

SPRAWOZDANIE MERYTORYCZNE

z realizacji zadania na rzecz postępu biologicznego w produkcji roślinnej w 2016 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 Genetyki i Hodowli Roślin, IHAR-PIB, Radzików, 05-870 Błonie

tel. 22 7334555; e-mail: p.czembor@ihar.edu.pl

3. Cel zadania: Celem badań w roku 2016 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: *Lr26*, *Lr37*, *Lr39*, *Lr47*, *Lr51* i *Lr52*.

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

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 w pełni 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 uredinospór/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): 11_16/15, 10_14/15, 10_2/15, 9_4/15, Pt14-88-2, Pt13/10-78-2.

Wyniki

W wyniku inokulacji 83 odmian pszenicy ozimej pochodzących z krajowej listy opisowej COBORU sześcioma izolatami o zróżnicowanej wirulencji zidentyfikowano 4 odmiany (Kredo, KWS Magic, Pengar, Speedway) odporne na wszystkie izolaty. Spośród badanych odmian, 3 (Forum, Ostroga, Rapsodia) były odporne na 5 izolatów, a 42 inne odmiany wykazywały 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 26 wykazało się odpornością na wszystkie testowane izolaty, a 7 odmian było odpornych na 5 izolatów. Z kolei 35 odmian wykazało odporność na 1-4 izolatów *P. triticina*. Pozostałe 11 odmian było podatne na wszystkie izolaty.

Wszystkie badane izolaty były wirulentne w stosunku do genów *Lr3ka*, *Lr10*, *Lr14a*, *Lr14b*, *Lr18*, *Lr30*, *Lr33*, *Lr38* (Kohn), *LrB* (Carina) oraz awirulentne w stosunku do *Lr2a*, *Lr9*, *Lr19*, *Lr24*, *Lr28*, *Lr29*, *Lr52*. Dla pozostałych linii zestawu różnicującego przynajmniej jeden izolat dla jednej linii wykazywał odmienną reakcję fenotypową w porównaniu do pozostałych izolatów. Dla kilku kombinacji izolat-obiekt zaobserwowano mieszaną reakcję fenotypową: 10_2/15/Bystra, 10_14/15/Elipsa, Pt14-88-2/Elipsa, Pt13/10-78-2/Elipsa, 10_2/15/Garantus, Pt14-88-2/Kohelia, Pt13/10-78-2/KWS Livius, Pt13/10-78-2/KWS Ozon.

Dyskusja

Mebrate i in. (2008) w doświadczeniach poświęconych postulowaniu genów odporności na rdzę brunatną wykorzystali 31 izolatów *P. triticina*, które pozwoliły na identyfikację 18 genów *Lr* u 36 odmian pszenicy. Przy tak dużej liczbie izolatów uzyskano duże spektrum wirulencji, mimo to u wielu odmian pszenicy nie zidentyfikowano genów, gdyż wszystkie zastosowane izolaty były w stosunku do nich wirulentne. To doświadczenie obrazuje, jak dużą liczbę izolatów należy przebadać, aby uzyskać wystarczająco szerokie spektrum wirulencji umożliwiające identyfikację genów *Lr* w wielu polskich i europejskich odmianach pszenicy. Martinez i in. (2007) wykorzystując jedynie 12 izolatów *P. triticina* zidentyfikowali geny odporności na rdzę brunatną u 15 spośród 28 testowanych odmian pszenicy. Z kolei Hysing i in. (2006) wykorzystali 12 izolatów w celu identyfikacji genów odporności *Lr* w 84 europejskich odmianach pszenicy. Badacze zidentyfikowali 9 znanych genów odporności, przy czym dla 47 odmian opisano co najmniej jeden gen odporności na *P. triticina*. Jednak tylko jedna odmiana była odporna na wszystkie badane izolaty.

Jak dotąd w niniejszej pracy przetestowanych zostało 18 izolatów *P. triticina*, co pozwoliło wyłonić szerokie spektrum wirulencji, umożliwiające zróżnicować fenotypowo 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*: 2a, 9, 19, 24, 28, 29, 52.

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 w pełni osiągnięty.

Materiały i metody

Do analiz molekularnych wykorzystano zestaw 195 genotypów pszenicy. 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: *Lr26*, *Lr37*, *Lr39*, *Lr47*, *Lr51* i *Lr52*. 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. Produkty PCR były rozdzielane na żelach agarozowych 1,5 – 2,0%/250V/4 godziny. Żele po wybarwieniu bromkiem etyldyny 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

Linie bliskoizogeniczne TcNILs zawierające znane geny odporności *Lr* posłużyły jako wzorce do porównań dla badanych odmian krajowych i zagranicznych. Gen *Lr26* zidentyfikowano na podstawie obecności produktów amplifikacji markera SCAR IB267. Spośród testowanych odmian, 5 pochodzących z krajowej listy opisowej COBORU oraz 5 odmian europejskich posiadało wspomniany gen odporności. Ponadto, wśród linii różnicujących zestawu Tc-NILs, wspomniany marker występował tylko w TcNIL-Lr26. Do identyfikacji genu *Lr37* wykorzystano dwa markery PCR, Ventriup/LN2 oraz URIC/LN2. Jedynie w przypadku obecności produktów PCR obydwu markerów jednocześnie wnioskowano o obecności genu *Lr37* w badanej odmianie. Gen *Lr37*

zidentyfikowano w 32 odmianach pochodzących z krajowej listy COBORU i 24 odmianach europejskich. W przypadku genu *Lr39* jego obecność została potwierdzona markerem SSR gwm296 dla 7 odmian z listy COBORU oraz 6 odmian europejskich. Przy użyciu markera PS10R/L przeprowadzono analizy w celu identyfikacji genu *Lr47*. Gen został oznaczony tylko w linii TcNIL-Lr47 zestawu różnicującego. Marker S30-13L/AGA7-759 umożliwił identyfikację genu *Lr51* u odmiany Meister pochodzącej z listy opisowej COBORU. Natomiast marker wykorzystany do identyfikacji genu *Lr52* okazał się niespecyficzny, gdyż produkty jego amplifikacji zidentyfikowano w kilku liniach zestawu różnicującego TcNILs: TcNIL-Lr15, TcNIL-Lr26, TcNIL-Lr39, TcNIL-Lr46, TcNIL-Lr47, TcNIL-LrB (PI), TcNIL-Lr52. W związku z tym marker nie był testowany na odmianach pszenicy.

Dyskusja

Wykorzystane w badaniach markery molekularne posłużyły do identyfikacji 6 genów odporności *Lr* na *P. tritici*. Wykorzystany do identyfikacji genu *Lr26* marker IB267 został zaprojektowany w badaniach z wykorzystaniem linii pszenicy z translokacją chromosomu żyta 1RS, który zawiera kilka ważnych genów odporności na rdze: *Lr26*, *Sr31*, *Yr9*. Gen *Lr26* jest identyfikowany w wielu odmianach pszenicy zawierających translokację 1RS-1BL. Również w niniejszej pracy w/w gen został zidentyfikowany zarówno w odmianach zarejestrowanych w Polsce, jak i w innych krajach europejskich. Gen *Lr37* należy do kompleksu genów *Lr37-Yr18-Sr38*, znajdującego się w translokacji 2NS-2AS. W celu jego identyfikacji wykorzystano 2 markery, które umożliwiły lokalizację *Lr37* w 32 odmianach pochodzących z krajowej listy opisowej COBORU i w 24 odmianach europejskich. Wyniki innych prac wskazują na identyfikację *Lr37* w odmianach pszenicy zarejestrowanych m.in. w Wielkiej Brytanii, Czechach, Francji oraz Polsce. Identyfikacja genu *Lr39* została przeprowadzona przy użyciu specyficznego markera SSR gwm296. Gen *Lr39* podobnie jak kilka innych, został wprowadzony do pszenicy zwyczajnej z *Aegilops tauschii* i jest zlokalizowany na chromosomie 2DS. Pietrusińska i in. (2011, 2013) wykorzystali marker gwm296 do selekcji roślin posiadających *Lr39* w celu piramidowania genów odporności. W naszej pracy w/w marker był przydany w identyfikacji kilku odmian pochodzących z polskiej listy oraz kilku odmian europejskich. Wysoce specyficzny marker PS10R/L został wykorzystany do typowania genu *Lr47*. Żadna z badanych odmian nie posiadała wspomnianego genu, jednak spośród zestawu linii bliskoizogenicznych tylko linia TcNIL-Lr47 posiadała ten gen, co potwierdza jego specyficzność. Marker PS10R/L jest cennym narzędziem w selekcji odmian wspomaganej markerami, co znacznie skraca czas i ułatwia identyfikację genów odporności. W przeprowadzonych przez nas analizach gen *Lr51* został zidentyfikowany jedynie w jednej odmianie pochodzącej z krajowej listy opisowej COBORU – Meister. Opracowanie markerów molekularnych dla genu *Lr51* ułatwiło łączenie kilku genów odporności na rdzę brunatną. W przypadku genu *Lr52* jego identyfikacja w odmianach pszenicy okazała się nieskuteczna. Marker STS wykorzystany do selekcji w/w genu był niespecyficzny, co uniemożliwiło dalsze analizy. Podobnie jak w pracy Serfling i in. (2011) produkt amplifikacji TXW200 był identyfikowany nie tylko w linii TcNIL-Lr52, ale również w liniach, które posiadają inne geny *Lr*.

Wnioski

1. Potwierdzono przydatność markerów molekularnych do identyfikacji genów odporności *Lr26*, *Lr37*, *Lr39*, *Lr47* i *Lr51*.
2. Wśród badanych 150 odmian pszenicy ozimej geny *Lr26*, *Lr37*, *Lr39* i *Lr51* wykryto odpowiednio dla 10, 56, 13 i jednej odmiany.
3. Gen *Lr47* nie został wykryty w żadnej odmianie (tylko w linii zestawu różnicującego TcNIL-Lr47).
4. Marker użyty do detekcji genu *Lr52* był niespecyficzny.

3. 3. Temat badawczy 3: Ocena porażenia odmian/linii pszenicy ozimej przez izolaty *Septoria tritici* (test St-2)

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 w pełni osiągnięty.

Materiały i metody

Na potrzeby realizacji tematu, jesienią 2015 roku założono doświadczenie w układzie dwóch losowanych bloków (dwa powtórzenia). Każda odmiana/linia w danym powtórzeniu została wysiana w jednym rzędki 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*.

Na początku roku 2016 roku okazało się niestety, że wysiane doświadczenie wymarzło. W związku z tym wszystkie odmiany zostały wysiane do palet ogrodnich, poddane jarowizacji w warunkach kontrolowanych (8 tygodni) i wiosną wysadzono je do tunelu w układzie dwóch powtórzeń. W roku bieżącym (2016) przeprowadzono ocenę reakcji fenotypowej 200 odmian/linii pszenicy ozimej na zakażenie izolatem *S. tritici* IPO88004. Rośliny z rozwiniętym w pełni liściem flagowym zakażano zawieszoną zarodnikami 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 nekrozą oraz owocnikami grzyba (piknidiami). Precyzyjne określenie parametrów chorobowych wykonane zostało przy użyciu komputerowej analizy obrazu porażonych liści (WinCam 2010, Regent Instruments Inc., Kanada). W celu wyróżnienia odmian charakteryzujących się podobną reakcją fenotypową zastosowano analizę skupień aglomeracyjnego grupowania hierarchicznego (ang. agglomerative hierarchical clustering, AHC) przy użyciu algorytmu UPGA (ang. unweighted pair-group average) (program komputerowy XLSTAT).

Wyniki

Ocena stopnia porażenia liści przez zastosowanie komputerowej analizy obrazu pozwoliła na uzyskanie bardzo precyzyjnych i miarodajnych wyników. Przy zastosowaniu analizy skupień - AHC, na podstawie danych dotyczących procentu pokrycia liści nekrozą i piknidiami, wykonano grupowanie odmian wykazujących podobny poziom reakcji. Analiza podzieliła odmiany na 6 klas. Do pierwszej klasy zostało przyporządkowanych 132 odmiany, gdzie średni poziom pokrycia liści nekrozą wynosił 18,7% (min. 1,1%, max. 42,5%), a średni poziom pokrycia liści piknidiami wyniósł 8,0% (min. 0,4%, max. 21,7%). Kolejną pod względem liczebności przypisanych do niej odmian była klasa druga, 45 odmian. Tu średnie pokrycie liści nekrozą wynosiło 38,3% (min. 28,0%, max. 53,8%), a piknidiami 26,7% (min. 14,5%, max. 40,1%). W trzeciej klasie znalazły się tylko 3 odmiany. Była to klasa charakteryzująca się najwyższym poziomem pokrycia liści zarówno nekrozą (średnio 92,6%), jak i piknidiami (średnio 68,4%). W klasie czwartej odnotowano 18 odmian, przy średnim pokryciu liści nekrozą 60,3% (min. 49,9%, max. 76,5%) oraz piknidiami 43,2% (min. 32,7%, max. 58,4%). Dwie odmiany zdecydowanie odróżniały się od czterech pozostałych klas i zostały zaklasyfikowane jako dwie oddzielne klasy. Zobrazowaniem podziału roślin na klasy jest wykony dendrogram.

Dyskusja

Septorioza paskowana liści pszenicy (*Septoria tritici* blotch, STB) wywoływana jest przez patogena *Mycosphaerella graminicola*, stadium niedoskonałe *Zymoseptoria tritici* (syn. *Septoria tritici*). STB jest ważną chorobą we wszystkich rejonach uprawy pszenicy, gdyż jest zaliczana do najbardziej szkodliwych chorób liści pszenicy. Każdego roku powoduje znaczne straty plonu ziarna sięgające 30-40%. W ostatniej dekadzie położono ogromny nacisk na hodowlę odmian odpornych. W celu lepszego wykorzystania genów odporności w programach hodowlanych, konieczna jest znajomość ich występowania w obecnie uprawianych odmianach. Czembor i in. (2011) w przeprowadzonych badaniach określili spektrum wirulencji 23 izolatów *S. tritici* na zestaw odmian posiadających znane geny odporności. Wśród badanych izolatów IPO88004 był awirulentny do odmian: Veranopolis (*Stb2*), Cs Synthetic (6x)7D (*Stb5*), Flame (*Stb6*) i Arina (*Stb15*, *Stb6*). Natomiast dla odmian Bulgaria88 (*Stb1*), Israel493 (*Stb3*) i Estanzuela Federal (*Stb7*) zaobserwowano reakcję skrajnej podatności. W związku z tym można przypuszczać, że wśród badanych odmian o skrajnej podatności należących do klasy 3 i 4 brak jest genów odporności *Stb1*, *Stb3* i *Stb7*. Natomiast, wskazanie genów odporności, które warunkują reakcje odporności dla odmian w pozostałych klasach jest trudna w tej chwili do określenia i potrzebuje wsparcia badań występowania asocjacji odporność-marker molekularny, które będą prowadzone w następnym roku realizacji tematu. Pochodzący z Etiopii izolat IPO88004 był również stosowany w badaniach Chartrain i in. (2004) w celu pozyskania nowych źródeł odporności na STB. Z kolei Arraiano i in. (2006) wykorzystywali wspomniany izolat podczas identyfikacji odporności na STB w 238 europejskich odmianach pszenicy.

Wnioski

1. W przeprowadzonych analizach zanotowano podział odmian pszenicy na cztery główne klasy znacząco różniące się między sobą stopniem porażenia liści.
2. Odmiany należące do pierwszej klasy charakteryzują się niskim procentem pokrycia liści nekrozą (średnio 18,7%) i piknidiami (średnio 8,0%), co świadczy o ich odporności na izolat IPO88004.

3.4 Temat badawczy 4: Ocena porażenia odmian/linii pszenicy ozimej przez izolaty *Septoria tritici* (test St-3), kontynuacja w roku 2017

Cel tematu badawczego 4

Celem tego tematu było założenie doświadczenia dla określenia reakcji fenotypowej (odporny/podatny) 200 odmian/linii pszenicy ozimej na zakażenie izolatem *S. tritici*, co nastąpi w roku 2017. Cel tematu został w pełni osiągnięty.

Materialy 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 rzędki jedno-metrowym. Do badań wykorzystano zestaw 200 odmian/linii, który również został użyty przy realizacji zadania w latach poprzednich (test St-1 i St-2 odporności na *S. tritici*).

Wyniki

Wyniki oceny reakcji fenotypowej zostaną uzyskane w przyszłym roku kalendarzowym.