

JAROSŁAW PLICH
BEATA TATAROWSKA
DOROTA MILCZAREK
BOGDAN FLIS

Instytut Hodowli i Aklimatyzacji Roślin — Państwowy Instytut Badawczy, Oddział w Młochowie

Piramidyzacja genów odporności ziemniaka na *Phytophthora infestans*

Pyramiding of resistance genes against *Phytophthora infestans* in potato

Piramidyzacja genów odporności ziemniaka na *P. infestans* jest skuteczną metodą zwiększenia efektywności i trwałości wykorzystywanych w hodowli ziemniaka źródeł odporności na tego patogena. Prezentowane badania miały na celu połączenie odporności warunkowanej dwoma wysokoefektywnymi genami R, warunkującymi odporność na szerokie spektrum ras *P. infestans*. W badaniach wykorzystano odmianę Bzura, jako donoru genu *R2-like* oraz klon hodowlany 04-IX-21, jako donoru genu *Rpi-phu1*. Odporność nieselekcjonowanego potomstwa pochodzącego ze skrzyżowania tych form, była testowana przez trzy lata w teście listkowym, z użyciem trzech grup izolatów różnicujących. Na podstawie wyników fenotypowych ocen odporności wyselekcjonowano grupę klonów posiadających oba geny odporności. Jako alternatywę do czasochłonnych i pracochłonnych testów fenotypowych zaproponowano selekcję w oparciu o markery DNA specyficzne dla badanych genów odporności. Wyniki badań molekularnych w pełni pokryły się z ocenami fenotypowymi, co potwierdza przydatność zaproponowanych markerów, jako narzędzia do selekcji form odpornych w programach hodowlanych.

Słowa kluczowe: geny R, gen *Rpi-phu1*, gen *R2-like*, zaraza ziemniaka

Pyramiding of the resistance genes against *P. infestans* enhances effectiveness and durability of resistance used in potato breeding programs. The aim of presented study was to combine two broad-spectrum resistance genes against *P. infestans*. The resistance donors cultivar Bzura (possessing *R2-like* gene) and potato clone 04-IX-21 (possessing *Rpi-phu1* gene) were crossed, and unselected progeny was developed. The resistance of progeny clones was tested in three consecutive years in detached leaflet tests with the use of three groups of isolates different in terms of virulence profiles. Based on the results of phenotypical tests, a group of progeny clones combining both resistance genes were selected. Since phenotypical tests are very laborious and time-consuming, authors proposed selection of such clones with the use of DNA markers specific for these genes. Results of genotyping were fully consistent with phenotypic tests, which confirms that proposed DNA markers can be used for selection of resistant clones in breeding programs.

Key words: gene *Rpi-phu1*, gene *R2-like*, late blight, R genes

Redaktor prowadzący: Renata Lebecka

WSTĘP

Ziemniak (*Solanum tuberosum* L.) należy do pierwszej czwórki roślin uprawnych najistotniejszych dla globalnej gospodarki żywnościowej człowieka. Gatunek ten jest uprawiany w ponad 100 krajach na całym świecie, a jego globalna produkcja szacowana jest na ponad 320 milionów ton rocznie (DeFauw i in., 2012). Jednym z najważniejszych czynników ograniczających wysokość plonu oraz opłacalność produkcji ziemniaka na świecie jest zaraza ziemniaka, która corocznie powoduje straty w plonie ziemniaka szacowane globalnie na 16%. Choroba ta powodowana jest przez *Phytophthora infestans* (Mont.) de Bary, grzybopodobny organizm z rodzaju Oomycetes (Vleeshouwers i in., 2011). W krajach rozwiniętych zagrożenie ze strony tego patogena kontrolowane jest głównie przez intensywną ochronę chemiczną. Rozwiązanie to podnosi jednak znacząco nakłady na produkcję ziemniaka oraz może wywoływać negatywne skutki dla środowiska i zdrowia człowieka (Forbes, 2012). Jedną z najskuteczniejszych metod ograniczenia ilości stosowanych fungicydów jest uprawa odmian ziemniaka odpornych na *P. infestans*. Niestety, większość odmian ziemniaka znajdujących się obecnie w szerokiej uprawie wykazuje niski poziom odporności na tego patogena (Cook i in., 2011). Hodowla odpornościowa przeciwko *P. infestans* rozpoczęła się ponad sto lat temu i wciąż jest jednym z głównych zadań wielu ośrodków hodowlanych na całym świecie. Początkowo ogromne nadzieje pokładano w wykorzystaniu genów głównych odporności (geny R) z dzikiego gatunku *S. demissum*. Okazało się jednak, że trwałość odporności warunkowanej tymi genami jest ograniczona, a w populacji *P. infestans* szybko zaobserwowano nowe rasy patogena, które były wirulentne w stosunku do wprowadzonych genów R. Część hodowców zarzuciła wykorzystywanie genów R, na rzecz potencjalnie bardziej trwałej odporności horyzontalnej. Jednak wykorzystanie tego typu odporności również nie przyniosło pożądanych rezultatów, ze względu na jej poligeniczne dziedziczenie oraz związki z negatywnymi cechami agronomicznymi (np. długi okres wegetacji). Obecnie, w celu zwiększenia potencjalnej trwałości odporności odmian ziemniaka na *P. infestans*, proponuje się łączenie (piramidyzacja) genów głównych warunkujących odporność na szerokie spektrum ras patogena i/lub połączenie odporności warunkowanej genami R z wysokim poziomem odporności horyzontalnej (Plich i in., 2016).

Celem prezentowanych badań było uzyskanie form ziemniaka o potencjalnie trwałej odporności na *P. infestans*, poprzez połączenie dwóch wysokoefektywnych źródeł odporności — odmiany Bzura i rodu hodowlanego 04-IX-21. Bzura jest jedną z najbardziej znanych polskich odmian o wysokiej odporności na *P. infestans*. Odmiana ta powstała ponad 30 lat temu w oparciu o materiały wyjściowe wywodzące się z programów hodowli odpornościowej prowadzonych w IHAR — PIB Oddział Młochów. Jej odporność pochodzi prawdopodobnie z dzikiego gatunku *S. demissum* i jest oparta na współdziałaniu genu *R2-like* oraz genów warunkujących wysoki poziom odporności horyzontalnej (Plich i in., 2015). Wprawdzie ponad 1/3 wszystkich przebadanych izolatów w polskiej populacji *P. infestans* jest w stanie porazić odmianę Bzura, lecz w warunkach polowych infekcja roślin przez *P. infestans* rozpoczyna się później i rozwija znacznie wolniej niż na roślinach odmian wzorcowych. Odporność klonu 04-IX-21 oparta

jest na obecności genu *Rpi-phu1* warunkującego wysoki poziom odporności roślin ziemniaka (zarówno naci, jak i bulw) na bardzo szerokie spektrum ras *P. infestans* (Śliwka i in., 2006; Plich i in., 2013). Połączenie tych źródeł odporności wydaje się być bardzo obiecujące, ponieważ rasy *P. infestans* wirulentne w stosunku do genu *R2-like* stanowią około 36% polskiej populacji tego patogena, natomiast rasy wirulentne w stosunku do genu *Rpi-phu1* to zaledwie 3% populacji (Brylińska i in., 2016). Do tej pory zidentyfikowano jedynie 3 izolaty wirulentne jednocześnie do obu tych genów. Stanowi to niecały 1% przebadanej polskiej populacji *P. infestans*, lecz profil wirulencji tych izolatów wymaga potwierdzenia (J. Śliwka — informacja ustna).

Przeprowadzone krzyżowania miały na celu piramidyzację genów *Rpi-phu1* i *R2-like*. Selekcja osobników potomnych posiadających oba geny R została przeprowadzona na podstawie testów laboratoryjnych z użyciem izolatów o różnej wirulencji, oraz przy wykorzystaniu opracowanych wcześniej markerów DNA specyficznych dla tych genów odporności.

MATERIAŁ I METODY

Materiał roślinny stanowiło nieselekcjonowane potomstwo (PH) pochodzące ze skrzyżowania odmiany Bzura z rodem 04-IX-21, z którego do badań wybrano losowo grupę 50 osobników. Odporność tych 50 klonów była oceniana w teście listkowym przez trzy kolejne lata 2013, 2014 i 2015. Ponadto do każdego testu listkowego dołączono formy rodzicielskie (Bzura i klon 04-IX-21) oraz zestaw 11 testerów Blacka (do potwierdzenia wirulencji stosowanych izolatów *P. infestans*). Stopień odporności każdego klonu określano na 3–5 listkach, w dwóch powtórzeniach oraz dwóch terminach badań w każdym roku badań. Oceny nasilenia objawów chorobowych dokonywano po 6 dniach inkubacji, uwzględniając powierzchnię zarodnikującej plamy i intensywność zarodnikowania. Do oceny porażenia stosowano skalę 9-stopniową (9 — brak objawów porażenia; 1 — powierzchnia listka całkowicie porażona, intensywne zarodnikowanie *P. infestans*) (Zarzycka, 2001). Na podstawie wyników testu listkowego badane klony były klasyfikowane jako odporne (średnia ocena $\geq 8,0$) lub podatne (średnia < 8). Do inokulacji listków zastosowano trzy grupy izolatów: dwa izolaty awirulentne w stosunku do genu *Rpi-phu1* (*Avr-phu1*); dwa izolaty awirulentne w stosunku do genu *R2-like* (*Avr2*); oraz dwa izolaty awirulentne w stosunku do obu tych genów (*Avr-phu1+Avr2*). W celu molekularnego potwierdzenia obecności genów R w badanym potomstwie zastosowano markery DNA: R2 (F gctcctgatcacatccatg; R acggcttctgaaatgaa) i phu6 (F agagaccctggatatattcatagctct; R cgetctaggcacagggctcaatgctgat) odpowiednio dla genów *R2-like* i *Rpi-phu1* (Kim i in., 2012; Śliwka i in., 2013). DNA zostało wyizolowane przy użyciu zestawu do izolacji GenElute Plant Genomic DNA Miniprep Kit (Sigma Aldrich), według metodyki zalecanej przez producenta. Materiał roślinny stanowiły młode, świeżo zebrane (lub uprzednio zamrożone w ciekłym azocie i przetrzymywane 1–4 tygodni w -80°C) liście, które ucierano w ciekłym azocie. Reakcje PCR były przeprowadzane według metody opisanej przez Plich i in. (2016). Analizę statystyczną (współczynnik

korelacji Pearsona, trójczynnikowa ANOVA) przeprowadzono przy użyciu programów MS Excel oraz pakietu Statistica 12.

WYNIKI

Przeprowadzone testy listkowe potwierdziły wirulencję i przynależność wykorzystanych izolatów *P. infestans* do odpowiednich grup: izolaty *Avr-phu1* nie porażały klonu 04-IX-21, izolaty *Avr2* nie porażały odmiany Bzura (oraz testera Blacka R2), natomiast izolaty z grupy *Avr-phu1+Avr2* nie porażały obu form rodzicielskich. Klony potomne z populacji PH wykazały wyraźne zróżnicowanie stopnia odporności ocenianego w teście listkowym. Trójczynnikowa ANOVA efektów głównych wykazała istotny wpływ genotypu i zastosowanego izolatu na odporność badanych form ($p < 0,0001$). Nie stwierdzono natomiast istotnego wpływu lat badań ($p = 0,136$) na stopień odporności. Współczynniki korelacji pomiędzy wynikami z poszczególnych lat testów w każdej grupie izolatów były bardzo wysokie ($r = 0,82-0,99$), a klony badane z użyciem tych samych izolatów *P. infestans* (*Avr2*, *Avr-phu1* i *Avr2+Avr-phu1*) były klasyfikowane w każdym roku badań do tej samej grupy osobników odpornych lub podatnych. W testach z użyciem izolatów typu *Avr-phu1*, 28 klonów było odpornych a 22 podatne. W testach z użyciem izolatów *Avr2*, 22 klony były odporne, a 28 podatne. W testach z użyciem izolatów awirulentnych w stosunku do obu genów 38 klonów było odpornych a 12 podatnych (tab. 1).

Tabela 1

Wyniki oceny odporności badanych klonów na *P. infestans*
Results of resistance assessment of examined clones against *P. infestans*

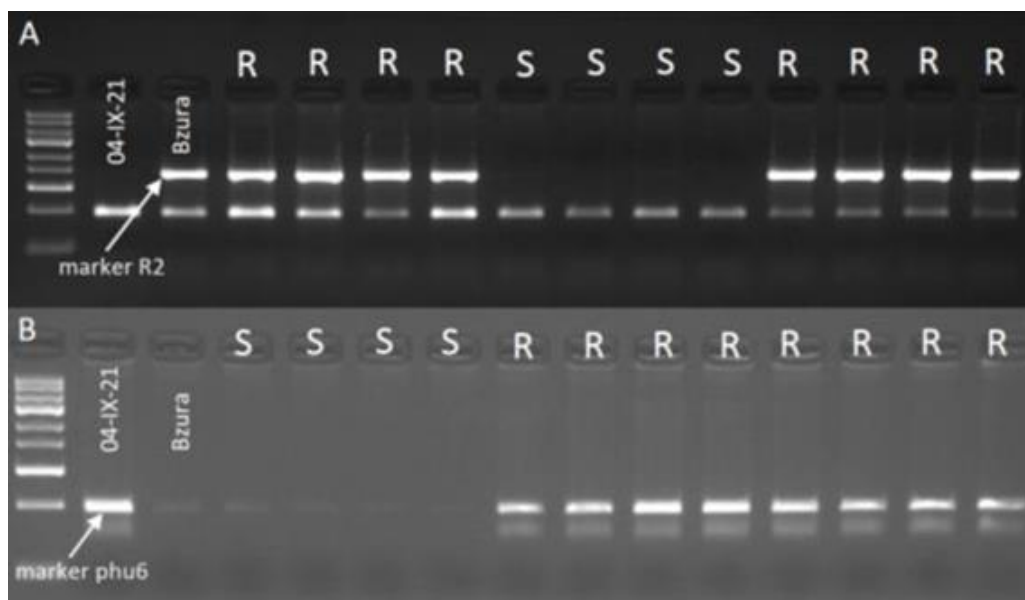
Typ izolatów Isolates	Odporne Resistant		Podatne Susceptible	
	liczba klonów number of clones	średnia ocena (zakres) mean score (range)	liczba klonów number of clones	średnia ocena (zakres) mean score (range)
<i>Avr2</i>	22	8,7 (8,0-9,0)	28	3,2 (1,8-6,4)
<i>Avr-phu1</i>	28	9,0 (8,9-9,0)	22	3,3 (1,5-5,5)
<i>Avr2+Avr-phu1</i>	38	8,9 (8,0-9,0)	12	4,4 (2,5-5,5)

Tabela 2

Liczebność klonów posiadających odpowiednie geny R i ich fenotyp
Number of clones possessing particular R-genes and their phenotype

Obecność genu Presence of genes	Liczba klonów Number of clones			
	posiadających gen possessing gene	odpornych na izolaty: resistant to isolates:		
		<i>Avr2</i>	<i>Avr-phu1</i>	<i>Avr2+Avr-phu1</i>
<i>R2-like</i>	10	10	0	10
<i>Rpi-phu1</i>	16	0	16	16
<i>R2-like+Rpi-phu1</i>	12	12	12	12
Brak genów R — No R genes	12	0	0	0
Łącznie — In total	50	22	28	38

Badania przeprowadzone z użyciem markerów DNA (rys. 1) wykazały, że spośród wszystkich badanych klonów 12 klonów nie posiadało żadnego genu R, 10 klonów posiadało gen *R2-like*, 16 klonów posiadało gen *Rpi-phu1*. W badanym potomstwie 12 klonów odziedziczyło po formach rodzicielskich oba geny odporności (tab. 2).



Rys. 1. Rozdział elektroforetyczny produktów amplifikacji: A) markera R2 (686 bp) specyficznego dla genu *R2-like*; B) markera phu6 (298 bp) specyficznego dla genu *Rpi-phu1*. R — klony odporne w teście listkowym; S — klony podatne w teście listkowym

Fig. 1. Electrophoretic separation of amplification products: A) marker R2 (686 bp) specific for *R2-like* gene; B) marker phu6 (298 bp) specific for *Rpi-phu1* gene. R — clones resistant in detached leaflet tests; S- clones susceptible in detached leaflet tests

DYSKUSJA

Ze względu na ogromne możliwości adaptacyjne *P. infestans* hodowla odpornościowa przeciwko temu patogenowi jest niezwykle trudna i stanowi jedno z najważniejszych wyzwań dla hodowców ziemniaka. Piramidyżacja wysokoefektywnych genów R jest obecnie najczęściej polecaną metodą uzyskania potencjalnie trwałej odporności ziemniaka na zarazę ziemniaka. Jednak elementy każdej piramidy genowej powinny być dobierane w taki sposób, aby maksymalnie utrudnić patogenowi ‘przełamanie’ odporności warunkowanej przez skumulowane działanie genów R, co przekłada się na zwiększenie trwałości tej odporności. Zarówno gen *R2-like* jak i *Rpi-phu1* są uważane za ważne elementy w budowaniu trwałej odporności ziemniaka przeciwko *P. infestans* (Gilroy i in., 2011; Plich i in., 2016), a procent polskiej populacji patogena zdolny

do potencjalnego porażenia klonów ziemniaka posiadających oba geny odporności jest obecnie bardzo niewielki. Przeprowadzone testy fenotypowe wskazały, że 24% klonów potomnych cechowało się odpornością zarówno na izolaty *Avr-phi1*, jak i *Avr2*. Selekcja osobników potomnych łączących rasowo-specyficzną odporność z obu form rodzicielskich wymagała przeprowadzenia wielu testów laboratoryjnych z użyciem izolatów o różnej wirulencji, co w prowadzonych na szeroką skalę programach hodowlanych byłoby bardzo trudne. Dlatego w niniejszej pracy zaprezentowano także możliwość wykorzystania markerów DNA, jako skutecznego narzędzia selekcji form posiadających oba geny odporności. Zastosowane markery są specyficzne do badanych genów, a ich obecność (lub brak) w klonach potomnych w pełni pokrywała się z fenotypem obserwowanym w testach odporności. Dzięki zastosowaniu markerów DNA specyficznych dla obecnych w formach rodzicielskich genów R, możliwe było molekularne potwierdzenie obecności obu genów R, oraz efektywna i szybka selekcja klonów potomnych posiadających oba te geny. Wykorzystanie proponowanych markerów DNA do selekcji (MAS — ang. marker assisted selection) jest możliwe już na najwcześniejszym etapie procesu hodowli ziemniaka (etap siewki). Pozwoli to na znaczne ograniczenie ilości materiału hodowlanego prowadzonego na dalszych etapach hodowli oraz wyeliminowanie pracochłonnych i trwających kilka lat testów fenotypowej oceny odporności w laboratorium. W końcowym efekcie użycie markerów DNA minimalizuje koszty związane z prowadzeniem cyklu hodowlanego oraz zwiększa efektywność selekcji pożądaných genotypów.

Plon bulw wyselekcjonowanych klonów nie odbiegał pod względem wysokości i jakości od plonu bulw odmiany Bzura (dane nie prezentowane), dlatego formy te mogą być z powodzeniem wykorzystywane jako komponenty rodzicielskie w hodowli twórczej nowych odmian ziemniaka. Mogą również posłużyć, jako cenne źródło odporności w pracach hodowlanych mających na celu dalszą piramidyzację kolejnych genów odporności na *P. infestans*.

Wykorzystana w naszych badaniach odmiana Bzura jest donorem nie tylko genu *R2-like*, ale także wysokiego poziomu odporności horyzontalnej. We wcześniejszych badaniach autorów (Plich i in., 2016) wykazano, że horyzontalna odporność ziemniaka na *P. infestans* jest związana z wydłużonym okresem wegetacji roślin ziemniaka, lecz z drugiej strony zwiększa efektywność i trwałość odporności warunkowanej genami R. Połączenie wysokiego poziomu odporności horyzontalnej odmiany Bzura z efektami działania dwóch wysokoefektywnych genów R (*Rpi-phi1* i *R2-like*) może prowadzić do powstania form ziemniaka o potencjalnie trwałej odporności na zarazę ziemniaka. Jednak ostateczna weryfikacja trwałości odporności może nastąpić dopiero w długotrwałej uprawie polowej na szeroką skalę.

WNIOSKI

1. Piramidyzacja genów *R2-like* i *Rpi-phi1* zapewnia odporność na bardzo szerokie spektrum ras *P. infestans*, o czym świadczy fakt, że 99% scharakteryzowanej dotąd

- polskiej populacji tego patogena jest awirulentna w stosunku do obu tych genów łącznie.
2. Fenotypowa selekcja form ziemniaka łączących oba geny jest możliwa, lecz wymaga dużych nakładów pracy (kilkuletnie testy odporności z użyciem kilku izolatów różnicujących).
 3. Selekcja form łączących geny *R2-like* i *Rpi-phu1* w oparciu o zaproponowane markery DNA jest w pełni skuteczna i może być przeprowadzona w programach hodowlanych prowadzonych na szeroką skalę.
 4. Spodziewanym efektem połączenia genów *R2-like* i *Rpi-phu1* może być potencjalny wzrost trwałości odporności wyselekcjonowanych form na *P. infestans*.
 5. Wyselekcjonowane formy mogą być wykorzystane bezpośrednio do tworzenia nowych odpornych odmian ziemniaka, lub jako donory odporności w pracach hodowlanych nad dalszą piramidyzacją kolejnych genów R.

LITERATURA

- Brylińska M., Sobkowiak S., Stefańczyk E., Śliwka J. 2016. Potato cultivation system affects population structure of *Phytophthora infestans*. *Fungal Ecology* 20: 132 — 143.
- Cooke L. R., Schepers H. T. A. M., Hermansen A., Bain R. A., Bradshaw N. J., Ritchie F., Shaw D. S., Evenhuis A., Kessel G. J. T., Wander J. G. N., Andersson B., Hansen J.G., Hannukkala A., Nærstad R., Nielsen B. J. 2011. Epidemiology and integrated control of potato late blight in Europe. *Potato Res.* 54: 183 — 222.
- DeFauw S. L., He Z., Larkin R. P., Mansour S. A. 2012. Sustainable potato production and global food security. W: *Sustainable Potato Production: Global Case Studies*. He Z. Larkin R., Honeycutt W. Springer Science + Business Media B.V. 2012.
- Forbes G. A. 2012. Using host resistance to manage potato late blight with particular reference to developing countries. *Potato Res.* 55: 205 — 216.
- Gilroy E. M., Breen S., Whisson S. C., Squires J., Hein I., Kaczmarek M., Turnbull D., Boevink P. C., Lokossou A., Cano L. M., Morales J., Avrova A. O., Pritchard L., Randall E., Lees A., Govers F., van West P., Kamoun S, Vleeshouwers V. G. A. A., Cooke D. E. L., Birch P. R. J. 2011. Presence/absence, differential expression and sequence polymorphisms between PiAVR2 and PiAVR2 — like in *Phytophthora infestans* determine virulence on R2 plants. *New Phytologist* 191: 763 — 776.
- Kim H. J., Lee H. R., Jo K. R., Mahdi Mortazavian S. M., Huigen D.J., Evenhuis B., Kessel G., Visser R. G. F., Jacobsen E., Vossen J. H. 2012. Broad spectrum late blight resistance in potato differential set plants MaR8 and MaR9 is conferred by multiple stacked R genes. *Theor. Appl. Genet.* 124: 923 — 935.
- Plich J., Tatarowska B., Milczarek D., Zimnoch-Guzowska E. Flis B. 2016. Relationships between race-specific and race-non-specific resistance to potato late blight and length of potato vegetation period in various sources of resistance. *Field Crops Research* 196: 311 — 324.
- Plich J., Tatarowska B., Lebecka R. Śliwka J., Zimnoch-Guzowska E., Flis B. 2015. *R2-like* Gene Contributes to Resistance to *Phytophthora infestans* in Polish Potato Cultivar Bzura. *Am. J. Potato Res.* 92 (3): 350 — 358.
- Śliwka J. Jakuczun H., Lebecka R., Marczewski W., Gebhardt C., Zimnoch-Guzowska E. 2006. The novel, major locus *Rpi-phu1* for late blight resistance maps to potato chromosome IX and is not correlated with long vegetation period. *Theor. Appl. Genet.* 113: 685 — 695.
- Śliwka J., Świętek M., Tomczyńska I., Stefańczyk E., Chmielarz M., Zimnoch-Guzowska E. 2013. Influence of genetic background and plant age on expression of the potato late blight resistance gene *Rpi-phu1* during incompatible interaction with *Phytophthora infestans*. *Plant Pathology* 62: 1072 — 1080.

- Vleeshouwers V. G. A. A., Raffaele S., Vossen J., Champouret N., Oliva R., Segretin M. E., Rietman H., Cano L. M., Lokossou A., Kessel G., Pel M. A., Kamoun S. 2011. Understanding and exploiting late blight resistance in the age of effectors. *Annual Review of Phytopathology* 49: 25.1 — 25.25.
- Zarzycka H. 2001. Ocena odporności na zarazę ziemniaka w teście listkowym. Sporządzanie inokulum. Instytut Hodowli i Aklimatyzacji Roślin, Radzików, Monografie i Rozprawy Naukowe IHAR 10/2001: 77 — 80.