

Instytut Hodowli i Aklimatyzacji Roślin

Państwowy Instytut Badawczy

**mgr inż. Piotr Słowacki**

Autoreferat rozprawy doktorskiej pt.:

**Identyfikacja genów odporności na rdzę karłową (*Puccinia hordei* Otth.) w odmianach miejscowych jęczmienia jarego (*Hordeum vulgare* L.)**

Identification of leaf rust (*Puccinia hordei* Otth.) resistance genes in barley (*Hordeum vulgare* L.) landraces

Promotor:

dr hab. Paweł Czembor, prof. Instytutu  
Zakład Biologii Stosowanej IHAR-PIB

Recenzenci:

Prof. dr hab. Krzysztof Kowalczyk  
Uniwersytet Przyrodniczy w Lublinie  
Wydział Agrobioinżynierii  
Instytut Genetyki, Hodowli i Biotechnologii Roślin

Prof. dr hab. Piotr Masojć  
Zachodniopomorski Uniwersytet Technologiczny  
Wydział Kształtowania Środowiska i Rolnictwa  
Katedra Genetyki, Hodowli i Biotechnologii Roślin

Radzików 2022

## Wstęp i cel pracy

Jęczmień uprawny (*Hordeum vulgare* L.) jest jednym z najważniejszych zbóż uprawianych w Polsce jak i na świecie. Wysoki oraz jakościowo dobry plon zagrożony jest przez różnego rodzaju patogeny, w tym grzybowe. Rdza karłowa jęczmienia powodowana przez grzyba *Puccinia hordei* Otth. może spowodować znaczne straty plonu w sprzyjających warunkach pogodowych (Singh i in. 2019). Stosowanie ochrony chemicznej jest coraz mniej opłacalne, a ich stosowanie może mieć negatywny wpływ na środowisko naturalne. Alternatywą stosowania środków chemicznych jest uprawa odmian jęczmienia posiadających odporność na wybrane patogeny. Populacja patogenów ciągle się zmienia, odporność odmian stosowanych obecnie może zostać przełamana przez nowe patotypy. Należy więc poszukiwać nowych źródeł odporności, które będzie można wprowadzić do materiałów hodowlanych.

Celem niniejszej pracy jest:

- identyfikacja genów odporności na *P. hordei* w liniach Ph873-2 oraz Ph4974-4 wprowadzonych z odmian miejscowych,
- określenie sposobu dziedziczenia odporności na *P. hordei* w badanych liniach jęczmienia,
- określenie alleliczności genów odporności linii Ph873-2 oraz Ph4974-4 w stosunku do genów odporności na *P. hordei* opisanych w literaturze,
- zlokalizowanie genów odporności linii Ph873-2 oraz Ph4974-4 na mapie genetycznej jęczmienia.

## Materiały i metody

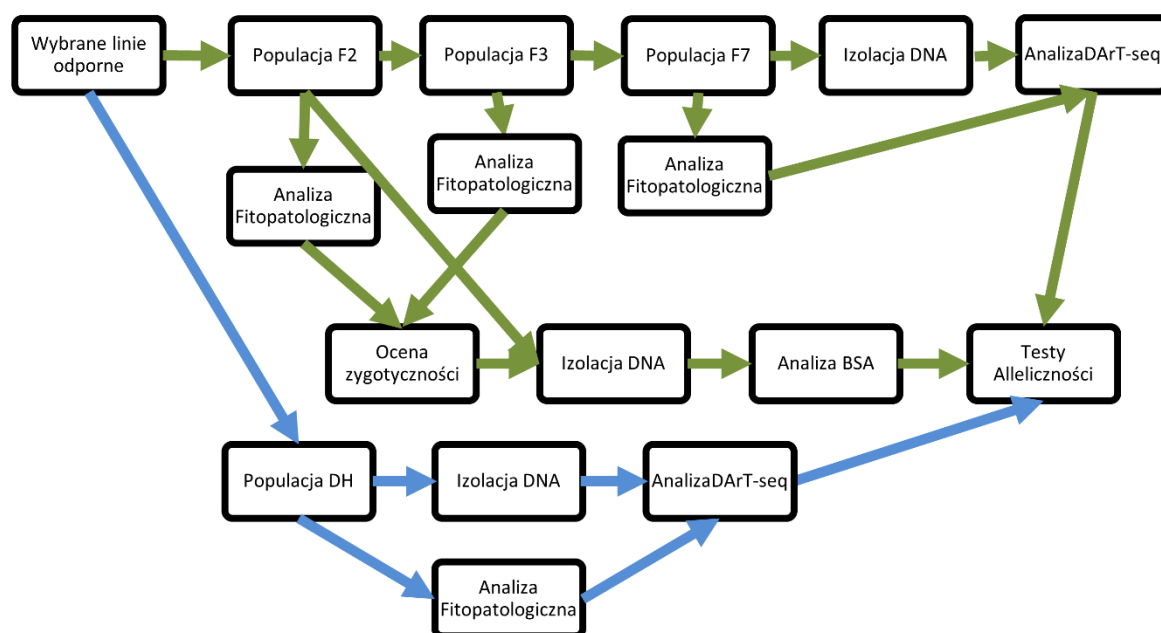
Materiał roślinny i izolaty *P. hordei*:

- dwie linie jęczmienia jarego (*H. vulgare* ssp. *vulgare* L.) Ph873-2 oraz Ph4974-4 wyselekcjonowane z odmian miejscowych pochodzących odpowiednio z Tunezji oraz Włoch (Sardynia);
- zestaw różnicujący składający się z 28 linii jęczmienia zawierających znane geny odporności: *Rph1*, *Rph2*, *Rph3*, *Rph4*, *Rph5*, *Rph6*, *Rph7*, *Rph8*, *Rph9*, *Rph10*, *Rph11*, *Rph12*, *Rph13*, *Rph14*, *Rph15*, *Rph16*, *Rph17*, *Rph18*, *Rph19*, *Rph21*, *Rph27*;
- populacje mieszańcowe: Ph873-2 × L94 - pokolenie F<sub>2</sub> (195 roślin), F<sub>3</sub> (192 rodziny) i F<sub>7</sub> (189 linii) oraz populację Ph4974-4 × L94 - podwojone haploidy (109 linii);
- zestaw 22 izolatów *P. hordei* do określenia typów infekcji badanego materiału roślinnego, z czego 16 pochodziło z kolekcji własnej, zgromadzonej w Zakładzie Biologii Stosowanej, IHAR-PIB, a sześć z Uniwersytetu Minnesoty w Stanach Zjednoczonych Ameryki Północnej (Brain Steffenson, Department of Plant Pathology, Cereal Disease Laboratory).

Metody badawcze:

- sposób dziedziczenia cechy odporności linii Ph873-2 określono poprzez stosunek rozszczeń roślin podatnych i odpornych w pokoleniu F<sub>2</sub> oraz rodzin niesegregujących podatnych i odpornych oraz rodzin segregujących w pokoleniu F<sub>3</sub> populacji Ph873-2 × L94. Dla linii Ph4974-4 oceniono stosunek rozszczeń roślin podatnych i odpornych linii DH populacji Ph4974-4 × L94;
- izolację DNA wykonano według zmodyfikowanej procedury CTAB;
- analiza BSA pokolenia F<sub>2</sub> populacji mapującej Ph873-2 × L94 w celu wstępnego ustalenia pozycji genu odporności linii Ph873-2 w genomie jęczmienia;
- analizę DArT-seq populacji mapującej Ph873-2 × L94 przeprowadzono dla 22 roślin homozygotycznie odpornych oraz 22 roślin homozygotycznie podatnych pokolenia F<sub>7</sub>. W populacji mapującej Ph4974-4 × L94 analizę tą wykonano dla 45 roślin homozygotycznie odpornych oraz 46 roślin homozygotycznie podatnych linii DH;
- wyselekcjonowane markery zostały użyte do testu Kruskala–Wallisa (p=0,05) badającego zgodność rozkładu wariantów markerów DArT-seq z odpornością badanych linii w programie MapQTL 6;
- mapy sprzężeń genetycznych zostały przygotowane z użyciem programu JoinMap 4.0. Wygenerowane mapy zobrazowano oraz porównano do map otrzymanych z Diversity Arrays Technology Pty. Ltd przy pomocy programu MapChart 2.32;
- analiza bioinformatyczna – sekwencje markerów powiązanych z badanymi genami odporności użyto do przeszukania genomu referencyjnego jęczmienia zdeponowanego w bazie danych Ensembl Plants (2020) w celu ustalenia ich lokalizacji w genomie jęczmienia, a także określenia genów w obrębie których znajduje się dany marker. Funkcję białek kodowanych przez te geny ustalono przy użyciu bazy danych UniProt (2021) oraz InterPro (2021);
- test alleliczności - populacje mieszańcowe pokolenia F<sub>2</sub> po krzyżowaniu linii Ph873-2 z liniami Sudan (*Rph1*), PI584760 (*Rph14*), Bowman + *Rph15* (*Rph15*), Hs680-1 (*Rph16*) i 81882/BS1 (*Rph17*), oraz linii Ph4974-4 z odmianą Gold (*Rph4*).

Kolejne etapy podjętych badań w ramach rozprawy doktorskiej obrazuje rycina 1.



Rycina 1. Schemat analiz linii Ph873-2 (zielone strzałki) oraz Ph4974-4 (niebieskie strzałki) odpornych na rdzę karłową.

## Wyniki i dyskusja

Ciągłe poszukiwanie nowych genów odporności jęczmienia jest odpowiedzią na nieustanny wyścig zbrojeń pomiędzy rośliną i patogenami. Nowe patotypy organizmów chorobotwórczych z czasem przełamują dotychczas efektywną odporność warunkowaną aktualnie stosowanymi genami odporności (Park i in. 2015). Odmiany miejscowe razem z gatunkami blisko spokrewnionymi (np. *H. spontaneum*) stanowią cenne źródło nowych genów odporności. Przykładem jest gen *Rph21*, który został zidentyfikowany w odmianie miejscowej pochodzącej z Urugwaju (Sandhu i in. 2012). W ostatnich latach badanie odmian miejscowych pozwoliło na identyfikację nowych genów odporności na takie choroby jak mączniak prawdziwy (*Blumeria graminis* f. sp. *hordei*) (Piechota i in. 2019; Piechota i in. 2020; Abdullaev i in. 2021), rynchosporioza (*Rhynchosporium commune*) (Looseley i in. 2020), zgorzel siewek (*Cochliobolus sativus*) (Visioni i in. 2020), fuzarioza (*Fusarium pseudograminearum*) (Gao i in. 2019), rdza żółta jęczmienia (*Puccinia striiformis* f.sp. *hordei*) (Visioni i in. 2018), ale także genów warunkujących poprawienie parametrów jakościowych jak i wartości browarnej jęczmienia (Goddard i in. 2019).

Również Instytucie Hodowli i Aklimatyzacji Roślin – Państwowym Instytucie Badawczym w Radzikowie w ostatnich kilkunastu latach prowadzono intensywne badania nad odmianami miejscowymi jęczmienia. Badania te umożliwiły selekcję obiektów zawierających potencjalnie użyteczne geny odporności na choroby, w tym rdzę karłową powodowaną przez *P. hordei*. Spośród ocenianych roślin odmian miejscowych, wybrano rośliny wykazujące wysoką odporność na *P. hordei*, a następnie utworzono z nich czyste linie.

Obie linie wykazywały profil odporności (na zestaw izolatów *P. hordei*) inny niż genotypy niosące dotychczas scharakteryzowane geny odporności, co oznacza, że linie te mogą stanowić źródła nowych genów odporności. Linia Ph873-2 wykazywała odporność na większość testowanych izolatów, co sugeruje przydatność genu odporności tej linii w hodowli.

Profil odporności warunkowanej genem *Rph873-2* jest bardzo zbliżony do profili odporności warunkowanej genami *Rph7*, *Rph15* oraz *Rph18*.

Linia jęczmienia Ph873-2 wykazywała odporność na 15 spośród 16 izolatów testowanych w Polsce oraz odporność na cztery z sześciu izolatów testowanych w USA. Linia jęczmienia Ph4974-4 wykazała odporność na siedem spośród 16 izolatów testowanych w Polsce oraz na dwa z sześciu izolatów testowanych w Stanach Zjednoczonych Ameryki Północnej.

Klasyczna analiza genetyczna odporności badanych linii na *P. hordei* wykazała, że odporność niesiona przez linie Ph873-2 oraz Ph4974-4 warunkowana jest pojedynczym genem dominującym. Niemniej jednak, stosunek rozszczepień odporności w pokoleniu F<sub>2</sub> populacji mapującej Ph873-2 × L94 odbiegał od teoretycznego stosunku rozszczepień dla pojedynczego genu dominującego. Przyczyną tego może być nierównomierne rozprzaskanie zarodników rdzy podczas zakażenia, błąd podczas oceny fenotypowej, a co za tym idzie zła klasyfikacja ocenianych obiektów, lub zamieszanie w próbkach ziarna. Problemy z klasyfikacją badanych obiektów, a co za tym idzie rozbieżnością teoretycznych stosunków rozszczepień w stosunku do zaobserwowanych opisał Pathan z zespołem (2007), czy też Elmansour w swojej rozprawie doktorskiej (2016).

Analiza BSA (ang. Bulk Segregant Analysis, łączna analiza segregantów) pozwoliła na ograniczenie nakładu pracy i analizę większej liczby markerów w stosunku do konwencjonalnych analiz całych populacji. Metoda BSA jest stosowana w ramach analiz przesiewowych dużej liczby markerów w celu identyfikacji regionu genomu, np. przy identyfikacji genów odporności (Qin i in. 2015; Aoun i in. 2017). W przedstawionej pracy BSA pozwoliła na wstępną identyfikację krótkiego ramienia chromosomu 2H jako zawierającego gen odporności linii Ph873-2. Umożliwiło to wybór odmian ze znanymi genami odporności zlokalizowanymi na tym samym chromosomie i jego ramieniu, celem przeprowadzenia testów alleliczności.

Analiza DArT-seq pozwoliła na dokładniejsze przypisanie genów do lokalizacji w genomie. Markery DArT-seq są szeroko stosowanym narzędziem analiz molekularnych. Wykorzystuje się je między innymi do mapowania genów odporności (Singh i in. 2017; Dracatos i in. 2019a, Dracatos i in. 2019b; Dyda i in. 2022), analiz GWAS (Rakoczy-Trojanowska i in. 2017), czy badania zróżnicowania populacji (Robbana i in. 2019).

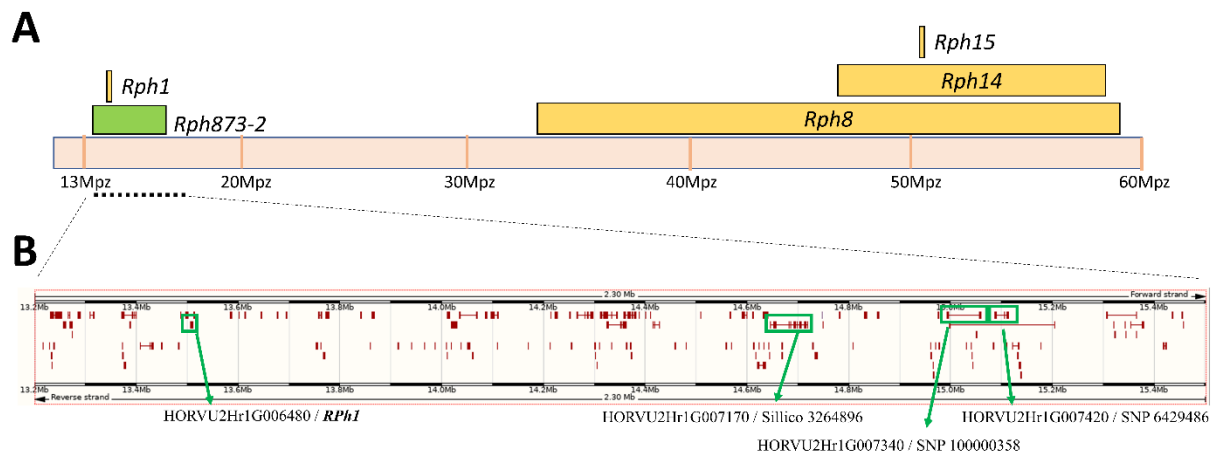
Duża liczba markerów DArT-seq pozwoliła na utworzenie map genetycznych o wysokiej rozdzielczości, oraz precyzyjne umiejscowienie badanych genów odporności linii Ph873-2 oraz Ph4974-4 na chromosomach jęczmienia. Średnia odległość między markerami map uzyskanych dla chromosomu 2H linii Ph873-2 wyniosła 1,9 cM (SNP) i 0,92 cM (Silico), a chromosomu 1H linii Ph4974-4 wyniosła 0,57 cM (SNP) i 0,42 cM (Silico). Mapy o podobnym zagęszczeniu markerów były wykorzystywane do mapowania genów w jęczmieniu czy pszenżycie (Dracatos i in. 2019b; Dyda i in. 2022).

Analiza DArT-seq jest skutecznie wykorzystywana do lokalizacji genu w genomie jęczmienia nawet przy małej liczbie testowanych osobników. Gen *Rph25* został zmapowany z wykorzystaniem analizy DArT-seq przy użyciu 31 roślin (Kavanagh i in. 2017), natomiast gen *Rph1* z wykorzystaniem 61 linii DH (Dracatos i in. 2019a). Podobną skuteczność takiego podejścia wykazano w prezentowanej pracy, gdzie stosunkowo mała liczba osobników użytych do analiz DArT-seq (44 dla linii Ph873-2 oraz 91 dla Ph4974-4) była wystarczająca dla wstępnego określenia lokalizacji genów odporności.

Dzięki analizie DArT-seq uzyskano 4258 markerów SNP oraz 9799 Silico dla populacji Ph873-2 × L94. Uzyskane markery zostały użyte do testu Kruskala-Wallisa, który wykazał, że markery leżące na 2HS były w największym stopniu sprzężone z cechą odporności zarówno dla markerów SNP DArT jak i Silico.

Utworzono dwie częściowe mapy chromosomu 2H jęczmienia zawierająca gen odporności linii Ph873-2, oznaczony jako *Rph873-2*. Pierwszą z wykorzystaniem 201 markerów DArT SNP, drugą z wykorzystaniem 277 markerów DArT Silico o długościach odpowiednio 382cM i 254cM. Otrzymane mapy porównano do map referencyjnych otrzymanych od Diversity Arrays Technology.

Na krótkim ramieniu chromosomu 2H zlokalizowane są znane geny *Rph14*, *Rph15*, *Rph16*, *Rph17* oraz *Rph1*, którego lokalizacja została zawężona do krótkiego ramienia przez Martina (2018). W tej samej pracy Martin także określił położenie genu odporności *Rph8*, którego lokalizacja przez długi czas pozostawała nieznana na chromosomie 2HS. Niestety, harmonogram pracy doktorskiej nie pozwolił na wykonanie krzyżowania linii Ph873-2 z odmianą Egypt 4 niosącą gen *Rph8*, już po dokładnym opisaniu jego położenia na 2HS w roku 2018 (Martin 2018). Mimo braku wykonanych testów alleliczności z odmianą Egypt (*Rph8*), to jego fizyczna lokalizacja względem prawdopodobnego locus *Rph873-2* (Ryc. 2) oraz odmienny profil typów infekcji pozwalają wnioskować o ich odrębności.



Rycina 2. A) Schemat fizycznej mapy fragmentu chromosomu 2H z przypuszczalną lokalizacją genu *Rph873-2* (zielony prostokąt - rozmiar lokalizacji jest wyznaczony przez markery z najwyższym prawdopodobieństwem sprzężenia z genem) i genów znajdujących się w pobliżu *Rph1*, *Rph8*, *Rph14* i *Rph15* (rozmiar przypuszczalnej lokalizacji na podstawie danych literaturowych: Dracatos i in. 2019a; Martin i in. 2020; Chen i in. 2021). B) Szczegółowa mapa fizyczna locus *Rph873-2* z lokalizacją opisanych genów (czerwone prostokąty), w tym genu *Rph1* oraz trzech genów (oznaczonych przez markery SNP oraz Silico sprzężone z *Rph873-2*) o przewidywanej funkcji związanej z odpornością na patogeny (Ensembl Plants, 2020).

Lokalizację genu *Rph873-2* oraz blisko położonych genów odporności przedstawia rycina 2. Markery DArT-seq sprzężone z cechą odporności na *P. hordei* linii Ph873-2 położone są na fragmencie 2H:13139860-15352802 pz. Spośród markerów sprzężonych z genem trzy umiejscowione są w obrębie genów, które mogą pełnić funkcję związaną z odpornością na patogeny. Marker Silico 3264896 został zlokalizowany w obrębie genu HORVU2Hr1G007170. Produkt białkowy tego genu zawiera domeny zwiniętej cewki, wiążącą nukleotydy oraz bogatą w powtórzenia leucynowe (ang. coiled coil-NBS-LRR). Markery SNP 100000358 oraz 6429486 zlokalizowano odpowiednio w obrębie genów HORVU2Hr1G007340 oraz

HORVU2Hr1G007420. Produkty białkowe obu genów zawierają domeny kinaz białkowych i pełnią funkcję w szlaku sygnałowym receptorów białek powierzchniowych.

W obrębie fragmentu chromosomu 2HS flankowanego markerami DArT-seq sprzężonymi z genem *Rph873-2* zlokalizowany jest gen odporności *Rph1*. Lokalizacja fizyczna genu *Rph1* oraz *Rph873-2* może wskazywać na ich alleliczność, co znalazło swoje potwierdzenie w wykonanych test alleliczności. Jednakże gen *Rph1* i *Rph873-2* warunkują odporność na inny zakres patotypów *P. hordei*, co oznacza, że nie są tożsame.

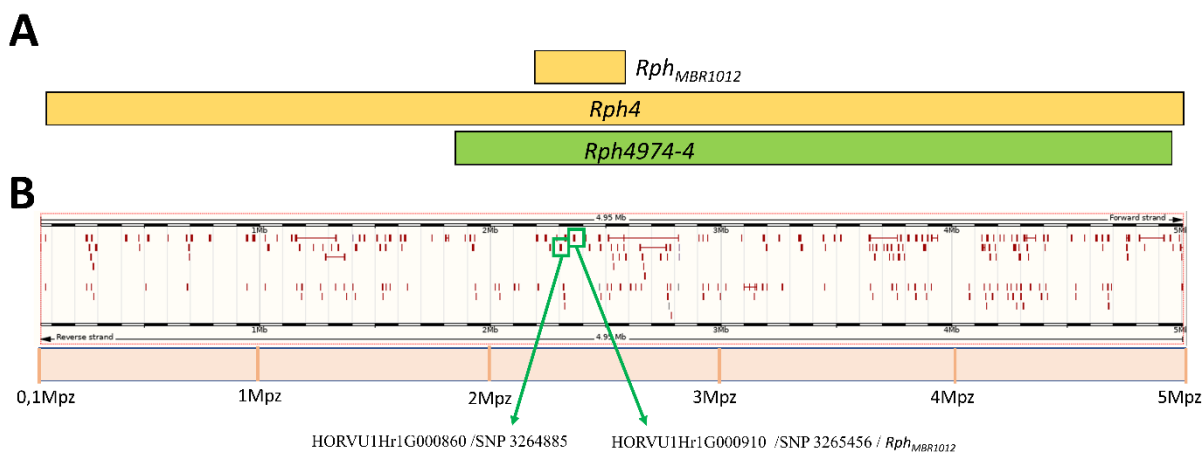
Analiza DArT-seq populacji Ph4974-4 × L94 pozwoliła uzyskać 7025 markerów SNP oraz 16379 markerów Silico. Uzyskane markery zostały użyte do testu Kruskala-Wallisa, który wykazał największe sprzężenie z genem odporności dla analizowanych markerów zlokalizowanych na krótkim ramieniu chromosomu 1H zarówno dla markerów SNP DArT jak i Silico.

Utworzono dwie częściowe mapy chromosomu 1H jęczmienia zawierająca gen odporności linii Ph4974-4, oznaczony jako *Rph4974-4*. Pierwszą utworzono z wykorzystaniem 348 markerów DArT SNP, drugą z wykorzystaniem 713 markerów DArT Silico o długościach odpowiednio 198cM i 301cM. Otrzymane mapy porównano do map referencyjnych otrzymanych od Diversity Arrays Technology.

Przeprowadzone badania pozwoliły na ustalenie lokalizacji genu odporności *Rph4974-4* na chromosomie 1H. Poprzednie badania wskazywały lokację genu odporności linii Ph4974-4 na chromosomie 7H (Czembor 2009). Analizy z wykorzystaniem tysięcy markerów molekularnych pozwalają uzyskać znacznie większą precyzję mapowania. Błędna klasyfikacja położenia genu odporności miała także miejsce w przypadku genu *Rph13* pierwotnie umiejscowionego na chromosomie 5H, który wiele lat później, po dokładniejszych analizach został zmapowany na chromosomie 3H (Jin i in. 1996; Jost i in. 2020).

Lokalizację genu *Rph4974-4* oraz blisko ulokowanych genów odporności przedstawia rycina 3. Markery DArT-seq sprzężone z cechą odporności na *P. hordei* linii Ph4974-4 ulokowane są na fragmencie 1H:1923614-4961058 pz. Spośród sprzężonych z genem markerów dwa umiejscowione są w obrębie genów, które mogą pełnić funkcję związaną z odpornością na patogeny. Markery Silico 3265456 oraz 3264885 umiejscowione są odpowiednio w obrębie genów HORVU1Hr1G000910 oraz HORVU1Hr1G000860. Produkty białkowe obu genów zawierają domenę wiążącą nukleotydy oraz domenę bogatą w powtórzenia leucynowe (NBS-LRR). Interesujący jest fakt, że gen HORVU1Hr1G000910 jest jednym z genów odporności na choroby wytypowanym jako gen kandydujący podczas analiz genu *Rph<sub>MBR1012</sub>* (Fazlikhani i in. 2019).

Fragment chromosomu 1H zawierający markery najbardziej sprzężone z genem *Rph4974-4* pokrywa się częściowo z lokalizacją genu *Rph4* oraz zawiera w całości lokalizację *Rph<sub>MBR1012</sub>* (Fazlikhani i in. 2019). Test alleliczności genu *Rph4974-4* i genu *Rph4* wykazał, że gen *Rph4974-4* może być allelem *Rph4* lub genem blisko z nim sprzężonym. Profil odporności na zakażenie izolatami *P. hordei* jest różny dla linii niosących obu tych genów, co wskazuje na ich odrębność, ale nie można tego stwierdzić w stosunku do genu *Rph<sub>MBR1012</sub>*. Niestety linia MBR1012 niosąca gen *Rph<sub>MBR1012</sub>* nie była dostępna w żadnym z banków genów w momencie wykonywania badań, w związku z tym nie zbadano alleliczności genu *Rph4974-4* względem genu *Rph<sub>MBR1012</sub>*.



Rycina 3. A) Schemat fizycznej mapy fragmentu chromosomu 1H z przypuszczalną lokalizacją genu *Rph4974-4* (zielony prostokąt - rozmiar lokalizacji jest wyznaczony przez markery z najwyższym prawdopodobieństwem sprzężenia z genem) i genów znajdujących się w pobliżu: *Rph4* i *Rph<sub>MBR1012</sub>* (rozmiar przypuszczalnej lokalizacji na podstawie danych literaturowych: Fazlikhani i in. 2019; Martin i in. 2020). B) Szczegółowa mapa fizyczna *locus Rph4974-4* z lokalizacją opisanych genów (czerwone prostokąty), w tym dwóch genów (oznaczonych przez markery Silico sprzężone z *Rph4974-4*) o przewidywanej funkcji związanej z odpornością na patogeny (Ensembl Plants, 2020).

Zidentyfikowane markery DArT-seq sprzężone z genami odporności linii Ph873-2 oraz Ph4974-4 umiejscowione są w obrębie genów, których produkty białkowe biorą udział w odpowiedzi odpornościowej rośliny na patogeny, zawierają domeny powtórzeń leucynowych bądź domeny kinaz białkowych. W związku z tym można wysunąć przypuszczenie, że zidentyfikowane geny *Rph873-2* i *Rph4974-4* również należą do rodziny genów typu NBS-LRR. Tym bardziej, że charakteryzują się reakcją typową infekcji typową dla genów zawierających domenę NBS-LRR kodującą białka umożliwiające wykrywanie efektorów patogenów, która często wiąże się z wywołaniem silnej reakcji nadwrażliwości powodującej programowaną śmierć zainfekowanej komórki (Marcel i in. 2007). U roślin okrytonasiennych, ponad 80% sklonowanych genów odporności to geny kodujące białka klasy NBS-LRR (Shao i in. 2016). Wiele znanych genów NBS-LRR warunkuje odporność na wiele rodzajów patogenów od grzybów, owadów, bakterii i wirusów po niczenie (Van der Biezen i Jones 1998).

Podsumowując, w toku przeprowadzonych badań zidentyfikowano nowy gen odporności *Rph873-2* oraz prawdopodobnie nowy gen *Rph4974-4*, nieopisane wcześniej geny odporności jęczmienia na *P. hordei*. Badania wskazują na odrębność genów *Rph4974-4* i *Rph4*, ale nie można tego stwierdzić w stosunku do genu *Rph<sub>MBR1012</sub>*. Profil odporności warunkowanej *Rph873-2* i *Rph4974-4* różni się od profili odporności reprezentowanych przez zastosowany zestaw odmian i linii różnicujących, co czyni je wartościowym źródłem dla hodowli odpornościowej. Zidentyfikowane markery DArT-seq sprzężone z genami odporności mogą być podstawą do zaprojektowania markerów molekularnych do celów selekcji wspomaganą markerami. Planowana jest dalsza analiza sekwencji regionów chromosomu 1HS i 2HS zawierających odpowiednio, gen *Rph4974-4* i *Rph873-2* w ramach zadania finansowanego z Dotacji Celowej przez MRiRW (lata 2021-2025). Planuje się zastosowanie strategii molekularnej MutChromSeq, która obejmuje wyprowadzanie mutantów odwróconych (podatnych) z linii odpornych, a następnie izolację i sekwencjonowanie chromosomu zawierającego gen odporności w formie zmutowanej i wyjściowej. Podejście to w sposób precyzyjny pozwoli na identyfikację różnicy sekwencji DNA pomiędzy linią odporną a wyprowadzonym mutantem podatnym zawierającym zmutowany (uszkodzony) gen odporności. W ten sposób będzie można wyjaśnić powiązania między odpornością linii Ph873-2, a genem *Rph1*, oraz między odpornością linii Ph4974-4, a genem *Rph<sub>MBR1012</sub>* i *Rph4*.



## Wnioski

1. Odmiany miejscowe stanowią źródło nowych genów odporności na *P. hordei*.
2. Przeprowadzone analizy pozwoliły na poszerzenie puli genowej jęczmienia dostępnej dla hodowli o nowe geny odporności *Rph873-2* oraz prawdopodobnie *Rph4974-4*, dotąd nieopisane w literaturze.
3. Linia Ph873-2 jest wysoce efektywnym źródłem odporności na rdzę karłową dla polskiej hodowli jęczmienia.
4. Analiza DArT-seq pozwala na stosunkowo dokładne umiejscowienie badanych genów w genomie jęczmienia nawet przy ograniczonej liczbie osobników w populacji mapującej.

## Spis literatury

- Abdullaev R. A., Lebedeva T. V., Alpatieva N. V., Batasheva B. A., Anisimova I. N., Radchenko E. E., 2021. Powdery mildew resistance of barley accessions from Dagestan. *Vavilov Journal of Genetics and Breeding*, 25:528-533
- Aoun M., Kolmer J. A., Rouse M. N., Chao S., Bulbula W. D., Elias E. M., Acevedo M., 2017. Genetics and resistance inheritance and bulked segregant analysis of leaf rust and stem rust resistance in durum wheat genotypes. *Phytopathology*, 107:1496-1506
- Chen C., Clark B., Martin M., Matny O., Steffenson B. J., Franckowiak J. D., Mascher M., Singh D., Perovic D., Richardson T., Periyannan S., Lagudah E. S., Park R. F., Dracatos P. M., 2021. Ancient BED-domain-containing immune receptor from wild barley confers widely effective resistance to leaf rust. *Plant Biotechnology Journal*, 19:1206–1215
- Czembor P. Cz., 2009. Nowe źródła odporności na rdzę karłową jęczmienia (*Puccinia hordei* OTTH.). Rozprawa habilitacyjna. Monografie i rozprawy naukowe IHAR 32.
- Dracatos P. M., Barto J., Elmansour H., Singh D., Karafiátová M., Zhang P., Steuernagel B., Svačina R., Cobbin J. C. A., Clark B., Hoxha S., Khatkar M. S., Doležel J., Wulff B. B., Park R. F., 2019a. The coiled-coil NLR *Rph1*, confers leaf rust resistance in barley cultivar Sudan. *Plant Physiology*, 179:1362–1372
- Dracatos P. M., Haghdoost R., Singh R. P., Huerta Espino J., Barnes C. W., Forrest K., Hayden M., Nix R. E., Park R. F., Singh D., 2019b. High-density mapping of triple rust resistance in barley using DArT-seq markers. *Frontiers in Plant Science*, 10:467 DOI: 10.3389/fpls.2019.00467
- Dyda M., Tyrka M., Gołębiowska G., Rapacz M., Wędzony M., 2022. Genetic mapping of adult-plant resistance genes to powdery mildew in triticale. *Journal of Applied Genetics*, 63(1):73-86
- Elmansour H., 2016. Genetic and molecular characterization of resistance to rust diseases in barley. Rozprawa doktorska. The University of Sydney, Plant Breeding Institute Cobbity, Australia.
- Ensembl Plants - [http://plants.ensembl.org/Hordeum\\_vulgare/Info/Annotation](http://plants.ensembl.org/Hordeum_vulgare/Info/Annotation), dostęp 07.2020 r.
- Fazlikhani L., Keilwagen J., Kopahnke D., Deising H., Ordon F., Perovic D., 2019. High resolution mapping of *Rph<sub>MBR1012</sub>* conferring resistance to *Puccinia hordei* in barley (*Hordeum vulgare* L.). *Frontiers in Plant Science*, 10:640 DOI: <https://doi.org/10.3389/fpls.2019.00640>

- Gao S., Zheng Z., Hu H., Shi H., Ma J., Liu Y., Wei Y., Zheng Y. L., Zhou M., Liu C., 2019. A novel QTL conferring *Fusarium* crown rot resistance located on chromosome arm 6HL in barley. *Frontiers in Plant Science*, 10:1206 DOI: 10.3389/fpls.2019.01206
- Goddard R., de Vos S., Steed A., Muhammed A., Thomas K., Griggs D., Ridout C., Nicholson P., 2019. Mapping of agronomic traits, disease resistance and malting quality in a wide cross of two-row barley cultivars. *PLoS One*, 14:e0219042 DOI: 10.1371/journal.pone.0219042
- InterPro (<https://www.ebi.ac.uk/interpro>), dostę: 05.2020 r.
- Jin Y., Cui G. H., Steffenson B. J., Franckowiak J. D., 1996. New leaf rust resistance genes in barley and their allelic and linkage relationships with other *Rph* genes. *Phytopathology*, 86:887–890
- Jost M., Singh D., Lagudah E., Park R. F., Dracatos P., 2020. Fine mapping of leaf rust resistance gene *Rph13* from wild barley. *Theoretical and Applied Genetics*, 133:1887–1895
- Kavanagh P. J., Singh D., Bansal U. K., Park R. F., 2017. Inheritance and characterization of the new and rare gene *Rph25* conferring seedling resistance in *Hordeum vulgare* against *Puccinia hordei*. *Plant Breeding*, 136:908–912
- Looseley M. E., Griffe L. L., Büttner B., Wright K. M., Bayer M. M., Coulter M., Thauvin J. N., Middlefell-Williams J., Maluk M., Okpo A., Kettles N., Werner P., Byrne E., Avrova A., 2020. Characterisation of barley landraces from Syria and Jordan for resistance to rhynchosporium and identification of diagnostic markers for *Rrs1<sub>Rh4</sub>*. *Theoretical and Applied Genetics*, 133:1243-1264
- Marcel T. C., Gorguet B., Truong T. M., Kohutova Z., Vels A., Niks R. E., 2007. Isolate specificity of quantitative trait loci for partial resistance of barley to *Puccinia hordei* confirmed in mapping populations and near-isogenic lines. *New Phytologist*, 177:743–755
- Martin M. J., Chicaiza O., Caffarel J. C., Sallam A. H., Druka A., Waugh R., Ordon F., Kopahnke D., Keilwagen J., Perovic D., Fetch T. G. Jr., Jin Y., Franckowiak J. D., Steffenson B. J., 2020. Development of barley introgression lines carrying the leaf rust resistance genes *Rph1* to *Rph15*. *Crop Science* 60:282–302
- Martin M., 2018. Development of barley introgression lines carrying the leaf rust resistance genes *Rph1* to *Rph15*. *Rozprawa doktorska*. University of Minnesota, Minneapolis. <https://hdl.handle.net/11299/200125>
- Park R. F., Golegaonkar P. G., Derevnina L., Sandhu K. S., Karaoglu H., Elmansour H. M., Dracatos P. M., Singh D., 2015. Leaf rust of cultivated barley: pathology and control. *Annual Review of Phytopathology*, 53:565-589
- Pathan A. K., Park R. F., Wellings C. R., Bariana H. S., 2007. The expression and genetics of resistance to stripe (yellow) rust in three European and four New Zealand wheat cultivars. *Journal of Applied Genetics*, 48:199–210
- Piechota U., Czembor P. C., Słowacki P., Czembor J. H., 2019. Identifying a novel powdery mildew resistance gene in a barley landrace from Morocco. *Journal of Applied Genetics*, 60:243-254
- Piechota U., Słowacki P., Czembor P. C., 2020. Identification of a novel recessive gene for resistance to powdery mildew (*Blumeria graminis* f. sp. *hordei*) in barley (*Hordeum vulgare*). *Plant Breeding*, 139:730-742

- Qin D., Dong J., Xu F., Guo G., Ge S., Xu Q., Xu Y., Li M., 2015. Characterization and fine mapping of a novel barley stage green-revertible albino gene (HvSGRA) by bulked segregant analysis based on SSR assay and specific length amplified fragment sequencing. *BMC genomics*, 16:838 DOI: <https://doi.org/10.1186/s12864-015-2015-1>
- Rakoczy-Trojanowska M., Krajewski P., Bocianowski J., Schollenberger M., Wakuliński W., Milczarski P., Masojć P., Targońska-Karasek M., Banaszak Z., Banaszak K., Brukwiński W., Orczyk W., Kilian A., 2017. Identification of single nucleotide polymorphisms associated with brown rust resistance,  $\alpha$ -amylase activity and pre-harvest sprouting in rye (*Secale cereale* L.). *Plant Molecular Biology Reports*, 35(3):366-378
- Robbana C., Kehel Z., Ben Naceur M., Sansaloni C., Bassi F., Amri A., 2019. Genome-wide genetic diversity and population structure of Tunisian durum wheat landraces based on DArTseq technology. *International Journal of Molecular Science*, 20(6):1352 DOI: 10.3390/ijms20061352.
- Sandhu K. S., Forrest K. L., Kong S., Bansal U. K., Singh D., Hayden M. J., Park R. F., 2012. Inheritance and molecular mapping of a gene conferring seedling resistance against *Puccinia hordei* in the barley cultivar Ricardo. *Theoretical and Applied Genetics*, 125:1403–1411
- Shao Z., Wang B., Chen J., 2016. Tracking ancestral lineages and recent expansions of NBS-LRR genes in angiosperms. *Plant Signaling & Behavior*, 11:7 DOI: 10.1080/15592324.2016.1197470
- Singh B., Mehta S., Aggarwal S. K., Tiwari M., Bhuyan S. I., Bhatia S., Islam M. A., 2019. Barley, disease resistance, and molecular breeding approaches. W: Wani S. H. (red.) *Disease resistance in crop plants*, str 261–299. Springer Nature, Cham.
- Singh D., Dracatos P. M., Loughman R., Park R. F., 2017. Genetic mapping of resistance to *Puccinia hordei* in three barley doubled-haploid populations. *Euphytica*, 213:16 DOI: <https://doi.org/10.1007/s10681-016-1799-7>
- UniProt (<https://www.uniprot.org>), dostęp 05.2021 r.
- Van der Biezen E. A., Jones J. D., 1998. Plant disease-resistance proteins and the gene-for-gene concept. *Trends in Biochemical Science*, 23:454-456
- Visioni A., Gyawali S., Selvakumar R., Gangwar O. P., Shekhawat P. S., Bhardwaj S. C., Al-Abdallat A. M., Kehel Z., Verma R. P. S., 2018. Genome wide association mapping of seedling and adult plant resistance to barley stripe rust (*Puccinia striiformis* f. sp. *hordei*) in India. *Frontiers in Plant Science*, 24:9:520 DOI: 10.3389/fpls.2018.00520
- Visioni A., Rehman S., Viash S. S., Singh S. P., Vishwakarma R., Gyawali S., Al-Abdallat A. M., Verma R. P. S., 2020. Genome wide association mapping of spot blotch resistance at seedling and adult plant stages in barley. *Frontiers in Plant Science*, 25:11:642 DOI: 10.3389/fpls.2020.00642