

Lp. w zał. do Rozporządzenia MRiRW: 27.

Tytuł zadania: **Współdziałanie odporności na mączniaka (*Blumeria graminis* f.sp. *hordei*) warunkowanej genem *mlo* z wartością cech gospodarczych jęczmienia ozimego.**

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

Cel zadania:

1. Wytworzenie 4 populacji mieszańcowych F₁ Mlomlo. Dwie formy wielorzędowe i dwie dwurzędowe.
2. Wytworzenie 4 populacji mieszańcowych F₁BC₁, ocena molekularna na obecność genu *mlo*.

Materiały i metody:

Temat badawczy 1

Do wytworzenia populacji mieszańcowych F₁ Mlomlo wykorzystano linie jęczmienia ozimego wielorzędowego BKH 735 i dwurzędowego linia 42, które mają gen *mlo* odporności na mączniaka (*B. graminis* f.sp. *hordei*) – (odmiany jęczmienia jarego jako rodzice P₁). Komponentami o wysokiej wartości innych cech gospodarczych były odmiany ozime: wielorzędowe Souleyka i Titus; dwurzędowe SU Vireni i Metaxa (jako rodzice P₂). Jarowizację i krzyżowania przeprowadzono w warunkach kontrolowanych – fitotron z regulacją temperatury, oświetlenia i wilgotności powietrza.

Do krzyżowań wykorzystano rośliny komponentów rodzicielskich z zasiewu jesiennego po 35 dniowej jarowizacji w szklarni (wrzesień 2013r.) Krzyżowania wykonano na początku stycznia 2014r. Nasiona F₁ zebrano w fazie wczesnowoskowej, dosuszono przez 3 dni w temperaturze 35⁰C, wysezonowano przez 7 dni w temperaturze pokojowej. Siewki F₁ po 35 dniowej jarowizacji przeniesiono do fitotronu, w okresie krzewienia utrzymywano temperatury 19⁰C dzień, 15⁰C noc. Doświetlanie dzienne 16h. Od początku strzelania w źdźbło do zbioru zmieniono warunki wzrostu i rozwoju odpowiednio na: temperaturę 25⁰C dzień i 19⁰C noc i doświetlanie dzienne 18h.

Temat badawczy 2

Do wytworzenia populacji mieszańcowych F₁BC₁ wykorzystano rośliny 4 populacji mieszańcowych F₁ uzyskanych w zadaniu 1. Rośliny F₁ przekrzyżowano odpowiednio odmianami: Souleyka, Titus, SU Vireni i Metaxa. W poszczególnych kombinacjach uzyskano:

6-rzędowe: (BKH 735 x Souleyka) x Souleyka – 33 nasiona,
(BKH 735 x Titus) x Titus – 27 nasion,

2-rzędowe: (linia 42 x SU Vireni) x SU Vireni – 34 nasiona,
(linia 42 x Metaxa) x Metaxa – 31 nasion.

Uzyskane w wyniku krzyżowania ziarniaki F₁BC₁ zebrano w fazie wczesnowoskowej, suszono przez 3 dni w temperaturze 35⁰C i po 7 dniowym sezonowaniu w temperaturze pokojowej wysiano w fitotronie do jarowizacji. Po 35 dniach jarowizowane siewki przeniesiono do fitotronu w celu uzyskania nasion pokolenia F₂BC₁ do analiz molekularnych. Z poszczególnych roślin zebrano kłosa o nasionach w stadium dojrzałości wczesnowoskowej. Po wysuszeniu i wysezonowaniu jak w zadaniu 1, wysiano punktowo (multiplaty ogrodnicze):

6-rzędowe: (BKH 735 x Souleyka) x Souleyka – 160 nasiona,
(BKH 735 x Titus) x Titus – 96 nasion,

2-rzędowe: (linia 42 x SU Vireni) x SU Vireni – 80 nasion,
(linia 42 x Metaxa) x Metaxa – 72 nasiona,

formy rodzicielskie:

BKH 735, Souleyka, Titus, SU Vireni, Metaxa, linia 42.

Na materiale roślinnym przeprowadzono selekcję fenotypową oraz ocenę molekularną na obecność genu *mlo*.

Do oceny fenotypowej stopnia odporności form rodzicielskich i populacji mieszańcowych na porażenie przez *B. graminis* f.sp. *horedi* został wykorzystany izolat Bgh 27. Podstawą 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 prowadzone było w warunkach kontrolowanych, przy fotoperiodzie 16 godz. światła i 8 godz. ciemności oraz

w temperaturze w zakresie 16-22°C. Po upływie 8-10 dni od zakażenia, została oceniona reakcja odpornościowa roślin. Do oceny wykorzystano skalę, w której 0(4) = rośliny odporne na *B. graminis f.sp. hordei*, 4 = rośliny podatne na *B. graminis f.sp. hordei*. Wzorce stanowiły odmiany/linie jęczmienia o profilu *mlo* (kontrola pozytywna, wzorzec odporności) oraz o profilu bez *mlo* (kontrola negatywna, wzorzec podatności).

W zależności od zastosowanych markerów (HVMlo1, HVMlo3), wykorzystywanych do selekcji genu *mlo*, DNA wyizolowano 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, wynikała z faktu, iż zastosowane systemy markerowe, charakteryzują się różnymi profilami reakcji PCR, związanymi z ilością (ng) oraz czystością DNA, wymaganą podczas reakcji amplifikacji.

W zależności od temperatury przyklejania się starterów do matrycy zastosowano dwa profile termiczne reakcji PCR. Dla markera HVMlo1 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 HVMlo3 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 elektorforetyczny 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.

Selekcja fenotypowa:

Selekcja fenotypowa została przeprowadzona łącznie na 408 roślinach pochodzących z czterech populacji mieszańcowych. Reakcję odporności oznaczanej w tabeli nr 1 jako 0(4) zaobserwowano u 347 roślin, natomiast reakcję podatności oznaczanej jako 4 zaobserwowano u 61 roślin. Wszystkie rośliny poddano selekcji molekularnej na obecność genu *Mlo*.

Selekcja molekularna:

Ocenie molekularnej markerem HVMlo, na obecność genu *Mlo*, poddano cztery populacje mieszańcowe.

6-rzędowe: (BKH 735 x Souleyka) x Souleyka
(BKH 735 x Titus) x Titus

2-rzędowe: (linia 42 x SU Vireni) x SU Vireni
(linia 42 x Metaxa) x Metaxa

Wybrane siewki pokolenia F₂BC₁ z genem *mlo* umieszczono w fitotronie-chłodni celem przeprowadzenia jarowizacji. Po jarowizacji, dalsza uprawa do uzyskania następnego pokolenia prowadzona będzie w warunkach szklarniowych.

Wyniki:

Temat badawczy 1

Uzyskano 4 populacje mieszańcowe F₁:

6-rzędowe: BKH 735 x Souleyka – 32 nasiona,
BKH 735 x Titus – 37 nasion

2-rzędowe: linia 42 x SU Vireni - 41
linia 42 x Metaxa - 35

Wyprowadzono w uprawie fitotronowej rośliny mieszańcowe F₁ do krzyżowania wstecznego.

Temat badawczy 2

Uzyskano 4 populacje mieszańcowe F₁BC₁. W poszczególnych kombinacjach uzyskano:

6-rzędowe: (BKH 735 x Souleyka) x Souleyka – 33 nasiona,
(BKH 735 x Titus) x Titus – 27 nasion

2-rzędowe: (linia 42 x SU Viern) x SU Viren - 34
(linia 42 x Metaxa) x Metaxa – 31

Uzyskano siewki pokolenia F_2BC_1 do analiz molekularnych:

- 6-rzędowe: (BKH 735 x Souleyka) x Souleyka – 160 siewek,
(BKH 735 x Titus) x Titus – 96 siewek,
2-rzędowe: (linia 42 x SU Vireni) x SU Vireni – 80 siewek
(linia 42 x Metaxa) x Metaxa – 72 siewki.

W ocenie molekularnej markerem HVMlo stwierdzono obecność genu *mlo* odpowiednio:

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

Wybrane siewki pokolenia F_2BC_1 z genem *mlo* umieszczono w fitotronie-chłodni celem przeprowadzenia jarowizacji. Po jarowizacji dalsza uprawa do uzyskania następnego pokolenia prowadzona będzie w warunkach szklarniowych.