

**EDYTA PACZOS-GRZĘDA**

**SYLWIA SOWA**

**ANETA KOROLUK**

**JOANNA TOPOROWSKA**

**EWELINA MAREK**

Instytut Genetyki, Hodowli i Biotechnologii Roślin, Uniwersytet Przyrodniczy w Lublinie

Kierownik Tematu: dr Edyta Paczos-Grzęda Uniwersytet Przyrodniczy w Lublinie Instytut Genetyki,

Hodowli i Biotechnologii Roślin ul. Akademicka 15, 20-934 Lublin, (81) 4456884,

e-mail: edyta.paczos@up.lublin.pl

*Prace zostały wykonane w ramach badań podstawowych na rzecz postępu biologicznego w produkcji roślinnej na podstawie decyzji Ministra Rolnictwa i Rozwoju Wsi nr HOR.hn.802.9.2018, Zadanie 31.*

## Piramidyzacja genów odporności na rdzę koronową w genomie owsa oraz identyfikacja i lokalizacja markerów DNA dla tych genów

### **Crown rust resistance genes pyramiding in oat genome and identification of DNA markers for these genes**

**Słowa kluczowe:** geny odporności, markery molekularne, owies zwyczajny, piramidyzacja genów, *Puccinia coronata*, rdza koronowa

Rdza koronowa, jest jedną z najpowszechniej występujących chorób grzybowych owsa. Straty plonu wywołane porażeniem mogą sięgać nawet 50% (Martinelli i in., 1994). Czynnikiem infekcyjnym jest grzyb *Puccinia coronata* Cda. f.sp. *avenae* P. Syd. & Syd., który poraża głównie liście. Rozwojowi choroby sprzyjają wysoka temperatura, zwiększona wilgotność powietrza oraz nadmierne nawożenie azotowe (Simons, 1985). Szczególnie silne porażenie dotyczy odmian późnych i częściej ma miejsce przy opóźnionych siewach. Naturalna odporność roślin owsa warunkowana jest genami *Pc*. Monitorowanie zmian w populacji patogenu oraz sukcesywne prace nad określeniem efektywnych na obszarze Polski genów odporności na rdzę koronową umożliwiają naturalne jego zwalczanie poprzez wprowadzanie genów odporności do nowych odmian i eliminują konieczność stosowania fungicydów, co jest korzystne ze względów ekonomicznych i sprzyja ochronie środowiska naturalnego. Dotychczas w owsie

zidentyfikowano i opisano ponad 100 genów odporności na *Puccinia coronata* (Chong i Kolmer, 1993). Niektóre z tych genów zostały już przełamane, jednakże po piramidyzacji mogą one nadal kształtować wysoką odporność. Nieliczne z genów zostały zmapowane, dla niektórych opracowano również markery sprzężone z tymi genami (Gnanesh i in., 2014). Niestety ich wykorzystanie jest ograniczone z uwagi na dominującą naturę tych markerów (RAPD, AFLP i DArT) oraz brak możliwości konwersji w markery najnowszej generacji zapewniające wysoką przepustowość selekcji opartej na genotypie (Gnanesh i in., 2013). Niezmiernie istotne jest, aby dla poszczególnych genów *Pc* zidentyfikować i opracować silnie sprzężone markery molekularne, które umożliwiłyby monitorowanie przepływu genów i kumulację pożądaných alleli w mieszańcach.

Celem zadania było określenie patogeniczności izolatów *Puccinia coronata* zebranych w roku 2017, poszukiwanie markerów dla genu odporności *Pc51* metodą SRAP, próba konwersji markerów losowych SRAP dla genu *Pc60* na markery specyficzne, identyfikacja sekwencji DArTseq sprzężonych z obecnością genu *Pc60*, próba konwersji na markery specyficzne sekwencji DArTseq sprzężonych z obecnością genów *Pc52* oraz *Pc60* zidentyfikowanych na podstawie całogenomowych analiz polimorfizmu.

W zadaniu określono patogeniczność izolatów *Puccinia coronata* wyprowadzonych z populacji skolekcjonowanych w roku 2017 w Czesławicach, Kopaszewie, Polanowicach i Strzelcach względem zestawu 45 linii referencyjnych. Najsilniejsze izolaty, podobnie jak w latach poprzednich, wyprowadzono z populacji skolekcjonowanych w Polanowicach i Czesławicach. Pełną odporność w stadium siewki warunkowały geny *Pc50K*, *Pc51K*, *Pc51U*, *Pc52*, *Pc57*, *Pc59U*, *Pc68*, *Pc71* oraz *Pc91*, które nie zostały przełamane przez żaden z testowanych izolatów. W roku 2018 najsilniejsze porażenie grzybem *P. coronata* na poziomie ok. 80% w warunkach naturalnej infekcji polowej zaobserwowano w Strzelcach i Czesławicach. Pełną odporność w warunkach naturalnej infekcji polowej, w stadium rośliny dorosłej, nadawały geny *Pc51U*, *Pc52*, *Pc58U*, *Pc59K*, *Pc91* oraz *Pc94*. W przypadku genów *Pc52* oraz *Pc91* był to kolejny rok pełnej skuteczności tych genów na różnych etapach rozwoju rośliny oraz w różnych warunkach infekcji.

W ramach zadania przeprowadzono krzyżowania mające na celu uzyskanie mieszańców pomiędzy formami ze zdefiniowanymi genami odporności. W efekcie krzyżowań uzyskano kolejne mieszańce odporne na rdzę koronową posiadające kombinację genów *Pc39* i *Pc52* z czterema innymi genami: *Pc51U*, *Pc60*, *Pc70* i *Pc91*. Ocena cech plonotwórczych mieszańców dwugenowych pokolenia  $F_1$  (*Pc39* z czterema innymi genami: *Pc51*, *Pc52*, *Pc60* oraz *Pc70*) wskazuje na możliwość selekcji wśród nich form o korzystnym układzie alleli wpływających na cechy agronomiczne.

Przeprowadzono ocenę segregacji genów odporności w 4 populacjach mieszańców  $F_2$  z genami *Pc50K*, *Pc50U*, *Pc59K* i *Pc59U*. Wytypowano izolaty umożliwiające identyfikację tych genów w kolejnych pokoleniach mieszańców. Przeprowadzone obserwacje polowe porażenia wyżej wymienionych mieszańców umożliwiły identyfikację form odpornych i porażonych w tych populacjach w warunkach naturalnej infekcji

w stadium rośliny dorosłej, co umożliwi wytypowanie korespondującego izolatu do przeprowadzenia analiz w stadium siewki.

Zidentyfikowane na podstawie testów żywiciel-patogen homozygoty w populacji E635 (*Pc51U* × Kasztan) wykorzystano do poszukiwania markerów molekularnych dla genu odporności *Pc51U* metodą BSA. Przetestowano 500 kombinacji starterów SRAP, spośród których wstępnie wyselekcjonowano 27 inicjujących na próbach zbiorczych o przeciwstawnych fenotypach (odpornych/porażonych) syntezę produktów różnicujących. Amplifikacja z wytypowanymi starterami z wykorzystaniem jako matrycy DNA pojedynczych roślin nie potwierdziła specyficzności amplifikowanych z ich udziałem produktów względem określonego fenotypu warunkowanego allelem *Pc51* lub *pc51*.

Konwersji na markery specyficzne dla genu *Pc60* poddano 12 potencjalnych markerów SRAP zidentyfikowanych w roku poprzednim, spośród których tylko dwa identyfikowały rośliny odporne i porażone w populacji E660 segregującej pod względem odporności warunkowanej tym genem. Przeprowadzono identyfikację sekwencji DArTseq, których segregacja zgodna była z obecnością allelu dominującego genu *Pc60*. Do analiz wstępnie wytypowano 21 sekwencji. Konwersję przeprowadzono dla 5 sekwencji *silico*DArT specyficznych dla genu *Pc60* oraz dla 5 sekwencji wytypowanych w roku ubiegłym dla genu *Pc52*. Żadna z konwertowanych sekwencji zarówno w przypadku genu *Pc52*, jak i *Pc60* nie segregowała zgodnie z fenotypem badanych roślin.

#### WNIOSKI

1. Najsilniejsze izolaty *Puccinia coronata* wyprowadzono z populacji skolekcjonowanych w roku 2017 w Polanowicach i Czesławicach.
2. W roku 2018 najsilniejsze porażenie grzybem *P. coronata* w warunkach naturalnej infekcji polowej zaobserwowano w Strzelcach i Czesławicach.
3. Najbardziej efektywne w warunkach Polski w latach 2017–2018 były geny *Pc52* oraz *Pc91*.
4. Nie zidentyfikowano markerów SRAP specyficznych względem alleli *Pc51* lub *pc51*.
5. Skutecznej konwersji na markery specyficzne dla allelu dominującego genu *Pc60* poddano 2 markery zidentyfikowane metodą SRAP.
6. Żadna z konwertowanych w markery STS sekwencji *silico*DArT specyficznych dla genów *Pc52* oraz *Pc60* nie segregowała zgodnie z fenotypem badanych roślin.

#### LITERATURA

- Chong J., Kolmer J. A. 1993. Virulence dynamics and phenotypic diversity of *Puccinia coronata* f. sp. *avenae* in Canada from 1974 to 1990. *Can. J. Bot.* 71: 248 — 255.
- Gnanesh B. N., Mitchell Fetch J., Menzies J. G., Beattie A. D., Eckstein P. E., McCartney C. A. 2013. Chromosome location and allele-specific PCR markers for marker-assisted selection of the oat crown rust resistance gene *Pc91*. *Mol. Breed.* 32 (3): 679 — 686.
- Gnanesh B. N., Mitchell Fetch J., Zegeye T., McCartney C., Fetch T. 2014. Oat. In: Pratap A., Kumar J. (eds) *Alien Gene Transfer in Crop Plants*, vol. 2. Springer New York: 51 — 73.

- Martinelli J. A., Federizzi L. C., Bennedetti A. C. 1994. Yield reductions of oat grains due leaf rust severity. *Summa Phytopathologica* 20: 116 — 118.
- Simons M. D. 1985. Crown rust. In: *The Cereal Rusts: Vol. II. Diseases, Distribution, Epidemiology, and Control*. Ed by: Roelfs A. P., Bushnell W. R. Academic Press, Orlando, FL: 131 — 172.