoleniach i warsztatach itp., w szczególności zagranicznych:

- a) cel i korzyści oraz stopień wykorzystania do realizacji zadania;
- b) w jaki sposób wyjazd podniósł wartość merytoryczną realizowanego zadania.

W bieżącym roku wykonawcy projektu brali udział w konferencji naukowej:

- Zjazd Katedr Hodowli Roślin i Nasiennictwa, Kraków

na których przedstawiono referat oraz pracę w formie posteru wykorzystując w nich między innymi wyniki uzyskane w trakcie realizacji projektu badawczego.

Bujak H., Nowosad K., Kozak B., Galek R., Sawicka-Sienkiewicz E. 2012. Wykorzystanie markerów molekularnych w badaniach nad obiektami z rodzaju *Secale* i *Lupinus*.

Bujak H., Nowosad K., Jurkowski A. 2012. Poszukiwanie genów odporności na mączniaka prawdziwego i rdzę brunatną w materiałach hodowlanych żyta ozimego.

dr hab. prof. nadzw. Henryk Bujak

Wrocław, 10.12.2012 r.

Data

Podpis kierownika tematu