

Lp. w zał. do Rozporządzenia MRiRW: 4.

Tytuł zadania: **Mapowanie asocjacyjne genów odporności na rdzę brunatną (*Puccinia triticina*) i septoriozę paskowaną liści (*Septoria tritici*) w pszenicy.**

Kierownik zadania: **dr hab. P. Czembor prof. IHAR-PIB**

Celem badań było postulowanie genów odporności na septoriozę paskowaną i rdzę brunatną w europejskich odmianach pszenicy w tym w odmianach znajdujących się na liście odmian wpisanych do krajowego rejestru w Polsce. Typowanie genów odporności zostało wsparte wykorzystaniem markerów molekularnych zarówno blisko sprzężonych ze znanymi genami jak i umożliwiających profilowanie całego genomu na potrzeby mapowania asocjacyjnego.

Temat badawczy I: Ocena porażenia odmian/linii pszenicy ozimej przez izolaty *Puccinia triticina*.

Celem tego tematu było określenie reakcji fenotypowej (odporny/podatny) 200 odmian/linii pszenicy ozimej na zakażenie sześcioma izolatami *P. triticina* o zróżnicowanej patogeniczności.

Materiały i metody:

Materiał roślinny. Do badań w stadium siewki wykorzystano zestaw 200 odmian/linii:

- 38 linii bliskoizogenicznych odmiany Thatcher (ang. Thatcher Near Isogenic Lines, TcNILs)
- 83 odmiany pszenicy ozimej z krajowej listy opisowej odmian COBORU (2013)
- 79 odmian pszenicy ozimej zarejestrowanych w innych krajach europejskich

Zestaw TcNILs zawiera znane geny odporności na *P. triticina* (pominięto linie z genami warunkującymi odporność w stadium rośliny dorosłej) i jest obecnie obowiązującym zestawem w badaniach międzynarodowych.

Testy fitopatologiczne. Opisany wyżej zestaw odmian/linii (3-5 ziarniaków danego obiektu) został wysiany do dwóch palet ogrodniczych. W warunkach kontrolowanych komory klimatycznej, siewki w stadium drugiego liścia zakażano pojedynczym izolatem *P. triticina* (100mg uredinospor/100ml wody) i pozostawiono do następnego dnia w warunkach całkowitej ciemności, w temperaturze 22°C i wilgotności 95%. Następnie siewki utrzymywano w warunkach 16 godzin światła/22°C oraz 8 godzin ciemności/18°C. Po 12-dniowej inkubacji, porażone siewki oceniano wg skali 0–4, gdzie typ infekcji 0–2 wskazuje na odporność, a typ infekcji 3–4 wrażliwość. Do inokulacji wykorzystano sześć izolatów *P. triticina* z własnej kolekcji, charakteryzujących się zróżnicowanym spektrum wirulencji (dane niepublikowane): NIAB 06-23, NIAB 06-94, NIAB 06-98, Pt1002, Pt2902 i Pt1602.

Wyniki:

W wyniku inokulacji 83 odmian pszenicy ozimej pochodzącej z krajowej listy odmian COBORU sześcioma izolatami o zróżnicowanej wirulencji zidentyfikowano 6 odmian (Belenus, Elipsa, Kredo, KWS Magic, Pengar, Speedway) odpornych na co najmniej 5 izolatów oraz 9 odmian (Astoria, Bagou, Bystra, Forum, Markiza, Meteor, Mikula, Rapsodia, Satyna) wykazujących odporność na jeden z testowanych izolatów *P. triticina*. Pozostałe polskie odmiany były podatne na wszystkie testowane izolaty. Spośród 79 odmian pszenicy pochodzących z różnych krajów europejskich, 27 wykazało odporność na 4-6 testowanych izolatów *P. triticina*. Natomiast 23 odmiany były odporne na co najmniej jeden spośród sześciu badanych izolatów.

Wszystkie badane izolaty były wirulentne w stosunku do genów *Lr10*, *Lr11*, *Lr14a*, *Lr14b*, *Lr18*, *Lr27+Lr31*, *Lr33*, *Lr36*, *Lr44* oraz awirulentne w stosunku do *Lr9*, *Lr19*, *Lr24* i *Lr52*. Dla pozostałych linii zestawu różnicującego przynajmniej jeden izolat dla danej linii wykazywał odmienną reakcję fenotypową w porównaniu do pozostałych izolatów. Dla kilku kombinacji izolat/obiekt zaobserwowano mieszaną reakcję fenotypową: Pt2902/Eriwan, NIAB06-23/Smuga; Pt1602/Grapeli; NIAB06-94/Mikula, Smuga; Pt1002/Eriwan, Elipsa.

Dyskusja:

Liczba izolatów wykorzystana w niniejszej pracy nie pozwoliła jak dotąd na zróżnicowanie reakcji fenotypowej wszystkich linii zestawu TcNILs. Docelowo zostanie przetestowanych co najmniej 18 izolatów *P. triticina*, co z pewnością wyłoni szersze spektrum wirulencji pozwalające zróżnicować fenotypowo wszystkie, a przynajmniej większość linii bliskoizogenicznych odmiany Thatcher.

Wnioski:

1. Stwierdzono małe zróżnicowanie genetyczne odmian z krajowego rejestru (większość posiada prawdopodobnie kilka mało efektywnych genów odporności).

2. Zaobserwowano większe zróżnicowanie genetyczne odmian zagranicznych i więcej efektywnych genów odporności.
3. Spektrum wirulencji testowanych izolatów pozwoliło na zróżnicowanie reakcji fenotypowej większości linii zestawu TcNILs.

Temat badawczy 2: Testowanie specyficznych markerów PCR dla wybranych genów *Lr*.

Celem tego tematu było określenie występowania markerów molekularnych blisko sprzężonych z wybranymi genami *Lr* w zestawie odmian/linii pszenicy ozimej badanych w temacie badawczym 1.

Materiały i metody:

Z grupy odmian/linii badanych w temacie 1 do analiz molekularnych w ramach tematu 2, wybrano zestaw 188 genotypów pszenicy (w tym linie różnicujące TcNILs). Liczba planowanych obiektów do badań wynikała z narzuconych warunków technicznych analiz: 2 płytki, każda po 96 próbek (w tym 2 próbki kontrolne). Siewki wybranych odmian/linii posłużyły do wyizolowania DNA jedną z dwóch metod: DNeasy Plant Mini Kit (QIAGEN GmbH, 140724 Hilden, Niemcy) lub Nucleo Mag 96 (Macherey-Nagel GmbH & Co. KG, 52355 Düren, Niemcy) wspomaganą zautomatyzowaną stacją roboczą Freedom Evo (Tecan Group Ltd., Seestrasse 103, CH-8708 Männedorf, Szwajcaria).

Wyizolowane DNA zostało wykorzystane do określenia występowania markerów molekularnych blisko sprzężonych z sześcioma genami odporności: *Lr1*, *Lr9*, *Lr10*, *Lr19*, *Lr20* i *Lr21*. Specyficzne markery molekularne amplifikowano w reakcji PCR zgodnie z warunkami podanymi w publikacjach źródłowych z niewielkimi modyfikacjami: całkowita objętość reakcji 10 µl, 60ng DNA, 1U Taq polimerazy (Fermentas GmbH, Niemcy), 1×PCR bufor z domieszką (NH<sub>4</sub>)<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> (Fermentas), 2,5 mM MgCl<sub>2</sub> (Fermentas), 200 µM każdego z deoksynukleotydów (Fermentas) oraz po 0,5 µM każdego z pary starterów. Produkty PCR rozdzielano na żelach agarozowych 1,5–2,0%/250V/4 godziny. Żele po wybarwieniu bromkiem etydydy dokumentowano w świetle UV przy użyciu systemu Gel Logic 200 (Eastman Kodak Company, USA). W przypadku produktów PCR znakowanych fluorescencyjnie do rozdziału i detekcji wykorzystano analizator DNA ABI377XL (Applied Biosystems, Foster City, USA) wspomagany oprogramowaniem GeneScan 3.1 (Applied Biosystems), stosując 4.5% denaturujący żel poliakrylamidowy (Long Ranger, Cambrex Bio Science, USA). Do nanoszenia mieszaniny poreakcyjnej na żel poliakrylamidowy zastosowano grzebień membranowy (100 zębów) zgodnie z zaleceniem producenta (Web Scientific Ltd., W. Brytania).

Wyniki:

Na podstawie analiz molekularnych określono występowanie markerów blisko sprzężonych z wybranymi genami *Lr* w analizowanym zestawie odmian/linii. Linie bliskoizogeniczne TcNILs zawierające znane geny odporności *Lr*, posłużyły jako wzorce do porównań dla badanych odmian krajowych i zagranicznych. Gen *Lr1* identyfikowano na podstawie obecności specyficznych produktów amplifikacji dwóch markerów molekularnych pTAG621 i WR001. Spośród testowanych odmian pszenicy, 29 odmian polskich i 7 europejskich posiadało wspomniany gen. Również w linii bliskoizogenicznej LrB (PI) wykazano obecność tego genu. W przypadku genu *Lr9* jego obecność została zidentyfikowana jedynie w liniach TcNILs Lr9 i Lr25. Przy pomocy markera *STSLrk10-6* zidentyfikowano gen *Lr10* w 19 odmianach pszenicy ozimej z krajowej listy odmian COBORU i u 26 odmian pszenicy ozimej zarejestrowanych w innych krajach europejskich. Wykazano również obecność tego genu w linii TcNIL Lr27+Lr31. W celu identyfikacji genu *Lr19* wykorzystano marker SSR wmc221, który wykazał brak obecności tego genu u którejkolwiek z odmian oprócz TcNIL Lr19. Natomiast gen *Lr20* zidentyfikowano u jednej europejskiej odmiany KWS Cashel. Marker LR21\_SCAR generował w reakcji PCR cztery specyficzne haplotypy (G1-G4), każdy o innym zestawie trzech produktów PCR. Tylko haplotyp G1 wskazywał na obecność genu *Lr21* i poza linią TcNIL Lr21 został on zidentyfikowany w linii TcNIL Lr3ka.

Dyskusja:

Markery molekularne mogą pomóc w szybkiej detekcji genów odporności w odmianach roślin uprawnych. W pracy wykorzystano 7 markerów umożliwiających identyfikację sześciu genów odporności *Lr* na *P. trititica*. Otrzymane wyniki wskazują, że STS marker pTAG621 jest niespecyficzny i nieodpowiedni do identyfikacji genu *Lr1*, ponieważ obecność jego produktu zaobserwowano nie tylko u linii Tc+Lr1, ale również u innych linii zestawu TcNILs, łącznie z podatną odmianą Thatcher. W związku z tym wykorzystano specyficzny marker SSR WR001, który został zaprojektowany z sekwencji RGAs (resistance gene analogs) zlokalizowanej w locus genu *Lr1*.

Jednakże obecność produktu amplifikacji została zaobserwowana również w linii bliskoizogenicznej LrB (PI).

Marker SCAR SCS5<sub>550</sub> specyficzny dla genu odporności na *P. tritici* Lr9 został amplifikowany w TcNIL Lr9. Żadna z polskich i europejskich odmian pszenicy nie posiadała genu Lr9. Uzyskane wyniki wskazują na obecność tego produktu dodatkowo w linii TcNIL Lr25. W celu detekcji genu Lr10 w odmianach pszenicy wykorzystano wysoce specyficzny marker STSLrk10-6, który został przetestowany na materiale roślinnym różnego pochodzenia. Dodatkowo zaobserwowano obecność produktu amplifikacji w linii TcNIL Lr27 + Lr31. Pomimo zastosowania wysoce specyficznego markera, u żadnej z polskich i europejskich odmian pszenicy nie zidentyfikowano genu Lr19. Gen Lr20 został zidentyfikowany u jednej europejskiej odmiany KWS Cashel. Zastosowany w tym przypadku marker był wysoce specyficzny w stosunku do linii posiadających tylko ten gen odporności. W 2010 został zaprojektowany nowy marker SCAR Lr21 w celu identyfikacji grup haplotypów związanych z genem Lr21 odporności na rdzę brunatną. Przeprowadzone analizy wykazały obecność specyficznego haplotypu u linii TcNIL Lr21 oraz TcNIL Lr3ka.

W przypadku markerów opracowanych dla genów Lr1, Lr9, Lr10 i Lr21 uzyskane wyniki nie były w pełni zadowalające ze względu na ich obecność również w innych liniach zestawu TcNILs. W związku z tym należy się zastanowić nad ich dalszym wykorzystaniem w badaniach.

#### Wnioski:

1. Potwierdzono przydatność markerów molekularnych w identyfikacji genów odporności Lr19 i Lr20.
2. Wyniki identyfikacji genów odporności Lr1, Lr9, Lr10 i Lr21 są niejednoznaczne.

#### Temat badawczy 3: Ocena porażenia odmian/linii pszenicy ozimej przez izolaty *Septoria tritici*

Celem tego tematu było określenie reakcji fenotypowej (odporny/podatny) 200 odmian/linii pszenicy ozimej na zakażenie izolatami *S. tritici*. Cel został zrealizowany w zakresie przewidywanym do realizacji na obecny rok.

#### Materiały i metody:

Na potrzeby realizacji tematu, jesienią bieżącego roku założono doświadczenie w układzie dwóch losowanych bloków (dwa powtórzenia). Każda linia w danym powtórzeniu została wysiana w rzędki 1m. Do badań wykorzystano zestaw 200 odmian/linii:

- 83 odmiany pszenicy ozimej z krajowej listy opisowej odmian COBORU (2013)
- 92 odmiany zarejestrowane w innych krajach europejskich
- 25 odmian/linii różnicujących reakcję odpornościową na zakażenie *S. tritici*

#### Wyniki:

Wyniki oceny reakcji fenotypowej zostaną uzyskane w przyszłym roku kalendarzowym.