

SPRAWOZDANIE MERYTORYCZNE

z realizacji zadania na rzecz postępu biologicznego w produkcji roślinnej w 2015 roku

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

2. Kierownik zadania: Paweł Cz. Czembor, dr hab., prof. nadzw. IHAR-PIB
Zakład Fitopatologii, IHAR-PIB, Radzików, 05-870 Błonie
tel. 22 7334632; e-mail: p.czembor@ihar.edu.pl

3. Cel zadania: Celem badań w roku 2015 była ocena porażenia odmian/linii pszenicy ozimej przez kolejne izolaty *P. triticina* (w stadium siewki) oraz izolat *S. tritici* (w stadium rośliny dorosłej). Co więcej, odmiany pszenicy były testowane pod względem występowania markerów molekularnych blisko sprzężonych z sześcioma genami odporności: *Lr24*, *Lr25*, *Lr28*, *Lr29*, *Lr34* i *Lr35*.

3. 1. Temat badawczy 1: Ocena porażenia odmian/linii pszenicy ozimej przez izolaty *Puccinia triticina* (test Pt-2)

Cel tematu badawczego 1

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

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): Tr11_A1/12, Tr09_3/13, Tr09_8/13, Tr11_2/13, Tr11_4/13, Tr10_2/12.

Wyniki

W wyniku inokulacji 83 odmian pszenicy ozimej pochodzącej z krajowej listy opisowej odmian COBORU sześcioma izolatami o zróżnicowanej wirulencji zidentyfikowano 5 odmian (Belenus, Kredo, KWS Ozon, Pengar i Speedway) odpornych na wszystkie izolaty. Spośród badanych odmian, 17 było odpornych na 5, a 14 innych odmian wykazywało odporność na 1-4 izolatów *P. triticina*. Pozostałe odmiany pochodzące z krajowej listy COBORU były podatne na wszystkie izolaty. Spośród 79 odmian pochodzących z różnych krajów europejskich, aż 31 wykazało się odpornością na wszystkie testowane izolaty, a 19 odmian było odpornych na 5 izolatów. Z kolei 13 odmian wykazało odporność na 1-4 izolatów *P. triticina*.

Wszystkie badane izolaty były wirulentne w stosunku do genów *Lr2c*, *Lr10*, *Lr11*, *Lr14a*, *Lr14b*, *Lr18*, *Lr23*, *Lr24*, *Lr27+Lr31*, *Lr30*, *Lr33*, *Lr44*, *LrB* (Carina) oraz awirulentne w stosunku do *Lr1*, *Lr9*, *Lr19*, *Lr20*, *Lr25* i *Lr28*. Dla pozostałych linii zestawu różnicującego przynajmniej jeden izolat dla danej linii wykazywał odmienną reakcję fenotypową w porównaniu do pozostałych izolatów.

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 umiarkowane zróżnicowanie genetyczne odmian z krajowego rejestru opisowego odmian COBORU.
2. Wśród odmian zagranicznych zaobserwowano większe zróżnicowanie genetyczne i więcej efektywnych genów odporności w porównaniu do odmian z krajowego rejestru odmian.
3. Testowane izolaty pozwoliły na zróżnicowanie reakcji fenotypowej większości linii zestawu TcNILs, ale były one awirulentne w stosunku do genów *Lr*: 1, 9, 19, 20, 25 i 28.

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

Cel tematu badawczego 2

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. Cel tematu został osiągnięty.

Materiały i metody

Do analiz molekularnych wykorzystano zestaw 192 genotypów pszenicy, który został wybrany przy realizacji zadania w roku 2014, poszerzony o 4 linie zestawu TcNILs: *Lr* 34, *Lr* 35, *Lr* 37, *Lr* 46. 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: *Lr24*, *Lr25*, *Lr28*, *Lr29*, *Lr34* i *Lr35*. Specyficzne markery molekularne amplifikowano w reakcji PCR zgodnie z warunkami podanymi w publikacjach źródłowych z niewielkimi modyfikacjami: całkowita objętość reakcji 10 µl, 60 ng DNA, 1U Taq polimerazy (Fermentas GmbH, Niemcy), 1×PCR bufor z domieszką (NH₄)₂SO₄ (Fermentas), 2,5 mM MgCl₂ (Fermentas), 200 µM każdego z deoksynukleotydów (Fermentas) oraz po 0,5 µM każdego z pary starterów. W przypadku markera SCAR *Lr29F18/Lr29R18* sprzężonego z genem *Lr29* podjęto następujące próby optymalizacji reakcji PCR: zastosowano 2 różne programy PCR różniące się długością trwania oraz temperaturami poszczególnych etapów, zastosowano różne stężenia MgCl₂ (1,5 mM i 2,5 mM), a także wykorzystano różne rodzaje i stężenia polimerazy (1U Taq polimerazy Fermentas oraz 2,5U HotStar Taq polimerazy Qiagen). Produkty PCR były rozdzielane 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 grzebienie membranowe (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 *Lr24* identyfikowano na podstawie obecności produktów amplifikacji markera wPt8845-3. Spośród testowanych odmian, 2 pochodzące z krajowej listy opisowej COBORU oraz 8 odmian europejskich posiadało wspomniany gen odporności. Do identyfikacji genu *Lr25* wykorzystano dwa markery SSR, gwm251 i gwm6. Żadna z badanych odmian nie wykazywała obecności obydwu markerów, tylko linia TcNIL-*Lr25* zestawu różnicującego. W przypadku genu *Lr28* jego obecność została potwierdzona markerem SCAR SCS421-570 dla 3 odmian z krajowej listy

COBORU oraz dla 18 odmian europejskich. Przy użyciu złożonego markera *cssfr5* przeprowadzono analizy w celu identyfikacji genu *Lr34*. Gen został oznaczony tylko u odmiany Baletka (krajowa lista opisowa odmian COBORU). W celu identyfikacji genu *Lr35* wykorzystano marker *Sr39F/R*, który wykazał brak obecności tego genu u którejkolwiek z odmian oprócz linii TcNIL-Lr35. Mimo licznych prób optymalizacji warunków PCR markera *Lr29F18/R18* sprzężonego z genem *Lr29*, nie uzyskano amplifikacji specyficznego produktu (900pz) dla żadnego obiektu w tym TcNIL-Lr29.

Dyskusja

Wykorzystane w badaniach markery molekularne posłużyły do identyfikacji 5 genów odporności *Lr* na *Puccinia triticinia*. Wykorzystany do identyfikacji genu *Lr24* marker wPt8845-3 został zaprojektowanego z sekwencji klonów DArT (upublicznionych w roku 2011 na stronie <http://www.diversityarrays.com>). Marker jest blisko sprzężony z badanym genem i może być stosowany do selekcji roślin posiadających gen *Lr24*. W celu identyfikacji genu *Lr25* wykorzystano 2 markery SSR. Jednak w naszych badaniach produkty PCR dla markerów *gwm251* i *gwm6* wskazujące na obecność typowanego genu nie występowały w żadnej odmianie jednocześnie (tylko w TcNIL-Lr25), co raczej świadczy o braku występowania *Lr25* w badanych odmianach. Identyfikacja genu *Lr28* została przeprowadzona przy zastosowaniu markera *SCS421-570*, który cechuje się wysoką specyficznością w stosunku do odmian/linii posiadających wspomniany gen odporności *Lr*. Wysoce specyficzny marker *cssfr5* wykorzystany został do identyfikacji genu *Lr34*. Gen *Lr34* jest genem warunkującym odporność pleiotropową rośliny dorosłej (ang. Pleiotropic Adult PaResistance, PAPR) na kilka patogenów jednocześnie: rdzę brunatną, rdzę żółtą, rdzę żdźbłową i mącznika (*Lr34-Yr18-Pm38-Sr57*). Wśród badanych odmian tylko Baletka wykazywała obecność wspomnianego genu. Marker SCAR *Sr39F/R* umożliwia identyfikację genu *Sr39* odporności na rdzę żdźbłową i genu *Lr35* odporności na rdzę brunatną oraz innych cech, które mogą być potencjalnie związane z tą samą translokacją. Marker jest cennym narzędziem w detekcji *Lr35*. Jednak w naszych analizach nie zidentyfikowano tego genu u żadnej z odmian europejskich i odmian znajdujących się na krajowej liście opisowej COBORU. W przypadku genu *Lr29* mimo wielu prób nie zoptymalizowano warunków PCR dla badanego markera *Lr29F18/R18*.

Wnioski

1. Potwierdzono przydatność markerów molekularnych do identyfikacji genów odporności *Lr24*, *Lr28*, *Lr34* i *Lr35*.
2. Wśród badanych 150 odmian pszenicy ozimej geny *Lr24*, *Lr28* i *Lr34* wykryto odpowiednio dla 10, 21 i jednej odmiany.
3. Gen *Lr35* nie został wykryty w żadnej odmianie pszenicy ozimej (tylko w linii zestawu różnicującego TcNIL-Lr35).
4. Markery zastosowane do detekcji genu *Lr25* nie dały jednoznacznych wyników.
5. Nie uzyskano optymalnych warunków do amplifikacji markera *Lr29F18/R18*, które umożliwiłyby identyfikację genu *Lr29* w badanych odmianach i liniach zestawu różnicującego.

3. 3. Temat badawczy 3: Ocena porażenia odmian/linii pszenicy ozimej przez izolaty *Septoria tritici* (test St-1)

Cel tematu badawczego 3

Celem tego tematu było określenie reakcji fenotypowej (odporny/podatny) 200 odmian/linii pszenicy ozimej na zakażenie izolatami *S. tritici*. Cel tematu został osiągnięty.

Materiały i metody

Na potrzeby realizacji tematu, jesienią 2014 roku założono doświadczenie w układzie dwóch losowanych bloków (dwa powtórzenia). Każda odmiana/linia w danym powtórzeniu została wysiana w jednym rzędzie jedno-metrowym. 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*.

W roku bieżącym (2015) przeprowadzono ocenę reakcji fenotypowej 200 odmian/linii pszenicy ozimej na zakażenie izolatami *S. tritici* IPO323. Rośliny z rozwiniętym w pełni liściem flagowym zakażano zawiesiną zarodników o stężeniu $15 \times 10^6/\text{ml}$. Po około 21 dniach od inokulacji oceniano 8-10 liści flagowych każdego obiektu pod względem procentu powierzchni liścia pokrytego nekrozami oraz owocnikami grzyba (piknidiami). Precyzyjne określenie parametrów chorobowych wykonane

zostało przy użyciu komputerowej analizy obrazu porażonych. Ponieważ odmiana Flame posiada gen *Stb6*, który warunkuje odporność na zakażenie izolatem IPO323, ta odmiana została wykorzystana do wyróżnienia odmian odpornych (o tym samym poziomie odporności lub lepszym). W tym celu zastosowano metodę statystyczną lewostronnego testu Dunnetta (na poziomie istotności $\alpha=0,05$) dla wartości procentu powierzchni liścia pokrytego nekrozami.

Wyniki

Ocena stopnia porażenia liści przez zastosowanie komputerowej analizy obrazu pozwoliła na uzyskanie bardzo precyzyjnych i miarodajnych wyników. Badany izolat IPO323 wchodzi w interakcję typu gen-na-gen z genem odporności na septoriozę paskowaną *Stb6*, a odmiana Flame jest odmianą referencyjną posiadającą ten gen. Na podstawie testu Dunnetta spośród badanych odmian, 76 pochodzących z krajowej listy opisowej COBORU, 90 odmian europejskich oraz 16 odmian/linii z zestawu posiadającego znane geny odporności wykazało odporność na poziomie zbliżonym do odmiany referencyjnej Flame, bądź lepszym

Dyskusja

Septorioza paskowana liści pszenicy (*Septoria tritici* blotch, STB) wywoływana jest przez patogena *Mycosphaerella graminicola*, stadium niedoskonałe (czynnik sprawczy) *Septoria tritici*. W celu lepszego wykorzystania genów odporności w programach hodowlanych, konieczna jest znajomość ich występowania w obecnie uprawianych odmianach. Otrzymane przez nas wyniki pozwalają na wyłonienie odmian potencjalnie odpornych na STB. Wykazano, że odmiana pszenicy Flame posiada pojedynczy gen odporności na izolat IPO323. Odmiany europejskie i odmiany pochodzące z krajowej listy opisowej COBORU wykazujące odporność na poziomie zbliżonym do odmiany Flame bądź lepszym, mogą zostać wytypowane jako te posiadające gen odporności na STB, *Stb6*. Możliwe jest jednak również, że izolat IPO323 wchodzi w interakcję z innymi genami odporności, a wyróżnione w badaniach odmiany posiadają więcej niż jeden gen odporności.

Wnioski

1. W przeprowadzonym doświadczeniu dla referencyjnej odmiany Flame zanotowano reakcję niekompatybilną (odporności) wskazującą na interakcję genu *Stb6* i komplementarnego genu awirulencji izolatu IPO323 *Septoria tritici*.
2. Na podstawie reakcji odporności referencyjnej odmiany Flame, wyróżniono odmiany pochodzące z krajowej listy opisowej COBORU i odmiany europejskie, które mogą posiadać gen *Stb6*.

3.4 Temat badawczy 4: Ocena porażenia odmian/linii pszenicy ozimej przez izolaty *Septoria tritici* (test St-2), kontynuacja w roku 2016

Cel tematu badawczego 4

Celem tego tematu było założenie doświadczenia dla określenia reakcji fenotypowej (odporny/podatny) 200 odmian/linii pszenicy ozimej na zakażenie izolatami *S. tritici*, co nastąpi w roku 2016. Cel tematu został osiągnięty.

Materiały i metody

Na potrzeby realizacji tematu, jesienią bieżącego roku założono doświadczenie w układzie dwóch losowanych bloków (dwa powtórzenia). Każda odmiana/linia w danym powtórzeniu została wysiana w jednym rzędzie jedno-metrowym. Do badań wykorzystano zestaw 200 odmian/linii, który również został użyty przy realizacji zadania w roku 2014 (test St-1 odporności na *S. tritici*).

Wyniki

Wyniki oceny reakcji fenotypowej zostaną uzyskane w przyszłym roku kalendarzowym.

Dyskusja

Na tym etapie realizacji tematu brak wyników do dyskusji.

Wnioski

Na tym etapie realizacji tematu brak wniosków.