

Lp. w zał. do Rozporządzenia MRiRW: 9.

Tytuł zadania: **Efektywność piramidowania genów odporności na mączniaka prawdziwego (*Blumeria graminis* f.sp. *tritici*) i rdzę brunatną (*Puccinia triticina*) w pszenicy ozimej.**

Kierownik zadania: **prof. dr hab. J.H. Czembor**

Cel zadania:

Temat badawczy 1. Piramidowanie efektywnych genów odporności.

- Przeprowadzenie krzyżowań zbieżnych, wstecznych, selekcja fenotypowa oraz molekularna.
- Wyprowadzenie F₁ populacji mapującej(ych).

Temat badawczy 2. Poszukiwanie nowych źródeł odporności.

- Poszukiwanie efektywnych genów odporności na rdzę brunatną i mączniaka prawdziwego.

Temat badawczy 3. Ocena linii w różnych warunkach środowiskowych.

- Selekcjonowanie materiału roślinnego, odpornego na rdzę brunatną, mączniaka prawdziwego oraz o korzystnych cechach gospodarczych.

Materiały i metody:

Temt badawczy 1. Materiał badawczy stanowiło 11 populacji mieszańcowych BIO, o różnym profilu genetycznym (uzyskane we wcześniejszych badaniach prowadzonych w latach 2008-2013). Materiał roślinny stanowiły również populacje mapujące, do których został wprowadzony efektywny gen odporności na rdzę brunatną, gen Lr55. W badaniach jako źródła odporności na rdzę brunatną oraz mączniaka prawdziwego wykorzystano następujące linie: Lr41, Lr47 oraz Lr55 (źródła odporności na rdzę brunatną), linie Pm21 i Pm37 (źródła odporności na mączniaka prawdziwego). W krzyżowaniach wypierających (wstecznych), w zależności od kombinacji krzyżówkowej, zostały wykorzystane odmiany pszenic ozimych (Nadobna, Bogatka, Lexus, RAH979, Meteor) o wysokiej wartości gospodarczej, ale podatne na populację rdzy brunatnej i mączniaka prawdziwego występujące w Polsce. W zależności od etapu przeprowadzanych badań, materiał roślinny, uprawiany był w warunkach kontrolowanych (szklarnia oraz fitotron) oraz w warunkach polowych – poletka doświadczalne w Radzikowie.

Ocena fenotypowa stopnia odporności populacji mieszańcowych na *P. recondita* f.sp. *triticina* oraz *B. graminis* f.sp. *tritici* (Selekcja fenotypowa)

Do oceny fenotypowej stopnia odporności form rodzicielskich i populacji mieszańcowych na porażenie przez *P. recondita* f.sp. *triticina* oraz *B. graminis* f.sp. *tritici* zostały wykorzystane jednozarodnikowe izolaty: odpowiednio Pt 2902 (*P. recondita* f.sp. *triticina*) oraz Bgt Kadett (*B. graminis* f.sp. *tritici*). Izolaty pochodziły z kolekcji Pracowni Genetyki Stosowanej IHAR-PIB Radzików. Doświadczenia fitopatologiczne prowadzone były w warunkach kontrolowanych, przy fotoperiodzie 16 godz. światła i 8 godz. ciemności oraz w temperaturze w zakresie 16-22°C. Testowane rośliny zakażane były zawiesiną zarodników *P. recondita*, a następnie po upływie 3-4 dni przeprowadzono inokulację roślin izolatami *B. graminis*. Po upływie 8-10 dni została oceniona reakcja roślin wykorzystując do tego celu pięciostopniową skalę, wg. Levine o Cherewick dla rdzy brunatnej oraz wg. Mainsa i Daetza dla mączniaka prawdziwego.

Analiza molekularna, selekcja materiału roślinnego

W zależności do rodzaju przeprowadzanej selekcji (wyboru systemu markerowego), DNA materiału roślinnego izolowane było dwoma różnymi metodami. Pierwsza metoda ekstrakcji DNA przeprowadzana była za pomocą buforu TPS, i była wykorzystana podczas selekcji materiału roślinnego pod kątem obecności genów *Pm21* oraz *Lr47*. Druga metoda, przeprowadzana była przy użyciu gotowego zestawu DNeasy Plant Mini Kit (QIAGEN). Genomowe DNA, wyizolowane tą metodą, wykorzystane było dla markerów molekularnych, wykorzystywanych podczas selekcji genów *Lr41* oraz *Pm37*.

Reakcja łańcuchowej polimeryzacji DNA, przeprowadzana była przy wykorzystaniu niskoprofilowanych cienkościennych próbek lub przy użyciu płytek – bloków 96-ścio dołkowych. Powielanie fragmentów odbywało się w termocyklerze Mastercycler ep. W zależności od układu markerowego, reakcja powielania została przeprowadzona w objętości 8-25µl. Skład komponentów reakcji PCR został ustalony na podstawie wcześniejszych badań. W zależności od identyfikacji genów, liczba wykorzystanych markerów na jeden gen wynosiła od 1 do 5 markera(ów):

- Gen *Lr41*: Gdm35, Gwm210, Barc124, Gwm261, Gwm296;
- Gen *Lr47*: (PSAPSR+PS10L+PS10L2), Gwm60;
- Gen *Pm21*: NAU/xibao;
- Gen *Pm37*: Gwm332; Wmc790; STSBE406627.

W zależności od układu markerowego, rozdział produktów amplifikacji PCR, odpowiednio dla genów: *Lr41*, *Lr47* oraz *Pm37*, przeprowadzany był na sekwenatorze DNA ABI 377 XL na 4,75% denaturującym żelu polyakrylomidowym (Long Ranger Gel Solution, Rockland, USA). Dla produktów amplifikacji dla genu *Pm21*(NAU/xibao) oraz genu *Lr47* (PSAPSR+PS10L+PS10L2), detekcja produktów została przeprowadzona na 1,5% żelu agarozowym przy napięciu 240 V, przez 4 godz. w buforze 0,5 x TBE. Analiza uzyskanych obrazów detekcji, dla dwóch systemów elektroforytycznych, oceniana była wizualnie. W celu wyodrębnienia roślin o korzystnej kombinacji genów odporności, zostały wykorzystane wzorce – uzyskany produkt dawcy odporności.

Temat badawczy 2. Materiałem roślinny stanowił zestaw 30 odmian i linii różnicujących o znanych genach odporności, w tym linie Pm38(Lr34) i Pm39(Lr46), oraz wrzorec – odmiana podatna – Nimbus. Linie/źródła posiadające znane geny odporności Pm38(Lr34) oraz Pm39(Lr46).

Ocena fenotypowa stopnia odporności na *Blumeria graminis* f.sp. *tritici*

W badaniach wykorzystano populację 52 jednonarodnikowych izolatów *Blumeria graminis* f.sp. *tritici*, wyizolowanych z porażonych liści pszenicy, zebranych w różnych rejonach Polski w 2014 roku. Nasiona odmian i linii zestawu różnicującego wysiewano do doniczek z ziemią ogrodową (po 10 – 15 ziarniaków na doniczkę). Siewki rosły w izolacji przestrzennej w warunkach szklarniowych, z dodatkowym, sztucznym doświetlaniem przy długości dnia 16 h oraz temperaturze w zakresie 16-22°C. Dziesięć dni po wysiewie, gdy rośliny były w stadium w pełni rozwiniętego drugiego liścia, prowadzono zakażenia sztuczne każdym izolatem osobno. Zarodniki namnożone na roślinach odmiany podatnej Nimbus, były równomierne strąsane nad roślinami odmian i linii zestawu różnicującego. Do izolacji przestrzennej wykorzystano namioty foliowe. Ocenę fenotypową stopnia porażenia odmian i linii poszczególnymi izolatami grzyba *B. graminis* przeprowadzano po ok. 8 dniach wykorzystując pięciostopniową skalę (0-4) w której: 0 = brak widocznych objawów porażenia; 1 = niewielkie nekrozy; 2 = powiększające się nekrozy wraz ze skąpym zarodnikowaniem; 3 = chlorozy, grzybnia rozwinięta, lecz słabo zarodnikująca; 4 = dobrze rozwinięta i zarodnikująca grzybnia. Odmiany/linie o reakcji 0-2, tworzyły grupę odpornych natomiast rośliny o reakcji 3-4 grupę podatnych.

Temat badawczy 3. W 2014 roku doświadczenie przeprowadzono na poletku doświadczalnym w Radzikowie. Materiał roślinny, stanowiły populacje mieszańcowe BIO: bio_4b, BIO5_b, BIO7_b, BIO8_b w liczbie 260 roślin, 100 linii pochodzących z krzyżówek z genem odporności na rdzę brunatną – genem *Lr55* oraz 20 linii pochodzących z krzyżówek z genem odporności na rdzę brunatną – genem *Lr47*. Ocena materiału roślinnego dokonywana była w tygodniowych odstępach czasu i w odniesieniu do dwóch odmian wzorcowych: Muszelka oraz Patras. Ocena materiału roślinnego polegała na ocenie stopnia porażenia pod kątem podatności/odporności na rdzę brunatną oraz żółtą, mączniaka prawdziwego, septoriozę, oraz przezimowanie, kłosznie, wysokość, plon.

Wyniki i dyskusja:

Temat badawczy 1. W bieżącym roku sprawozdawczym łącznie wysiano 695 roślin, z czego analizowano 617, a 78 roślin wypadło z analizy. Na podstawie testów odporności (selekcja fenotypowa), do badań molekularnych, spośród wszystkich analizowanych populacji mieszańcowych, wyselekcjonowano 313 roślin. Były to rośliny wg. oceny fenotypowej, odporne na oba patogeny. Za pomocą marekrów molekularnych, wyselekcjonowane rośliny, przebadano pod kątem obecności wprowadzonych genów: *Lr41*, *Lr47*, *Pm21* oraz *Pm37*. Do dalszych badań wyselekcjonowano 86 roślin, charakteryzujących się różnym profilem genetycznym.

W dostępnej literaturze naukowej, brak jest doniesień na temat piramidyzowania takich schematów odpornościowych, jakie zostały zaproponowane przez wykonawców projektu. Kumulacja efektywnych genów odporności w niniejszym projekcie jest procesem niezwykle pracochłonnym i długotrwałym, jednak pozwoli na uzyskanie genotypów o trwalszej odporności na mączniaka prawdziwego i rdzę brunatną. Uzyskane genotypy będą stanowiły cenny materiał roślinny. Zaproponowane rozwiązanie nie było wcześniej stosowane w pszenicy ozimej oraz stanowi rozwiązanie oryginalne w genetyce odpornościowej tego zboża. Ponadto, obecność wielu efektywnych

genów odporności, w nowych odmianach pszenicy znacząco zwiększa trwałość ich odporności na choroby, w tym na rdzę brunatną oraz mączniaka prawdziwego (Parks, 2008; Pietrusińska 2009).

Literatura do tematu badawczego 1:

Parks R., Carbone I., Murphy P. J., Marshall D., Cowger C. 2008. Virulence structure of the eastern U.S. wheat powdery mildew population. *Plant Disease* 92: 1074-1082.

Pietrusińska, A. 2009. Wprowadzanie do pszenicy ozimej genów odporności Lr41 na rdzę brunatną (*Puccinia recondita* f.sp. *tritici*) i Pm21 na mączniaka prawdziwego (*Blumeria graminis* f.sp. *tritici*). Konferencja naukowa: Nauka dla Hodowli Roślin Uprawnych, Zakopane, str. 55.

Temat badawczy 2. Uzyskane wyniki wykazały, że izolaty *B. graminis* charakteryzowały się zróżnicowanym stopniem wirulencji w stosunku do genów odporności obecnych w zestawie odmian i linii różnicujących. Wszystkie izolaty były awirulentne w stosunku do genów odporności *Pm29*, *Pm21*, *Pm36* oraz *Pm37* (stopień odporności linii z tymi genami oceniono w zakresie 0-2). W odniesieniu do genów *Pm3d+4b* (odmiana Kadett) wirulentne były tylko dwa izolaty. Pozostałe źródła odporności były podatne na większość izolatów i charakteryzowały się mniejszą odpornością na populację *B. graminis* lub były całkowicie przez nią porażane, jak np. Avalon Pm2, Kormoran Pm5, Pm6, Transec Pm7, Maris Pm2+6, Boxer Pm4b+5 – odmiany całkowicie porażane przez 52 izolaty, w tym również nowe źródła odporności: linia Pm38(Lr34) oraz linia Pm39(Lr46). Mniejszą odpornością charakteryzowały się odmiany/linie tj.: Chul Pm3b – porażana przez 11 izolatów, linia Pm34 – porażana przez 7 izolatów, oraz linia Pm35 – porażana przez 27 izolaty *B. graminis*.

Podsumowując, można stwierdzić, że populacja *Blumeria graminis* f. sp. *tritici* występująca na pszenicy w Polsce, charakteryzuje się szerokim spektrum patogeniczności. Większość izolatów reprezentujących tę populację w Polsce jest wirulentnych w stosunku do większości genów/źródeł odporności, powszechnie wykorzystywanych w genetyce odpornościowej. Dlatego, konieczne jest poszukiwanie nowych źródeł odporności, których źródłem mogą być formy oddalone, lub też nawet dzikie. Nowe kombinacje genów odporności, wprowadzane do najlepszych odmian i rodów hodowlanych na drodze krzyżowań, mogą przyczynić się do spowolnienia procesu przełamывania odporności odmian na porażenie grzybem *Blumeria graminis* f. sp. *tritici* (McDonald i Linde 2002; Pietrusińska i in. 2011, 2013).

Literatura do tematu badawczego 2:

Mains E. B., Dietz S. M. 1930. Physiologic forms of barley mildew, *Erysiphe graminis hordei* Marchal. *Phytopathol.* 20: 229-239.

Czembor, H.J. 2008. Odporność na mączniaka prawdziwego (*Blumeria graminis* f.sp. *hordei*) odmian jęczmienia włączonych do badań rejestrowych w Polsce w latach 2004-2006. *Biuletyn Instytutu Hodowli i Aklimatyzacji Roślin* 248: 33-42.

McDonald B., Linde C. 2002. Pathogen population genetics, evolutionary potential, and durable resistance. *Annual Review of Phytopathology* 40: 349-379.

Pietrusińska A., Czembor J.H., Czembor P.Cz. 2011. Pyramiding of two resistance genes for leaf rust and powdery mildew resistance in common wheat. *Cereal Research Communications*. 39(4): 577-588.

Pietrusińska A., Czembor P.Cz., Czembor J.H. 2013. Lr39 + Pm21: a new effective combination of resistance genes for leaf rust and powdery mildew in wheat. *Czech J. Genet. Plant Breed.* 49: 109-115.

Temat badawczy 3. Na podstawie przeprowadzonych badań, wyselekcjonowano linie pszenic o wysokiej odporności na mączniaka prawdziwego, rdzę i inne choroby oraz o korzystnych cechach agronomicznych. Łącznie obserwowano 380 roślin z populacji mieszańcowych BIO, z czego wyselekcjonowano do dalszych badań 94 linie.

Ponadto, jesienią 2014 roku, zostały założone dwa doświadczenia, wykonywane przez dwie stacje hodowlane: Hodowlę Roślin Smolice oraz Hodowlę Roślin Strzelce.

Podsumowując, można stwierdzić, że poszukiwanie źródeł odporności na rdzę brunatną oraz na mączniaka prawdziwego w oparciu o markery molekularne oraz o oceny fenotypowe w warunkach kontrolowanych jest efektywne i pozwala uzyskać postęp genetyczny dla tych cech. Uzyskane materiały powinny być charakteryzowane wielośrodowiskowo, ze względu na złożoność interakcji pomiędzy patogenem a gospodarzem. Jest to konieczne m. in. ze względu, na występowanie różnych ras populacji *B. graminis* oraz *P. recondita*.

Wnioski:

Temat badawczy 1

- Na podstawie przeprowadzonych badań, wyselekcjonowano rośliny o różnym tle genetycznym (różni rodzice wypierający) oraz o odmiennych profilach (segmentach) odpornościowych, tj.: (Lr41+Pm21+Lr47+Lr47), (Lr41+Pm21+Pm37+Pm37+Pm37), (Lr41+Pm21+Pm37+Pm37+Lr47).

Temat badawczy 2.

- Populacja *Blumeria graminis* f. sp. *tritici* występująca na pszenicy w Polsce charakteryzuje się szerokim spektrum patogeniczności i większość izolatów było wirulentnych w stosunku do znanych genów/źródeł odporności.
- Wszystkie izolaty *Blumeria graminis* f.sp. *tritici* były awirulentne w stosunku do genów odporności *Pm21*, *Pm29*, *Pm36*, *Pm37*. Geny te powinny być wprowadzane do odmian współcześnie uprawianych, lub być wykorzystywane w nowych programach hodowlanych.
- Nowe źródła odporności: *Pm38(Lr34)* oraz linia *Pm39(Lr46)* były podatne w stosunku do izolatów *B. graminis* występujących na terenie Polski.

Temat badawczy 3.

- Uzyskano postęp genetyczny dla stopnia odporności na rdzę brunatną i mączniaka prawdziwego (do dalszych badań, wyselekcjonowano łącznie 94 linii).
- Na podstawie kilkuletnich obserwacji, zostanie wyselekcjonowany materiał roślinny o spiramidyzowanym profilu genetycznym pod względem stopnia odporności na rdzę brunatną i mączniaka prawdziwego, co potwierdza ważność selekcji opartej o markery molekularne.