

STRESZCZENIE

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

Lp. w zał do Rozporządzenia MRiRW: 27.

1. Tytuł zadania: **Współdziałanie odporności na mączniaka (*Blumeria graminis* f.sp. *hordei*) warunkowanej genem mlo z wartością cech gospodarczych jęczmienia ozimego**
2. Kierownik zadania: **prof. dr hab. Jerzy H. Czembor**
3. **Tematy badawcze**

3.1 Temat badawczy 1

Cel tematu badawczego - Wybór pojedynków z genem mlo, na podstawie wyników ocen fenotypowych i analiz molekularnych, należących do pokoleń F_2BC_1 uzyskanych w 2014 roku oraz ich jarowizowanie w warunkach fitotronowych.

Materialy i metody

Material roślinny

Do badań wykorzystano 299 siewek należących do 4 populacji mieszańcowych Mlomlo pokoleń F_2BC_1 jęczmienia ozimego, w genomie których na podstawie oceny fenotypowej stopnia odporności na *B. graminis* f.sp. *hordei* oraz na podstawie analiz molekularnych markerem HVMlo stwierdzono obecność genu mlo prowadzonych w 2014 roku (populacje uzyskano na drodze krzyżowań prostych a następnie wstecznych; uzyskując pokolenia F_1 na drodze krzyżowań prostych jedna z form rodzicielskich była donorem genu mlo – forma sześciorzędowa BKH 735 i była ona przekrzyżowana z odmianami Souleyka i Titus oraz forma jęczmienia dwurzędowego Linia 42, która była przekrzyżowana z odmianami SU Vereni oraz Metaxa; następnie prowadzono krzyżowania wsteczne w zależności od populacji z odmianami Souleyka i Titus lub SU Vereni i Metaxa).

Lista populacji mieszańcowych pokoleń F_2BC_1 jęczmienia ozimego oraz liczba roślin w obrębie każdej populacji uzyskanych w 2014 roku i włączonych do badań w 2015 roku:

- 6-rzędowe: (BKH 735 x Souleyka) x Souleyka – 118 roślin,
(BKH 735 x Titus) x Titus – 73 roślin,
- 2-rzędowe: (linia 42 x SU Vireni) x SU Vireni – 58 roślin,
(linia 42 x Metaxa) x Metaxa – 50 roślin.

Jarowizację siewek pokoleń F_2BC_1 prowadzono w multiplatach wstawionych do chłodni w grudniu 2014 roku. W 2015 roku siewki po 35 dniowej jarowizacji doprowadzono do dojrzałości wczesnowoskowej w warunkach szklarniowych. Zebrane nasiona dosuszone przez 3 dni w temperaturze 35°C i po 7 dniowym sezonowaniu w temperaturze pokojowej wysiano do multiplatów i poddano jarowizacji w fitotronie (chłodni) – łącznie 593 siewek dla 4 populacji oraz 6 siewek form rodzicielskich i roślin wzorcowych w tym:

- 6-rzędowe: (BKH 735 x Souleyka) x Souleyka – 80 roślin,
(BKH 735 x Titus) x Titus – 143 roślin,
- 2-rzędowe: (linia 42 x SU Vireni) x SU Vireni – 170 roślin,
(linia 42 x Metaxa) x Metaxa – 200 roślin.

Siewki pokoleń F₂BC₁ po 35 dniowej jarowizacji przeniesiono do fitotronu w celu przeprowadzenia oceny molekularnej i fenotypowej na obecność genu mlo. W fitotronie w okresie krzewienia roślin utrzymywano temperatury 19°C dzień, 15°C noc i doświetlanie dzienne 16h. Od początku strzelania w źdźbło do zbioru zmieniono warunki wzrostu i rozwoju badanych roślin, odpowiednio na: temperaturę 25°C dzień i 19°C noc i doświetlanie dzienne 18h.

Ocena fenotypowa stopnia odporności populacji mieszańcowych Mlomlo F₂BC₁ na B. graminis f.sp. hordei.

Do oceny fenotypowej stopnia odporności form rodzicielskich i populacji mieszańcowych na porażenie przez *B. graminis* f.sp. *hordei* został wykorzystany izolat Bgh 27. Podstawą do wyboru tego izolatu był fakt, że jest on wirulentny w stosunku do odmian włączonych do krzyżowań, natomiast awirulentny w stosunku do wprowadzanego genu mlo. Doświadczenie fitopatologiczne (ocena fenotypowa stopnia odporności roślin na patogena) prowadzone było w warunkach kontrolowanych, przy fotoperiodzie 16h światła i 8h ciemności oraz w temperaturze w zakresie 16-22°C. Siewki testowanych roślin uprawiano w warunkach sztucznego doświetlania (długość dnia 16h) przy temperaturach w granicach 16–22°C. Inokulację siewek dokonywano przez strząsanie nad nimi zarodników konidialnych z roślin porażonych wybranym izolatem. Po 8–10 dniach od inokulacji oceniano reakcję roślin w pięciostopniowej skali Mainsa i Dietza (1930) uzupełnionej o stopień 0(4) charakteryzujący reakcję odpornościową roślin z genem mlo. Rośliny o reakcji 0 – 2 klasyfikowano jako odporne, 3 – 4 jako podatne, a 0(4) jako efekt obecności genu mlo.

Jako wzorców użyto odmiany/linie jęczmienia o profilu mlo (kontrola pozytywna, wzorzec odporności) oraz o profilu Mlo - bez genu mlo (kontrola negatywna, wzorzec podatności).

Selekcja molekularna populacji mieszańcowych Mlomlo F₂BC₁.

W celu określenia występowania genu mlo w selekcyonowanym materiale roślinnym zostały wykorzystane dwa markery mikrosatelitarne (SSR): HVML01A oraz HVML03 (Bilgic i in., 2006, <http://wheat.pw.usda.gov/cgi-bin/graingenes/report.cgi?class=marker&name=HVMLOH1A>, dane niepublikowane).

W zależności od zastosowanych markerów (HVMlo1, HVMlo3) wykorzystywanych do selekcji genu mlo, DNA izolowano dwoma różnymi metodami. Pierwsza metoda ekstrakcji DNA przeprowadzana była za pomocą buforu TPS. Otrzymany tą metodą ekstrakt wykorzystany był w reakcji amplifikacji dla markera HVMlo3. Druga metoda izolacji przeprowadzana była przy użyciu gotowego zestawu DNeasy Plant Mini Kit (QIAGEN) i była wykorzystana podczas amplifikacji markera HVMlo1. Podział na dwie różne metody izolacji DNA wynikał z faktu, że zastosowane systemy markerowe charakteryzują się różnymi profilami reakcji PCR związanymi z ilością (ng) oraz czystością DNA wymaganą podczas reakcji amplifikacji (Higgins i in. 2000, Bilgic i in. 2006).

Do ekstrakcji DNA za pomocą buforu TPS (100 mM Tris-HCl pH 8.0; 1 M KCl, 10 mM EDTA) wykorzystano metodykę opracowaną i opisana przez Higgins i zespół (Higgins i in., 2000) z drobnymi modyfikacjami. Z każdego obiektu roślinnego pobrano 150 mg dwutygodniowej tkanki roślinnej. Pocięty materiał roślinny następnie umieszczono w 2 ml próbówce uzupełnionej 1 ml buforu ekstrakcyjnego TPS. Całość wirowano przez 2 min. przy 12tys. obr./min. i następnie zhomogenizowano przy użyciu młynka miksującego MM301 (Retsch, Verder, Katowice, Polska) i częstotliwości wytrząsania 30 tys./min. w dwóch cyklach pięciominutowych. Po zakończeniu tego etapu izolacji procedura przebiegała według procedury opisanej przez Higginsa i zespół. Otrzymany supernatant rozcieńczono w dH₂O w stosunku 1:25 (supernatant : woda).

Metodyka izolacji DNA za pomocą zestawu DNeasy Plant Mini Kit przebiegała zgodnie z procedurą załączoną do zestawu z drobnymi modyfikacjami. Z każdego obiektu roślinnego została pobrana dwutygodniowa tkanka roślinna (200 mg). Następnie pocięty materiał roślinny został umieszczony w próbówce uzupełnionej 750µl buforu AP1 oraz 4µl RNasy, a następnie zhomogenizowana przy użyciu młynka miksującego MM301 (Retsch, Verder, Katowice, Polska) i częstotliwości wytrząsania 30 tys./min. w dwóch cyklach pięciominutowych. Po zakończeniu tego

etapu izolacji procedura przebiegała według procedury załączonej przez producenta zestawu QIAGEN.

W selekcyonowanym materiale roślinnym zostały wykorzystane dwa markery mikrosatelitarne (SSR): HVML01A oraz HVML03 (Bilgic i in., 2006, <http://wheat.pw.usda.gov/cgi-bin/graingenes/report.cgi?class=marker&name=HVML01A>, dane niepublikowane). Ponadto w każdej parze starterów jeden ze starterów na końcu 5' wyznakowany był barwnikiem fluorescencyjnym ABI (TET – zielony). Reakcja łańcuchowej polimerazy DNA przeprowadzana była przy wykorzystaniu płytek – bloków 96-ścio dołkowych. Powielanie fragmentów odbywało się w termocyklerze Mastercycler ep. Reakcja powielania została przeprowadzona w objętości 8 µl, w skład której wchodziły następujące komponenty: 3 µl DNA, 1 x bufor (MBI Fermentas, Litwa), 2,5 mM MgCl₂, 0,2 mM dNTPs, 0,5 µM startera i 1 jednostka polimerazy Taq (MBI Fermentas, Litwa). W zależności od temperatury przyklejania się starterów do matrycy zastosowano dwa profile termiczne reakcji PCR. Dla markera HVML01 warunki amplifikacji przebiegały według następującego profilu: 94°C/2min. denaturacji występniej, 10 cykli składających się z: 94°C/30 sek., 55°C/30 sek., 72°C/1 min., a także 30 cykli 90°C/30 sek., 55°C/30 sek., 72°C/1 min. Dla markera HVML03 profil reakcji PCR różnił się jedynie temperaturą hybrydyzacji, która wynosiła 55°C/30 sek. W ostatnim cyklu reakcji amplifikacji etap elongacji został wydłużony do 5 min.

Produkty PCR przed naniesieniem na żel poliakrylamidowy (Cambrex Bio Science Rockland, USA) zostały zdenaturowane w termocyklerze w obecności formamidu (Sigma-Aldrich, Polska) z temperaturą grzewczą ustawioną na 105°C i temperaturą bloku 95°C przez 3 min.

Rozdział produktów amplifikacji PCR został przeprowadzony na sekwenatorze DNA ABI 377XL (Applied Biosystems, USA) na 4,75% denaturującym żelu poliakrylamidowym. Rozdział elektroforetyczny przeprowadzony został w buforze 1 × TBE (0,1 M Tris, 90 mM H₃BO₃, 9 mM EDTA). Czas rozdziału produktów na żelu wynosił 2,5 godziny.

Wyniki

Łącznie badano 593 siewki roślin F₂BC₁ czterech populacji mieszańcowych jęczmienia ozimego oraz 6 form rodzicielskich i wzorcowych. W każdej z populacji jedna z form rodzicielskich była donorem genu mlo (forma sześciorzędowa to BKH 735 oraz forma jęczmienia dwurzędowego Linia 42). Wyniki ocen fenotypowych i analiz molekularnych prowadzonych z wykorzystaniem markerów HVML01 i HVML03 przedstawiono w tabelach 1, 2, 3, 4 i 5. Obecność genu mlo stwierdzono w tle genetycznym 369 roślin.

1. Populacja jęczmienia 6-rzędowego: (BKH 735 x Souleyka) x Souleyka

Badano 80 roślin – dla wszystkich 80 stwierdzono obecność genu mlo (wyniki analiz molekularnych markerem HVML03 korespondowały z wynikiem testu fitopatologicznego; analizy markerem HVML01 nie wspomagały selekcji ponieważ uzyskane profile genetyczne roślin w stosunku do rodziców były nie polimorficzne). Wyniki przedstawiono w Tabeli 1.

2. Populacja jęczmienia 6-rzędowego: (BKH 735 x Titus) x Titus

Badano 143 rośliny – dla 52 stwierdzono obecność genu mlo (Tabela 2). Wprawdzie marker HVML01 był znacznie mniej efektywny ponieważ uzyskane profile genetyczne roślin w stosunku do rodziców były nie polimorficzne, to umożliwił on potwierdzenie obecności genu mlo w genomie 5 roślin (co było również potwierdzone w teście fitopatologicznym), dla których marker HVML03 obecności genu mlo nie wykazał. Dodatkowo na podstawie wyników analiz molekularnych markerem HVML03 stwierdzono występowanie 12 roślin o niezidentyfikowanym profilu (oznaczane w tabeli 1 jako „u”) oraz 1 rośliny o profilu heterogenicznym.

3. Populacja jęczmienia 2-rzędowego: (linia 42 x SU Vireni) x SU Vireni

Badano 170 rośliny – dla 107 stwierdzono obecność genu mlo (Tabela 3) w tym prowadząc analizy z wykorzystaniem markera HVML03 w genomie 79 roślin (co potwierdzono testem fitopatologicznym), a pozostałe włączając do analiz również marker HVML01 (co było również

potwierdzone w teście fitopatologicznym), dla których na podstawie analiz markerem HVMlo3 obecności genu mlo nie wykazano, lub które włączono do grupy roślin o niezidentyfikowanym profilu (oznaczane w tabeli 1 jako „u”) lub grupy o profilu heterogenicznym.

4. Populacja jęczmienia 2-rzędowego: (linia 42 x Metaxa) x Metaxa

Badano 200 roślin – dla 130 roślin stwierdzono obecność genu mlo (Tabela 4) w tym: dla 100 roślin prowadząc analizy z wykorzystaniem markera HVMlo3 (co potwierdzono testem fitopatologicznym) a pozostałe włączając do analiz również marker HVMlo1 (co było również potwierdzone w teście fitopatologicznym), dla których na podstawie analiz markerem HVMlo3 obecności genu mlo nie wykazano, lub które włączono do grupy roślin o niezidentyfikowanym profilu (oznaczane w tabeli 1 jako „u”) lub grupy o profilu heterogenicznym.

Podsumowując, łącznie dla 369 siewek stwierdzono obecność genu mlo. W obrębie każdej z populacji proporcje występowania roślin podatnych i odpornych były różne:

- populacja (Souleyka x BKH 735) x Souleyka: 80 roślin z genem mlo na 80 roślin badanych,
- populacja (Titus x BKH 735) x Titus: 52 rośliny z genem mlo na 143 rośliny badane,
- populacja (linia 42 x SU Vireni) x SU Vireni: 107 roślin z genem mlo na 170 roślin badanych,
- populacja (linia 42 x Metaxa) x Metaxa: 130 roślin z genem mlo na 200 roślin badanych.

Rośliny, w genomie których stwierdzono obecność genu mlo zostały włączone do badań w ramach tematu badawczego 2 (rozmnożenie w warunkach polowych).

Wnioski

1. Testy fitopatologiczne stanowią niezbędną część doświadczalną podczas selekcji wspomaganą markerami molekularnymi.
2. Analizy molekularne mające na celu wykazanie obecności genu mlo należy prowadzić z wykorzystaniem dwóch markerów HVMlo1 oraz HVMlo3. Marker HVMlo1 okazał się mniej efektywny dla populacji F_2BC_1 ponieważ często uzyskane profile genetyczne roślin w stosunku do rodziców były nie polimorficzne, to umożliwił on potwierdzenie obecności genu mlo w genomie roślin, dla których na podstawie analiz markerem HVMlo3 obecności tego genu nie wykazano, lub które włączono do grupy roślin o niezidentyfikowanym profilu lub grupy o profilu heterogenicznym a testy fitopatologiczne również potwierdzały jego obecność.
3. W pokoleniach F_2BC_1 jęczmienia ozimego, których jedną z form rodzicielskich jest genotyp z genem mlo, proporcje występowania roślin podatnych i odpornych są różne.
4. Obecność genu mlo w populacjach F_2BC_1 odmian o wysokiej wartości gospodarczej umożliwi dalsze prace nad możliwością wprowadzenia genu mlo do form ozimych jęczmienia.

3.2 Temat badawczy 2

Cel tematu badawczego - *Rozmnożenie zjarowizowanych roślin z genem mlo należących do pokoleń F_2BC_1 w szkółce polowej i uzyskanie linii pokoleń F_3BC_1 .*

Materiały i metody

Rośliny 4 populacji mieszańcowych F_2BC_1 , dla których stwierdzono obecność genu mlo (na podstawie wyników testu fitopatologicznego i analiz molekularnych) w ramach tematu badawczego 1, doprowadzono w warunkach szklarniowych do dojrzałości wczesnowoskowej. Z poszczególnych roślin zebrano kłosa o nasionach w stadium dojrzałości wczesnowoskowej. Po wysuszeniu i wysezonowaniu nasion jak w temacie badawczym 1, wysiano je punktowo w multiplaty ogrodnicze. Wysiane materiały jarowizowano przez 40 dni w komorze fitotronowej, w stałej temperaturze ok. 4°C i 8 godzinnym dziennym oświetleniu. Do rozmnożenia włączono wszystkie uzyskane rośliny z genem mlo (369) – po zjarowizowaniu wysadzono je punktowo w szkółce polowej w rozstawie 2 x 0,20 x

0,10 m. W szkółce polowej prowadzono standardowe zbiegi agrotechniczne: odchwaszczanie herbicydem, nawożenie pogłównie azotem.

Dodatkowo, w okresie wegetacji oceniono linie pod względem ważniejszych cech świadczących o ich przydatności do dalszych badań, tj., zdrowotności, wyrównania, potencjalnej plenności.

Wyniki

Liczebność wysadzonych roślin podano w tabeli 5. Łącznie rozmnożono 369 roślin pokolenia F_2BC_1 o genomie Mlomlo w tym:

- 6-rzędowe: (BKH 735 x Souleyka) x Souleyka – 80 roślin,
(BKH 735 x Titus) x Titus – 52 roślin,
- 2-rzędowe: (linia 42 x SU Vireni) x SU Vireni – 107 roślin,
(linia 42 x Metaxa) x Metaxa – 130 roślin.

Po wstępnej ocenie agronomicznej (m.in. plenność) do zbioru wytypowano po 50 roślin dla każdej populacji F_2BC_1 . Następnie kłosa zostały zebrane w fazie dojrzałości pełnej, osobno z każdej rośliny, a następnie wymłócone ręcznie. Uzyskano 200 linii pokoleń F_3BC_1 .

Naliczono próby ziarna pokolenia F_3BC_1 do założenia doświadczeń wielośrodowiskowych w ramach Tematu badawczego 3, po 60 ziarniaków każdej linii do trzech miejscowości. Próby ziarna reszt pojedynkowych (rezerwy) zostały włączone do analiz molekularnych i testu fitopatologicznego na obecność genu mlo w ramach Tematu badawczego 4.

Wnioski

1. Uzyskanie linii pokoleń F_3BC_1 po rozmnożeniu roślin form F_2BC_1 , dla których stwierdzono obecność genu mlo jest ważnym etapem dalszych prac mających na celu określenie możliwości wprowadzenia genu mlo z form jarych i do plennych form ozimych.

3.3 Temat badawczy 3

Cel tematu badawczego - *Wielośrodowiskowa ocena odporności lini należących do pokoleń F_3BC_1 na ważne gospodarczo choroby przy naturalnej infekcji przez patogeny.*

Materiały i metody

Do badań w trzech różnych środowiskach wykorzystano 200 linii F_3BC_1 , wybranych po 50 z każdej z 4 kombinacji mieszańcowych uzyskanych w temacie 2 oraz odpowiednio odmiany rodzicielskie: Souleyka, Titus, SU Vireni, Metaxa oraz BKH 735 i linia 42 jako wzorce.

Wyniki

W trzech miejscowościach założono jednopowtórzeniowe doświadczenia z 200 liniami F_3BC_1 na poletkach jednorzędowych, punktowo z odmianami wzorcowymi na przemian co 10 poletko, odpowiednio dla kombinacji 6-rzędowych: Souleyka i Titus a dla 2-rzędowych Metaxa i SU Vireni oraz linii BKH735 i linii 42, dawców genu mlo. Wschody były dobre, a ocena odporności linii na stresy biotyczne (ważne gospodarczo choroby przy infekcji naturalnej) oraz abiotyczne (zimotrwałość) prowadzona będzie w roku 2016.

Wnioski

1. Wschody roślin linii pokoleń F_3BC_1 w warunkach polowych w 3 lokalizacjach były zadawalające co warunkuje możliwość kontynuowania prac nad możliwością uzyskania plennych form jęczmienia ozimego, których odporność na mączniaka będzie uwarunkowana genem mlo i ocenę tych linii wielośrodowiskowo.

3.4 Temat badawczy 4

Cel tematu badawczego - *Określenie na resztkach pojedynkowych obecności genu mlo w genomie linii F₃BC₁ wysianych w doświadczeniach polowych na podstawie wyników ocen fenotypowych i analiz molekularnych. Jarowizowanie w warunkach fitotronowych siewek o genotypie mlo/mlo jako materiału do selekcji w warunkach polowych w roku 2016.*

Materiały i metody

Do badań wykorzystano próby ziarna resztek pojedynkowych (rezerwy) 200 linii 4 populacji mieszańcowych jęczmienia ozimego F₃BC₁ oraz 6 form rodzicielskich wysianych do badań wielośrodowiskowych w doświadczeniach polowych w trzech lokalizacjach.

W multiplatach wysiano po 10 nasion dla każdej z 200 linii F₃BC₁ (łącznie uzyskano 2000 roślin). Dodatkowo wysiano nasiona sześciu form rodzicielskich. W stadium siewki pobrano próbki liści z 5 roślin łącznie z każdej linii do analiz molekularnych i fenotypowych (czyli pobierano 2 próby z każdej linii i łącznie prowadzono analizy dla 1000 prób). Analizy molekularne i test fitopatologiczny prowadzono zgodnie z opisem w temacie badawczym 1.

Wyniki

Wyniki analiz molekularnych i ocen fenotypowych 1000 sublinii uzyskanych z 200 linii należących do czterech kombinacji F₃BC₁ włączonych do doświadczeń wielośrodowiskowych w 3 lokalizacjach.

1. Populacja jęczmienia 6-rzędowego: (BKH 735 x Souleyka) x Souleyka

Badano 250 sublinii (Tabela 6) – dla 212 sublinii stwierdzono obecność genu mlo (reakcja w teście fitopatologicznym oceniona na 0(4) i potwierdzone przynajmniej jednym z markerów molekularnych). Pozostałe były podatne (ocena 4 i potwierdzone molekularnie).

2. Populacja jęczmienia 6-rzędowego: (BKH 735 x Titus) x Titus

Badano 250 sublinii (Tabela 7) – dla 193 stwierdzono obecność genu mlo (potwierdzone w teście fitopatologicznym i molekularnie). Pozostałe były podatne.

3. Populacja jęczmienia 2-rzędowego: (linia 42 x SU Vireni) x SU Vireni –

Badano 250 sublinii (Tabela 8) – dla 223 sublinii stwierdzono obecność genu mlo (potwierdzone w teście fitopatologicznym i molekularnie). Pozostałe były podatne.

4. Populacja jęczmienia 2-rzędowego: (linia 42 x Metaxa) x Metaxa

Badano 250 sublinii (Tabela 9) - dla 239 sublinii stwierdzono obecność genu mlo (potwierdzone w teście fitopatologicznym i molekularnie). Pozostałe były podatne.

Wyniki analiz molekularnych i testu fitopatologicznego przedstawiono również w Tabeli 9.

Wnioski

1. Ocena fenotypowa i molekularna sublinii jest przydatną metodą kontroli wybranych linii F₃BC₁ pod względem wprowadzania i utrzymania odporności na mączniaka typu Mlo.
2. Obecność genu mlo w populacjach F₃BC₁ odmian o wysokiej wartości gospodarczej umożliwi dalsze prace nad możliwością wprowadzenia genu mlo do form ozimych jęczmienia.