

SPRAWOZDANIE O STANIE REALIZACJI ZADANIA

z wykonania badań podstawowych na rzecz postępu biologicznego w produkcji roślinnej
w 2013 roku

1. Nr decyzji MRiRW: **HOR hn 801-14/13 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
mgr inż. Agnieszka Łącka
mgr inż. Jolanta Górecka

6. Informacja o realizacji prac w roku 2013

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. 48 obiektów, w tym 2 odmiany wzorcowe;

2. Formy żyta ozimego przekazane przez:

2.1. DANKO Hodowla Roślin Sp. z o. o.

CHD Ma 205 – CHD Ma 244,

LAD 78- LAD 177,

SOA Mącz113 – SOA Ma 159

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

WS1/12 – WS15/12

NS1/12 – NS 80/12

WM18R – WM 50R

2.3 Linie wsobne Katedry Genetyki, Hodowli Roślin i Nasiennictwa Uniwersytetu Przyrodniczego we Wrocławiu

UP1/2 – UP270

W roku 2013 łącznie poddano testowaniu na odporność na mączniaka prawdziwego i rdzę brunatną 472 genotypy żyta ozimego. Były to dostarczone przez hodowców linie wsobne, populacje oraz odmiany wzorcowe (Bosmo, Dańkowskie Diament) oraz własne linie wsobne z pochodzące z kolekcji Katedry Genetyki, Hodowli Roślin i Nasiennictwa Uniwersytetu Przyrodniczego we Wrocławiu.

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 (1–4), gdzie 1 – oznaczało brak objawów natomiast 4 – 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 szlakach Petriego przygotowano pożywkę skradającą się z agaru z dodatkiem benzimidazolu. Liście dziesięciodniowych siewek żyta układano na pożywce, a następnie infekowano przegotowanym 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, a 4 – silne objawy porażenia rdzą brunatną na liściu.

Ponadto w celu poszukiwania genotypów odpornych na obydwie patogeny wykonano obserwacje stopnia porażenia linii wsobnych w warunkach polowych pod wpływem naturalnej inokulacji. Obserwacje wykonano w ogólnie przyjętej przez hodowców i ocenę odmian 9-cio stopniowej skali bonitacyjnej, gdzie 9 oznacza całkowitą odporność, brak objawów porażenia, a 1 silną podatność, czyli objawy porażenia roślin występują na 75-90 % powierzchni liści.

Do statystycznego opracowania wyników obserwacji przeprowadzono transformację wyników, w celu uzyskania ciągłości 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 i rdze 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 kapilarnej. Rozdział prowadzono za pomocą systemu do rozdziału kapilarnego Qiaxcel na żelach High Resolution. Analizom molekularnym poddawano genotypy żyta najmniej podatne na porażenie mączniakiem prawdziwym, a następnie wykonywano amplifikację dla genotypów wrażliwych, w celu analizy różnic uzyskiwanych produktów.

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

Celem badań była identyfikacja źródeł genetycznej odporności na aktualnie występujące rasy mączniaka prawdziwego oraz rdzy brunatnej w liniach, odmianach i rodach żyta ozimego. Wykonano oceny odporności genotypów żyta ozimego w warunkach szklarniowych i laboratoryjnych wykorzystując sztuczną inokulację oraz w warunkach polowych pod wpływem naturalnej presji patogenów. Wyizolowane DNA genomowe posłużyło do poszukiwania markerów molekularnych sprzężonych z genami odporności na mączniaka prawdziwego i rdzę brunatną. W tym celu wykorzystano znane z literatury informacje na temat markerów molekularnych sprzężonych 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,
- ocenę porażenia genotypów żyta ozimego przez rdzę brunatną w warunkach sztucznej inokulacji,
- ocenę porażenia genotypów żyta ozimego przez mączniaka prawdziwego i rdzę brunatną w doświadczeniu polowym pod wpływem naturalnej infekcji,
- izolację genomowego DNA żyta ozimego z kolekcji linii, odmian i rodów,
- poszukiwanie genów odporności na mączniaka prawdziwego u badanych form żyta z wykorzystaniem markerów molekularnych,
- poszukiwanie genów odporności na rdzę brunatną u badanych form żyta z wykorzystaniem markerów molekularnych.

W jakim stopniu cel badania został osiągnięty

W roku bieżącym wykonano 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* i *Puccinia recondita* objęto ogółem 472 genotypy pochodzące ze stacji hodowli roślin (Choryń, Laski, Sobiejuchy, Nagradowice, Smolice) oraz materiały należące do Uniwersytetu Przyrodniczego we Wrocławiu. W pierwszym doświadczeniu oceniono stopień porażenia mączniakiem prawdziwym rodów z doświadczenia wstępnego. Analizie poddano 46 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 zróżnicowanie i wynosił od 1,67 (rody DC 28, DC 1123, DC 1140, HRSM 50, HRSM 58) do 3 (11 obiektów). W celu zweryfikowania hipotezy o braku zróżnicowania badanych obiektów pod względem odporności na mączniaka prawdziwego na wartościach podatnych transformacji wykonano analizę wariancji. Średnie kwadraty z analizy wariancji wykazały istotność zróżnicowania badanych genotypów pod względem tej cechy (tabela 2).

Przy użyciu testu Duncana porównano średnie wartości ocen porażenia przez mączniaka, co umożliwiło na podział badanych genotypów żyta na pięć zachodzących na siebie grup jednorodnych. Wyodrębnianie grup jednorodnych genotypów odbywało się na wartościach przetransponowanych, natomiast w tabeli 3 zestawiano dodatkowo wartości po ponownym ich przeliczeniu na skalę oceny. Podana wartość najmniejszej istotnej różnicy (NIR) dotyczy wartości poddanych transformacji.

Wśród badanych rodów z doświadczenia wstępnego można wyróżnić pięć, które wykazały wyższą odporność na porażenie przez mączniaka od najmniej porażonej odmiany wzorcowej (Bosmo). Są to rody DC 28, DC 1123, DC 1140 i HRSM 50, HRSM 58, które uzyskały średnią ocenę na poziomie 1,67 i zaliczono je do pierwszej grupy jednorodnej. Ponadto rody DC 1167, DC 1168 i RPD 410 wykazywały odporność na poziomie odmiany Bosmo i także zostały zaliczone do pierwszej grupy jednorodnej.

Wśród badanych materiałów żyta nie stwierdzono występowania form całkowicie odpornych na mączniaka prawdziwego (*Blumeria graminis*), jednak na uwagę, jako potencjalne źródło odporności, które nie będzie obniżało plonu i wartości innych cech użytkowych mogą być wykorzystane rody DC 28, DC 1123, DC 1140, HRSM 50 i HRSM 58, które charakteryzują się istotnie wyższą odpornością od odmian wzorcowych.

Wartości ocen odporności na mączniaka prawdziwego pod wpływem sztucznej inokulacji 125 genotypów żyta przesłanych przez hodowców zestawiono w tabeli 4. Wzorcami odporności były populacyjne odmiany Bosmo i Dańkowskie Diament. Oceny nie udało się przeprowadzić dla czterech genotypów żyta ozimego, dla których nie uzyskano wschodów roślin. Większość badanych genotypów żyta była podatna na porażenie przez mączniak prawdziwy, jednak stwierdzono także formy odporne.

Wykonana analiza wariancji wykazała istotne zróżnicowanie badanych genotypów żyta pod względem ich odporności na porażenie przez mączniaka prawdziwego (tabela 5). Porównanie średnich obiektowych testem Duncana pozwoliło na podział badanych genotypów żyta na pięć zachodzących na siebie grup jednorodnych (tabela 6). Wśród tej grupy testowanych genotypów przesłanych do badań przez hodowców wystąpiły obiekty o wysokiej odporności, które uzyskały średnią ocenę 1. W sumie było dziewięć takich genotypów: CHD Ma 222, CHD Ma 223, CHD Ma 224, CHD Ma 227, CHD Ma 233, CHD Ma 239, CHD Ma 240, SOA Mącz 117 oraz SOA Mącz 146. Genotypy te oraz kolejnych pięć zaliczono do pierwszej grupy jednorodnej form o najmniejszym stopniu porażenia przez mączniaka prawdziwego. Dugą grupę jednorodną genotypów o wysokiej odporności uzupełniają kolejnych siedem genotypów. Grupy pierwsza i druga zachodzą na siebie. Na uwagę zasługują przede wszystkim genotypy z pierwszej grupy jednorodnej, charakteryzujące się wysoką odpornością na mączniaka prawdziwego, które mogą stanowić dobry materiał wyjściowy do hodowli odmian odpornych na tego patogena. Pozostałe badane genotypy nie wykazywały dobrej odporności na mączniaka prawdziwego i były silnie porażane.

Analizując stopień porażenia liści przez rdzę brunatną w warunkach sztucznej inokulacji można stwierdzić, że badane genotypy nie charakteryzowały się pożądaną odpornością na tego patogena. W zestawieniu przedstawionym w tabeli 7 większość z 219 badanych genotypów było podatnych na porażenie i zostały ocenione na 3 lub 4 w użytej czterostopniowej skali porażenia.

Wystąpiły także dwa obiekty bez śladów zarodników rdzy brunatnej na liściach (NS 16/12, NS 17/12), które można uznać za odporne na porażenie przez tego patogena oraz osiem obiektów tolerancyjnych ocenionych na 2 w przyjętej skali (CHD Ma 237, CHD Ma 238, CHD Ma 213, WS 14/12, WS 15/12, NS 19/12, NS 20/12, NS 80/12). Z informacji literaturowych można

wywnioskować, że istnieje wysoka korelacja pomiędzy odpornością określoną metodą laboratoryjną a połową odpornością na rdzę brunatną.

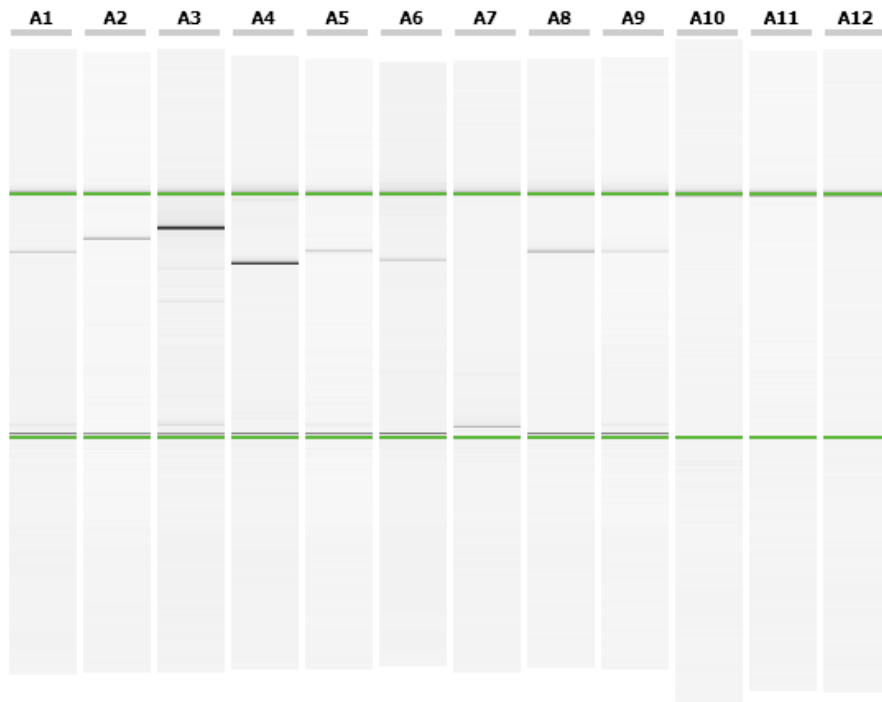
W tabeli 8 przedstawiono oceny porażenia badanych genotypów w warunkach sztucznej inokulacji przez obydwu patogeny. Wynika z niej, że genotypy mniej podatne na porażenie przez jeden z patogenów są silniej porażane przez drugi z nich. Na wyróżnienie zasługują jedynie trzy genotypy o średnim poziomie odporności zarówno na mączniaka prawdziwego, jaki rdzę brunatną. Są to CHD Ma 213, CHD Ma 237 i CHD Ma 238, które w obydwu testach odporności uzyskały oceny 2.

W doświadczeniu polowym przeprowadzono ocenę stopnia porażenia 205 linii żyta ozimego przez mączniaka prawdziwego i rdzę brunatną w warunkach naturalnej infekcji. Wyniki tych ocen zestawiono w tabeli 9. Wśród badanych genotypów było 13 linii całkowicie odpornych na mączniaka prawdziwego (ocena 9) oraz 45 linii w dużym stopniu tolerancyjnych na porażenie przez tego patogena. Niestety zupełnie inaczej wyglądają oceny stopnia porażenia tych linii przez rdzę brunatną. Najwyższe oceny (6 w 9-cio stopniowej skali) uzyskały jedynie cztery linie UP 51/1, UP 110, UP 113 i UP 116, a kolejne dwie UP 27/1 i UP 117 uzyskały oceny 4. Wymienione linie można uznać za średnio tolerancyjne na porażenie przez tego patogena. Pozostałe linie były bardzo mocno porażone przez rdzę brunatną. Bieżący rok był sprzyjający pojawieniu się i silnemu rozprzestrzenianiu się chorób pochodzenia grzybowego, dlatego większość badanych genotypów było silnie porażonych przez rdzę brunatną w warunkach polowych. Podobnie jak w warunkach sztucznej inokulacji trudno jest znaleźć genotypy żyta o poprawionej odporności na tego patogena. Wymienione wcześniej linie średnio tolerancyjne na rdzę brunatną, charakteryzowały się podobną tolerancją na mączniaka prawdziwego. Oceny porażenia tych linii przez mączniaka prawdziwego wynosiły od 5 do 7. Ponieważ wśród przebadanych materiałów żyta ozimego nie ma form całkowicie odpornych, dlatego istnieje pilna potrzeba poszukiwania nowych genów odporności i wprowadzania ich do materiałów hodowlanych. Uzyskane wyniki potwierdzają konieczność intensyfikacji badań nad poszukiwaniem nowych źródeł odporności żyta na badane patogeny.

Poszukiwanie markerów sprzężonych z genami odporności na mączniaka prawdziwego

Następnie wybrano genotypy żyta o najniższej odporności oraz 11 genotypów charakteryzujących się najwyższą odpornością na porażenie mączniakiem prawdziwym: CHD Ma222, CHD Ma223, CHD Ma224, CHD Ma244, CHD Ma227, CHD Ma233, CHD Ma239, CHD Ma240, SOA Mącz177, SOA Mącz146

Z genotypów tych wyizolowano DNA do dalszych analiz molekularnych. Wybrane genotypy testowane były na obecność markerów sprzężonych genami odporności na mączniaka prawdziwego. W celu sprawdzenia poprawności analiz molekularnych w bieżącym roku zgromadzono kolekcję linii posiadających poszukiwane u żyta geny Pm. Wspomniane wyżej odmiany i linie posłużą w badaniach molekularnych jako formy referencyjne, dla wykazania swoistości przeprowadzonych reakcji PCR. W sprawozdaniu za rok poprzedni podano sekwencje starterowe markerów specyficznych i sprzężonych z poszczególnymi genami odporności, nazwy linii referencyjnych i źródła literaturowe ich pochodzenia. W tabeli 1 przedstawiono ocenę odporności na mączniaka prawdziwego zgromadzonych linii i odmian referencyjnych z poszczególnymi genami odporności na mączniaka prawdziwego. W warunkach sztucznej infekcji efektywną pełną odporność wykazało 9 z 16 zgromadzonych form referencyjnych. Nie obserwowano u nich żadnych objawów porażenia. Pozostałe formy były w niewielkim stopniu porażone, co wskazuje na stopniowe przełamywanie ich odporności.



Fot.1 Rozdziel elektroforetyczny produktów amplifikacji z zastosowaniem starterów właściwych dla wykrywania markerów) sprzężonych z genami Pm3A-A1, Pm3c-A2, Pm3d-A3, Pm3e-A4, Pm3f-A5, Pm3g-A6, Pm 4- A8, A9.

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.

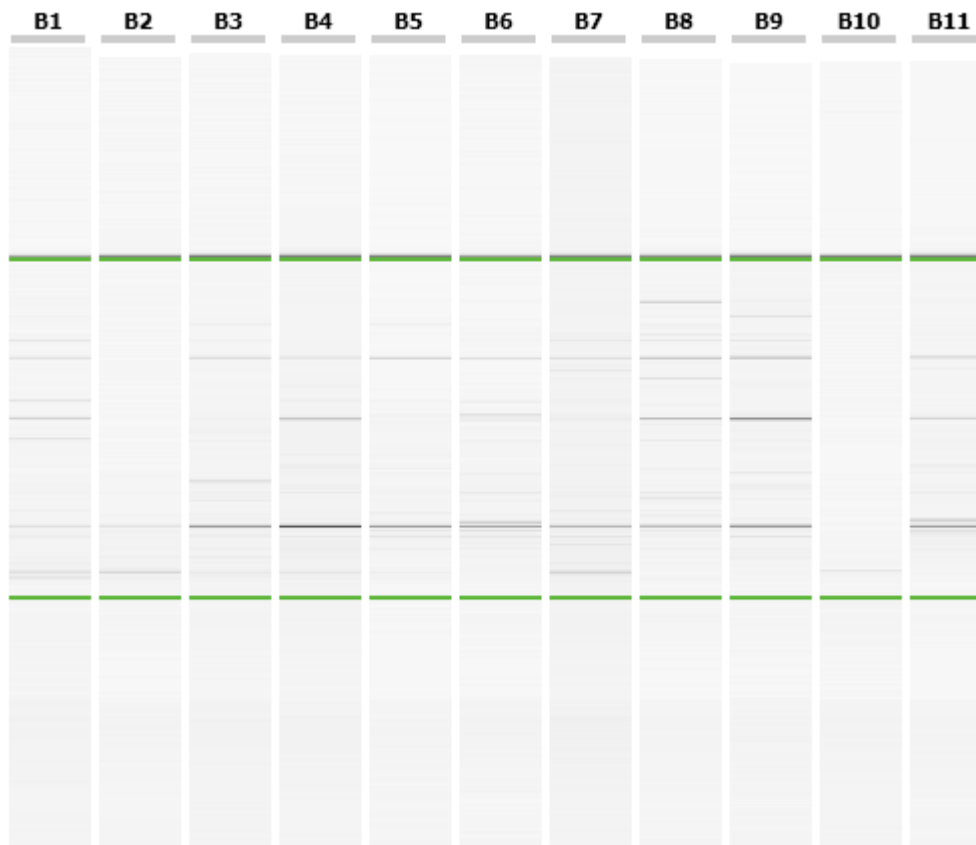
Dla wybranych linii wsobnych żyta o najniższym i o najwyższym stopniu porażenia mączniakiem prawdziwym przeprowadzono analizy molekularne stosując odpowiednie startery. Przeprowadzona analiza produktów amplifikacji dla linii wykazujących odporność (tolerancję) i wrażliwych na porażenie przez mączniaka 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 produktami 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.

Dla przeprowadzonych reakcji PCR z zastosowaniem starterów właściwych dla markera specyficznego dla genu *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. Powstawanie niespecyficznymi produktami amplifikacji stwierdzono również dla reakcji PCR przeprowadzonych z zastosowaniem starterów

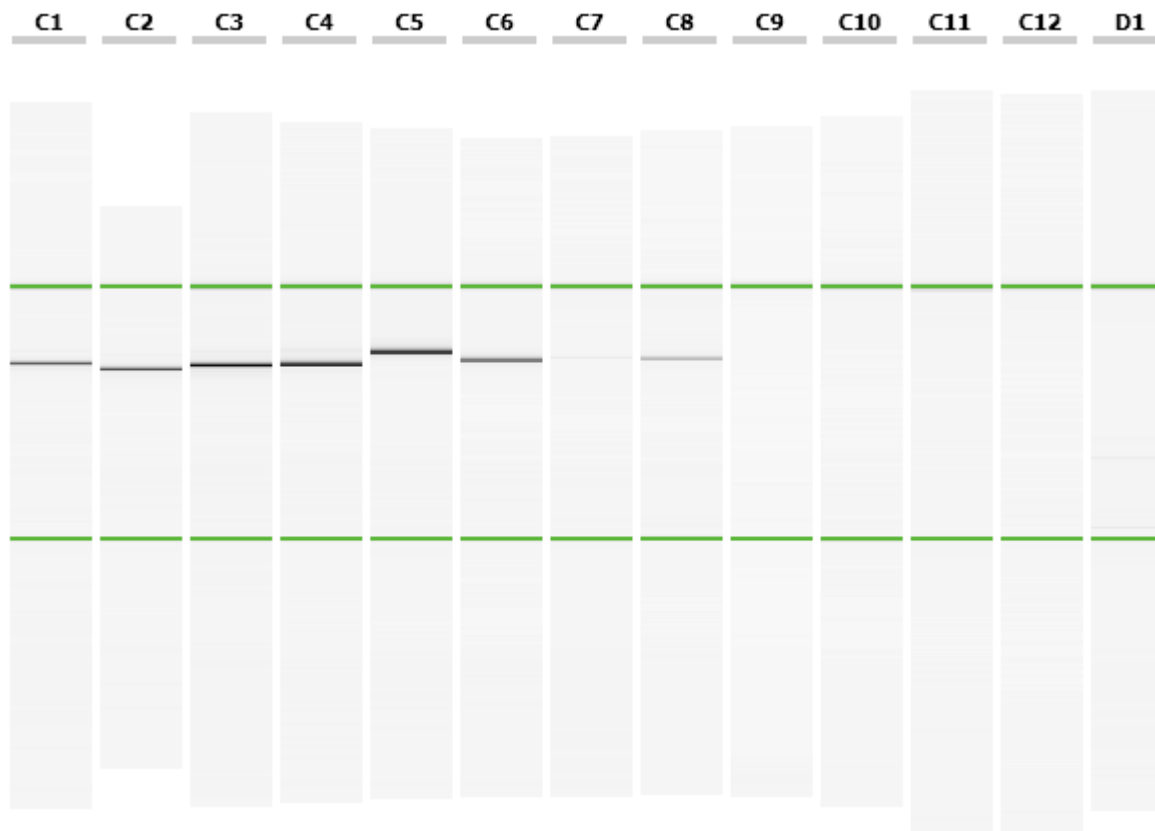
właściwych dla markerów: STS638 (*Pm1*), specyficznego dla *Pm3b*, specyficznego dla *Pm3c*, specyficznego dla *Pm3d*, specyficznego dla *Pm3g*.



Fot.2 Rozdział elektroforetyczny produktów amplifikacji z wykorzystaniem starterów specyficznym sprzężonych z genem *Pm3b* (B1-B11 – genotypy żyta o najwyższej odporności na porażenie mączniakiem prawdziwym).

Analiza uzyskanych produktów amplifikacji dla markerów: Xcfd81-5D (*Pm2*), specyficznego dla *Pm3a*, Xgwmc356 (*Pm4a*), ResPm4 (*Pm4*), Xgwm159 (*Pm16*), IAG95 (*Pm17*), Xbarc144 (*Pm34*), Xwmc41 (*Pm43*) wykazała obecność markera o przewidywanej wielkości jednak marker ten stwierdzono zarówno wśród linii wsobnych o najniższym jak i o najwyższym stopniu porażenia mączniakiem prawdziwym.

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.



Fot.3 Rozdziel elektroforetyczny produktów amplifikacji z zastosowaniem starterów właściwych dla markera ResPm4 dla genotypów żyta ozimego o najmniejszej podatności na porażenie mączniakiem prawdziwym C1-C8 (kolejno CHD Ma 222, CHD Ma 223, CHD Ma224, CHD Ma227, CHD Ma239, SOA Mącz 117, SOA Mącz 146, CHD Ma240)

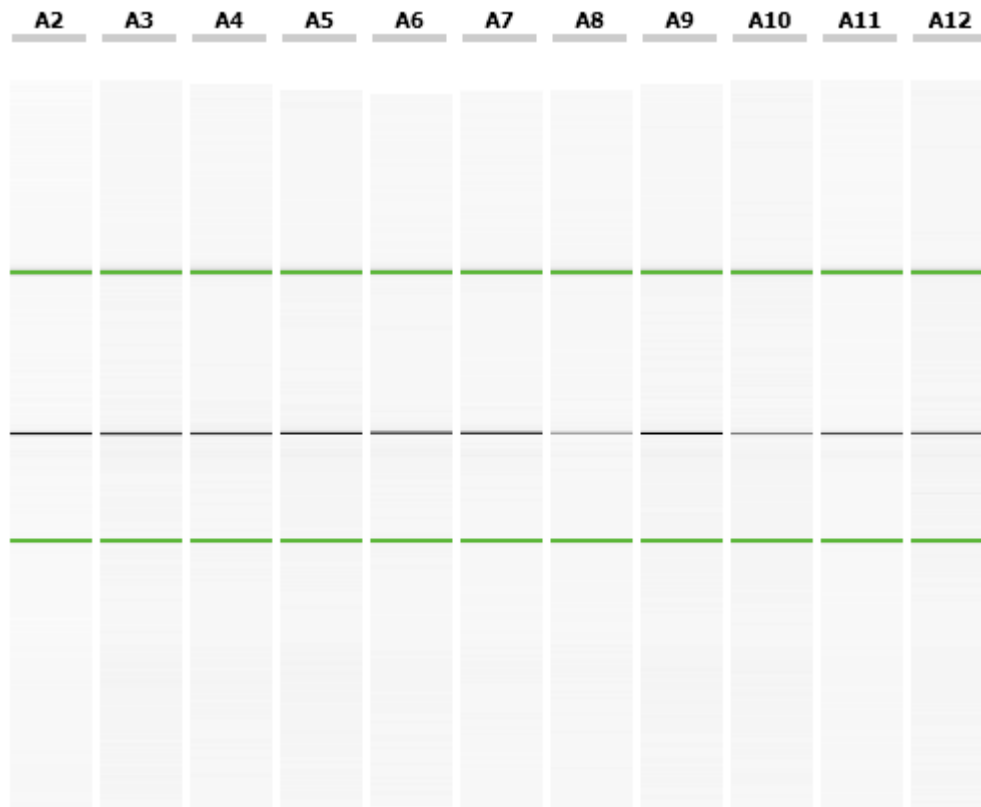
Na uwagę zasługują także markery dające specyficzne produkty amplifikacji charakterystyczne dla markerów sprzężonych z genami odporności *Pm2*, *Pm4a*, *Pm16*, *Pm17*, *Pm34* i *Pm43*, ale były one stwierdzane zarówno u genotypów tolerancyjnych, jak i wrażliwych na porażenie przez mączniaka prawdziwego. 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.

Poszukiwanie markerów sprzężonych z genami odporności na rdzę brunatną

Do analizy, której wyniki przedstawione zostały poniżej, wykorzystane zostało DNA genotypów wykazujących najwyższą odporność w testach laboratoryjnych oraz genotypy o najniższej odporności na porażenie rdzą brunatną. Najwyższą odpornością charakteryzowały się genotypy: CHD Ma213, CHD Ma234, CHD Ma235, WS 12/14, WS 15/12, NS 16/12, NS 17/12, NS 19/12, NS 20/12, NS 80/12, WS 13/13. Na podstawie otrzymanych wyników, po dopracowaniu warunków, ustalone zostały składy mieszanin reakcyjnych i profile termiczne dla poszczególnych par starterów. 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).

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, nadal 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. W wyniku reakcji amplifikacji uzyskiwano markery o pożądanej wielkości u form o najwyższej odporności na porażanie w warunkach laboratoryjnych. Nie obserwowano występowania markera u form podatnych na porażenie rdzą brunatną.



Fot. 4 Rozdział elektroforetyczny produktów amplifikacji z zastosowaniem starterów właściwych dla markera TC72745 dla genotypów żyta ozimego o najmniejszej podatności na porażenie mączniakiem prawdziwym A2 – A12 (kolejno: CHD Ma213, CHD Ma234, CHD Ma235, WS 12/14, WS 15/12, NS 16/12, NS 17/12, NS 19/12, NS 20/12, NS 80/12, WS 13/13)

Powinien on jednak zostać sprawdzony na większej liczbie genotypów odpornych w celu weryfikacji jego stabilności.

7. Najważniejsze osiągnięcia.

- Wśród badanych rodów hodowlanych żyta nie stwierdzono występowania form całkowicie odpornych na mącznika prawdziwego (*Blumeria graminis*), jednak na uwagę jako źródła odporności mogą zostać wykorzystane rody DC 28, DC 1123, DC 1140, HRSM 50 i HRSM 58, które wykazały istotnie wyższą odporność od odmian wzorcowych i nie będą obniżały plonu ani wartości innych cech użytkowych.
- Wśród grupy testowanych genotypów przesłanych do badań przez hodowców znaleziono obiekty, które wykazywały wysoką odporność na mączniaka prawdziwego. Było dziewięć takich genotypów: CHD Ma 222, CHD Ma 223, CHD Ma 224, CHD Ma 227, CHD Ma 233, CHD Ma 239, CHD Ma 240, SOA Mącz 117 oraz SOA Mącz 146, które mogą stanowić dobry materiał wyjściowy do wyprowadzania odmian odpornych na tego patogena.
- Cenny materiał wyjściowy do programów hodowli odpornościowej żyta ozimego na mączniaka prawdziwego (*Blumeria graminis* f. sp. *secalis*) mogą stanowić linie UP1/2, UP2/1, UP3/2, UP8/2, UP10/2, UP 15/1, UP15/2, UP24, UP25, UP36, UP132, UP153 i UP212, które charakteryzowały się pełną polową odpornością na porażenie przez tego patogena.
- Udało się znaleźć dwa obiekty bez śladów zarodników rdzy brunatnej na liściach (NS 16/12, NS 17/12), które można uznać za odporne lub wysoce tolerancyjne na tego patogena i polecić do programów hodowli odpornościowej.
- Wśród badanych genotypów żyta ozimego nie stwierdzono występowania form o całkowitej polowej odporności na rdzę brunatną.
- Otrzymano kilka nowych genotypów żyta o poprawionej odporności, które mogą stanowić materiał wyjściowy do wyprowadzania linii i populacji odpornych na mączniaka prawdziwego i rdzę brunatną.
- Potwierdzono przydatność jednego z testowanych markerów do poszukiwania genów odporności Pm4 na mączniaka prawdziwego u żyta ozimego. Występowanie markera ResPm4 w grupie form żyta najmniej podatnych na porażenie mączniakiem prawdziwym, wskazuje na jego sprzężenie z cechą odporności.
- 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.
- Użyte startery mikrosatelitarne SSR pozwoliły na wykazanie obecności genów odporności na rdzę brunatną u niektórych z analizowanych genotypów żyta ozimego. Markery te będą mogły być użyte do weryfikacji tych genów w materiałach hodowlanych żyta ozimego, ale wymagają sprawdzenia na większej liczbie genotypów odpornych.

Podsumowanie cyklu badań w latach 2008-2013

- Wśród przebadanych genotypów żyta nie znaleziono form całkowicie odpornych na mączniaka prawdziwego (*Blumeria graminis*) i rdzę brunatną (*Puccinia recondita*), ale wykazano przydatność niektórych z nich do hodowli odmian o podwyższonej odporności na patogeny.

- Analiza występowania markerów molekularnych wykazała obecność oczekiwanych produktów amplifikacji dla markerów sprzężonych z genami odporności na mączniaka prawdziwego *Pm2*, *Pm3a*, *Pm3f*, *Pm4*, *Pm4a*, *Pm16*, *Pm17*, *Pm34*, *Pm43*.
- Spośród przebadanych 16 markerów sprzężonych z genami odporności na mączniaka prawdziwego, wykazano przydatność jednego z nich do poszukiwania genów odporności *Pm4* na mączniaka prawdziwego. Marker ResPm4 występował jedynie w grupie linii żyta najmniej podatnych na porażenie mączniakiem prawdziwym, co wskazuje na jego sprzężenie z cechą odporności i czyni go przydatnym w programach hodowlanych żyta do selekcji genotypów odpornych.
- Opracowano szybki, laboratoryjny test do badania odporności genotypów żyta na rdzę brunatną.
- W grupie starterów związanych z genami odporności na rdzę brunatną wykazano przydatność startera TC72745 dającego marker sprzężony z genem odporności. W wyniku reakcji amplifikacji uzyskiwano produkty o pożądanej wielkości u form o najwyższej odporności na porażenie w warunkach laboratoryjnych, a nie obserwowano występowania markera u form podatnych na porażenie rdzą brunatną.
- Wyniki reakcji PCR z zastosowaniem starterów Lr1, Lr9, Lr24, Lr47, nadal nie dają jednoznacznych wyników, ponieważ amplifikacja produktu następuje zarówno u form podatnych, jak i odpornych na porażenie rdzą.
- Użyte startery mikrosatelitarne SSR pozwoliły na wykazanie obecności genów odporności na rdzę brunatną u niektórych z analizowanych genotypów żyta ozimego. Markery te będą mogły być użyte do weryfikacji genów odporności w materiałach hodowlanych żyta ozimego, ale wymagają sprawdzenia na większej liczbie genotypów odpornych.

8. Forma upowszechnienia wyników

Wyniki realizowanego projektu badawczego są dostępne na 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 będące wynikiem realizacji tematu:

1. Bujak H., Jurkowski A. 2013. Estimation of winter rye *Secale cereale* L. susceptibility to infection by the powdery mildew *Blumeria graminis* f. sp. *secalis*. *Acta Agrobotanica* 66 (3): 49 - 54
2. Bujak H., Jurkowski A., Nowosad K. 2013. Poszukiwanie markerów sprzężonych z genami odporności na mączniaka prawdziwego u żyta. *Nauka dla Hodowli i Nasiennictwa Roślin Uprawnych*, Zakopane: 124-125
3. Bujak H., Nowosad K. 2013. Poszukiwanie genów odporności na rdzę brunatną (*Puccinia recondita*) w materiałach hodowlanych żyta. *Materiały Ogólnopolskiej Konferencji Naukowej „Agrotechniczne aspekty produkcji zbóż i roślin strączkowych w siewach czystych i mieszanych”*, Uniwersytet Przyrodniczy w Poznaniu: 11-12.

4. Bujak H., Jurkowski A., Nowosad K. 2013. The search for markers connected with genes of resistance to powdery mildew in rye. International Plant Breeding Congress, Antalya, Turkey. Abstract Book: 301
 10. Wykaz prac złożonych do druku.
Jurkowski A., Bujak H., Nowosad K. 2013. Analysis of marker presence STS638, Xgwm356, ResPm4 in rye (*Secale cereale* L.). Journal of Applied Genetics (praca wysłana do redakcji)
 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, sympozjach, 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 dwóch konferencjach naukowych: Wyniki badań prezentowano na trzech konferencjach naukowych:
1. Konferencja Naukowa „Nauka dla Hodowli i Nasiennictwa Roślin Uprawnych”, Zakopane 4-8.02.2013 r.
Na konferencji przedstawiono pracę pt. „Poszukiwanie markerów sprzężonych z genami odporności na mączniaka prawdziwego u żyta” w formie posteru. Udział w konferencji dał możliwość przedyskutowania uzyskanych wyników z bezpośrednimi ich odbiorcami, czyli hodowcami.
 2. International Plant Breeding Congress, Antalya 10-14.11.2013, Turkey (wyjazd został sfinansowany z innych źródeł).
Na kongresie przedstawiono pracę pt. „ The search for markers connected with genes of resistance to powdery mildew in rye” w formie posteru. Uczestnictwo w kongresie dało możliwość zapoznania się z programami hodowlanymi oraz badaniami prowadzonymi na rzecz hodowli roślin w innych krajach. Przyczyniło się to do poniesienia wartości merytorycznej prowadzonego projektu badawczego oraz pozwoli na uzyskanie dostępu do materiałów zgromadzonych w bankach genów innych krajów, a zwłaszcza WIR-u, który posiada bogatą kolekcję genotypów żyta ozimego.
 3. Konferencja Naukowa „Agrotechniczne aspekty produkcji zbóż i roślin strączkowych w siewach czystych i mieszanych”, Uniwersytet Przyrodniczy w Poznaniu, Zielonki 21-22.11.2013 r.

Na konferencji przedstawiono wyniki badań w formie referatu zatytułowanego „Poszukiwanie genów odporności na rdzę brunatną (*Puccinia recondita*) w materiałach hodowlanych żyta”. Udział w konferencji dał możliwość przedyskutowania uzyskanych wyników z bezpośrednimi ich odbiorcami, czyli hodowcami.

dr hab. prof. nadzw. Henryk Bujak

Wrocław, 8.01.2014 r.

Data

Podpis kierownika tematu