PROGRESS IN PLANT PROTECTION
57 (1): 41-46, 2017
ISSN 1427-4337

DOI: 10.14199/ppp-2017-006
Published online: 17.02.2017

Received: 14.10.2016 / Accepted: 25.01.2017

Pyramiding winter wheat resistance genes (*Pm21* + *Pm34*) of powdery mildew of cereals and grasses (*Blumeria graminis* f. sp. *tritici*)

Piramidowanie genów odporności (*Pm21* + *Pm34*) pszenicy ozimej na mączniaka prawdziwego zbóż i traw (*Blumeria graminis* f. sp. *tritici*)

Aleksandra Pietrusińska*, Jerzy H. Czembor

Summary

The aim of presented study was pyramiding of two resistance genes (*Pm21 + Pm34*) of winter wheat powdery mildew (*Blumeria graminis* f. sp. *tritici*) in a one genotype. Resistance genes were introduced into two wheat cultivars: Nadobna and Bogatka, both presenting high economic value, however, susceptible to population *Blumeria graminis* f. sp. *tritici*. The wheat translocation line 6VS/6AL Yangmai 5, which carries the *Pm21* gene and line NC97BGTD7, which carries the *Pm34* gene, were used as the donors of resistance to powdery mildew. It was found that the molecular markers which were used in foreground selection: *NAU/xibao*, X*barc177* and X*barc144*, can be effectively and commonly used in breeding programs with combination of traditional method, whose purpose is to search for sources of resistance to wheat powdery mildew of cereals and grasses. The marker selection and pathology test allowed obtaining lines that were resistant to *B. graminis* f. sp. *tritici*.

Key words: powdery mildew on cereals and grasses; winter wheat; molecular markers; resistance genes pyramid; *Pm21* + *Pm34*

Streszczenie

Celem badań było wprowadzenie do jednego genotypu (spiramidowanie) dwóch efektywnych genów odporności pszenicy ozimej na mączniaka prawdziwego zbóż i traw (*Blumeria graminis* f. sp. *tritici*): *Pm21* oraz *Pm34*. Geny odporności wprowadzano do odmian pszenicy: Nadobna oraz Bogatka, o wysokiej wartości gospodarczej, jednak podatne na populację *B. graminis* f. sp. *tritici*. Donorami genów odporności były translokacyjna linia 6VS/6AL Yangmai 5 z dominującym genem odporności *Pm21* oraz linia NC97BGTD7, z genem *Pm34*. Stwierdzono, że markery DNA (deoxyribonucleic acid) (marker *NAU/xibao* oraz markery mikrosatelitarne X*barc177* oraz X*barc144*) w sposób efektywny mogą być wykorzystywane w programach hodowlanych opartych na selekcji metodami tradycyjnymi, których celem jest poszukiwanie źródeł odporności pszenicy ozimej na mączniaka prawdziwego zbóż i traw. Selekcja molekularna oraz fitopatologiczna umożliwiła wyprowadzenie linii odpornych na *B. graminis* f. sp. *tritici.*

Słowa kluczowe: mączniak prawdziwy zbóż i traw; pszenica ozima; markery molekularne; piramidy genowe; *Pm21* + *Pm34*

Instytut Hodowli i Aklimatyzacji Roślin – Państwowy Instytut Badawczy
Krajowe Centrum Roślinnych Zasobów Genowych
Radzików, 05-870 Błonie
*corresponding author: a.pietrusinska@ihar.edu.pl

Wstęp / Introduction

Mączniak prawdziwy zbóż i traw, którego sprawcą jest grzyb *Blumeria graminis* (DC.) E.O. Speer f. sp. *tritici* Em. Marchal to groźna choroba pszenicy ozimej w Polsce. Choroba ta występuje każdego roku, z różnym nasileniem na terenie całego kraju, a największe szkody powoduje w rejonach nadmorskich, południowo-wschodnich oraz centralnej części kraju. Wraz z intensyfikacją uprawy zbóż znaczenie tej choroby wzrasta. Porażenie roślin w okresie wczesnej wiosny niekorzystnie wpływa na ich dalszy rozwój, w tym krzewienie. Zmiany chorobowe na liściach zmniejszają powierzchnię asymilacyjną i ograniczają proces fotosyntezy, natomiast wzrost liczby porażonych źdźbeł powoduje spadek liczby i masy ziarniaków, czyli ujemnie wpływa na jakość i wielkość plonu. Dodatkowo, duże nasilenie mączniaka prawdziwego zbóż i traw powoduje, że osłabione rośliny są bardziej podatne na inne choroby, powodowane przez takie grzyby, jak: *Septoria* czy *Fusarium* spp. (http://doradca-rolniczy.pl/maczniak-prawdziwy-zboz/). Straty w plonach powodowane przez mączniaka prawdziwego zbóż i traw wahają się w przedziale 15–30%. Natomiast przy sprzyjającej pogodzie straty te są znacznie wyższe i mogą sięgać nawet do 50% (Kochman i Węgorek 1997; Tratwal i Jakubowska 2004; Jańczak i Pawlak 2006).

Nowoczesna, proekologiczna produkcja roślinna nastawiona jest na uzyskanie jak największego plonu przy jednoczesnym ograniczeniu stosowania środków ochrony roślin. W ostatnich dziesięcioleciach, w programach hodowlanych powszechnym stało się wykorzystywanie efektywnych źródeł odporności jako nośnika stabilnej i trwałej na przestrzeni lat odporności na często występujące choroby zbóż. Odporność na mączniaka prawdziwego zbóż i traw uwarunkowana jednym genem jest mało efektywna, ponieważ w populacji patogenu powstają rasy z korespondującymi genami wirulencji. Dlatego w programach hodowlanych dąży się do tworzenia kombinacji genów odporności *Pm* (*Powdery mildew*): dwóch (*Pm* + *Pm*) lub trzech (*Pm* + *Pm* + *Pm*). I tak, np. odmiana Ring zawiera profil odpornościowy (*Pm1a* + *Pm9*), linia Yang1581 – (*Pm2* + *Pm4*), polskie odmiany: Alba, Korweta, Oda, Roma zawierają kombinację genów (*Pm2* + *Pm6*), chińska linia Yang1583 – *(Pm4a* + *Pm21*) (Kowalczyk i wsp. 1998; Liu i wsp. 2000; Hysing i wsp. 2007; Pietrusińska 2009). Piramida genów w zestawieniu odpornościowym (*Pm* + *Pm* + *Pm*) również została z powodzeniem wprowadzona dla odmian pszenic jarych i ozimych. U polskiej odmiany pszenicy Polna zidentyfikowano kombinację genów (*Pm2* + *Pm3d* + *Pm4b*) (Kowalczyk i wsp. 1998). Odmiany Pompe oraz Troll zawierają segment odpornościowy (*Pm1a* + *Pm2* + *Pm9*), natomiast odmiana Sleipner kombinację genów (*Pm2* + *Pm6* + *Pm8*) (Hysing i wsp. 2007; Pietrusińska 2010; Pietrusińska i Czembor 2015).

Tworzenie piramid genowych jest procesem długotrwałym oraz pracochłonnym. Ważnym czynnikiem decydującym o skuteczności powodzenia procesu hodowlanego jest prawidłowy dobór tylko efektywnych źródeł odporności. Dlatego też, rokrocznie przeprowadzane są badania mające na celu określenie struktury wirulencji populacji *B. graminis* aktualnie występującej na terenie kraju. Wyniki tych badań, stanowią podstawę właściwego wyboru efektywnych genów odporności, które warunkują odporność na tego patogena, a tym samym powinny być uwzględniane w programach hodowlanych. Na podstawie dotychczas prowadzonych badań nad strukturą populacji na terenie Polski stwierdzono, że frekwencja izolatów wirulentnych w stosunku do genów *Pm21*, *Pm29*, *Pm36* oraz *Pm37* jest niska, i to one powinny być wykorzystywane w pracach mających na celu uzyskanie form pszenicy ozimej o wysokiej odporności na mączniaka prawdziwego zbóż i traw (Pietrusińska i Czembor 2014).

Celem badań była piramidyzacja dwóch efektywnych genów odporności: *Pm21* oraz *Pm34* na mączniaka prawdziwego zbóż i traw (*B. graminis* f. sp. *tritici*) w dwóch odmianach pszenicy ozimej, dobrze przystosowanych do polskich warunków przyrodniczych.

Materiały i metody / Materials and methods

Do badań włączono: (1) dwie uprawiane odmiany pszenicy ozimej o wysokiej wartości gospodarczej, wysokoplonujące, ale podatne na populacje *B. graminis* f. sp. *tritici* występujące na terenie Polski: Bogatka oraz Nadobna (DANKO Hodowla Roślin Sp. z o.o.) oraz (2) dwie linie pszeniczne, linia *Pm21* (translokacyjna linia 6VS/6AL Yangmai 5, z dominującym genem *Pm21*, pochodzącym z dzikiego gatunku *Haynaldia villosa* – syn. *Dasypyrum villosum*) oraz linia *Pm34* (linia NC97BGTD7 z genem *Pm34*, pochodzącym z diploidalnego gatunku *Triticum tauschii* – syn. *Aegilops tauschii*, *Aegilops squarrosa* L.). Materiał wyjściowy stanowiły dwie populacje mieszańcowe: F_3BC_1 (Bogatka × *Pm21*) oraz F_3BC_1 (Nadobna × *Pm21*).

Testy fitopatologiczne

W badaniach wykorzystano jednozarodnikowy izolat *B. graminis* Bgt Kadett. Należy on do kolekcji Pracowni Gromadzenia i Oceny Roślin (Instytut Hodowli i Aklimatyzacji Roślin – Państwowy Instytut Badawczy) (IHAR – PIB). Doświadczenia prowadzono w warunkach kontrolowanych (komora fitotronowa) w izolacji przestrzennej, z doświetlaniem przy długości dnia 16 godz. oraz 8 godz. ciemności i temperaturze w zakresie 16–22°C. Izolat namnażano na roślinach podatnej odmiany Nimbus. Następnie, gdy badane rośliny były w stadium w pełni rozwiniętego drugiego liścia inokulowano je poprzez równomierne strząsanie zarodników konidialnych z odmiany Nimbus. Po upływie 8–10 dni prowadzono ocenę porażenia roślin wykorzystując pięciostopniową skalę według Mainsa i Daetza, w której liczbowy zapis oznaczał odpowiednio: 0 = brak widocznych objawów; 1 = niewielkie nekrozy; 2 = powiększające się nekrozy wraz ze skąpym zarodnikowaniem; 3 = chlorozy, grzybnie rozwinięte, lecz słabo zarodnikujące; 4 = dobrze rozwinięta grzybnia i zarodnikująca grzybnia. Rośliny o reakcji 0–2 oceniano jako odporne, natomiast 3–4 jako podatne (Czembor 2008).

Analizy molekularne

DNA (deoxyribonucleic acid) materiału roślinnego izolowane było dwoma różnymi metodami w zależności od selekcji materiału roślinnego pod względem obecności wprowadzonych genów odporności *Pm21* oraz *Pm34*. Pierwszą metodę ekstrakcji DNA przeprowadzono według metodyki opisanej przez Higgins i wsp. (2000) z drobnymi modyfikacjami. Z każdej rośliny pobrano 150 mg dwutygodniowej młodej tkanki roślinnej. Następnie do każdej, drobno pociętej próbki roślinnej dodano 1 ml buforu ekstrakcyjnego TPS (100 mM Tris-HCl pH 8,0, 1 M KCl, 10 mM EDTA). Całość wirowano przez 2 min. przy 12 000 obr./min. Zwirowany materiał roślinny został poddany homogenizacji przy użyciu młynka miksującego MM301 (Retsch, Verder, Katowice, Polska) i częstotliwości wytrząsania 30 tys./min. w czterech cyklach pięciominutowych. Utarty materiał roślinny wirowano przez 10 min. przy 18 000 obr./min., a następnie inkubowano w łaźni wodnej przez 15 min. w temperaturze 90°C. Po zakończeniu inkubacji, próby roślinne schłodzono na lodzie i ponownie wirowano przez 10 min. przy 18 000 obr./min. Uzyskany supernatant rozcieńczono w ddH_2O w stosunku 1 : 10 (supernatant : woda).

Po przeprowadzeniu wstępnej selekcji molekularnej pod kątem obecności genu *Pm21*, wśród analizowanego materiału roślinnego, wyselekcjonowano rośliny, u których potwierdzono molekularnie obecność tego genu odporności. Następnie, za pomocą drugiej metody ekstrakcji z użyciem gotowego zestawu DNeasy Plant Mini Kit (Qiagen INC., 27220 Turnberry Lane, Palencia, CA 91355, USA), z materiału roślinnego wyizolowano DNA. W początkowej fazie procedury wprowadzono drobne modyfikacje. Z każdej rośliny pobrano 200 mg zielonej tkanki, którą homogenizowano w buforze ekstrakcyjnym przy użyciu młynka miksującego MM301 (Retsch, Veder, Katowice, Polska) i częstotliwości wytrząsania 30 tys./min. w czterech cyklach pięciominutowych. Kolejne etapy procedury przebiegały według zaleceń producenta zestawu DNeasy Plant Mini Kit (Qiagen).

Spektrofotometryczny pomiar ilości UV zaabsorbowanego przez zasady w DNA oznaczono zgodnie z instrukcją fluorymetru NanoDrop 3300 (ThermoScientific, Wilmington, USA).

W celu stwierdzenia występowania genu *Pm21* zlokalizowanego na długim ramieniu chromosomu 6AL (Qi i wsp. 1996), w selekcji wspomaganej markerami wykorzystano marker o nazwie *NAU/xibao* o wielkości generowanego produktu 902 pz – par zasad (Cao i wsp. 2006). Wykorzystany w reakcji amplifikacji starter został zsyntetyzowany przez Sigma-Genosys (Sigma-Genosys Ltd., London Road, Cambridge, CB2 4EF, Wielka Brytania).

Reakcję amplifikacji przeprowadzono w niskoprofilowanych 96-dołkowych płytkach (Bio-Rad, 1000 Alfred Nobel Drive Hercules, California 94547, USA). Powielanie fragmentów DNA dla markera *NAU/xibao* przeprowadzono w układzie zawierającym w 8 µl mieszaniny reakcyjnej następujące komponenty: 3 µl supernatantu po ekstrakcji DNA metodą TPS, 1 × bufor (MBI Fermentas, 29-4240 Ridge Lea Road, Amherst NY, 14226 USA), 2,5 mM $MgCl_2$ (MBI Fermentas), 0,2 mM dNTPs (MBI Fermentas), 0,5 µM startera i 1 U polimerazy Taq (MBI Fermentas). Powielanie fragmentów DNA przeprowadzono w termocyklerze Mastercycler ep (Eppendorf Poland Sp. z o.o., Warszawa, Polska), z pokrywą grzewczą ustawioną na 105°C. Mieszaninę reakcyjną poddano następującemu profilowi termicznemu: 94°C/3 min. denaturacji wstępnej, 32 cykle składające się z: 94°C/30 sek., 55°C/30 sek., 72°C/2 min., końcowy etap amplifikacji, czyli etap elongacji trwał 5 min.

Rozdział produktów amplifikacji dla markerów *NAU/xibao* przeprowadzono na 1,5% żelu agarozowym przy napięciu 240 V, przez 4 godz. w buforze 0,5 x TBE (0,1 M Tris, 90 mM kwas borowy, 9 mM EDTA). Otrzymane obrazy rozdziału wizualizowane były przy użyciu bromku etydyny z wykorzystaniem systemu Gel Logic 200 (Eastman Kodak Company, Rochester, NY 14650, USA).

Analiza uzyskanych obrazów elektroforetycznych oceniana była wizulanie. Do wyodrębnienia roślin z genem odporności *Pm21* zostały wykorzystane wzorce – matryce odmian bez wprowadzanych genu(ów) odporności, jako kontrola negatywna oraz matryca źródła odporności *Pm21*, jako kontrola pozytywna.

W celu stwierdzenia występowania genu *Pm34* zlokalizowanego na długim ramieniu chromosomu 5DL w selekcjonowanym materiale roślinnym wykorzystano dwa literaturowe, flankujące markery mikrosatelitarne X*barc177* oraz X*barc144*. Markery te, oddalone są od *locus* odporności odpowiednio 5,4 cM (oczekiwany produkt 129–138 pz) oraz 2,6 cM (oczekiwany produkt 235 pz) (Miranda i wsp. 2006). Oba startery zostały zsyntetyzowane przez Sigma-Genosys (Sigma-Genosys Ltd., London Road, Cambridge, CB2 4EF, Wielka Brytania). Ponadto, w każdej z par starterów amplifikujących *loci* mikrosatelitarne jeden ze starterów na końcu 5' wyznakowany był barwnikiem fluorescencyjnym ABI – HEX (barwnik żółty).

Reakcję amplifikacji przeprowadzono również w niskoprofilowanych 96-dołkowych płytkach (Bio-Rad, 1000 Alfred Nobel Drive Hercules, California 94547, USA). Powielanie fragmentów DNA dla markera X*barc177* oraz X*barc144* zostało przeprowadzone w układzie zawierającym w objętości 8 µl mieszaniny reakcyjnej następujące komponenty: 3 µl DNA, 1 × bufor (MBI Fermentas, 29-4240 Ridge Lea Road, Amherst NY, 14226 USA), 2,5 mM $MgCl_2$, 0,2 mM dNTPs, 0,5 µM startera i 1 jednostka polimerazy Taq (MBI Fermentas). W termocyklerze Mastercycler ep (Eppendorf Poland Sp. z o.o., Warszawa, Polska) z pokrywą grzewczą ustawioną na 105°C mieszaninę reakcyjną dla markera X*barc177* poddano cyklicznym zmianom temperatury w czasie według programu: 94°C/3 min. denaturacji wstępnej, następnie 10 cykli składających się z etapów: 94°C/30 sek., 50°C/30 sek., 72°C/1 min. oraz 30 cykli: 90°C/30 sek., 50°C/30 sek., 72°C/1 min. Końcowy etap polimeryzacji przy temperaturze 72°C przedłużono do 5 min. Dla markera X*barc144* profil termiczny mieszaniny reakcyjnej różnił się jedynie temperaturą hybrydyzacji i wynosił 52°C/30 s.

Produkty reakcji PCR dla genu *Pm34* rozdzielano za pomocą analizatora DNA ABI 377XL wyposażonego w laserowy detektor (Applied Biosystems, Foster City, CA

04404, USA) i 4,5% denaturującym żelu poliakrylamidowym (Long Ranger Gel Solution, Cambrex Bio Science, USA) w obecności barwników: HEX (żółty) oraz TET (zielony). Rozdziały elektroforetyczne prowadzone były w buforze 1 x TBE (0,1 M TRIS, 90 mM kwas borowy, 9 mM EDTA). Znakowane produkty amplifikacji przed naniesieniem na żel poliakrylamidowy denaturowane były w obecności foramidu, w termocyklerze z temperaturą pokrywy grzewczej nastawioną na 105ºC i temperaturą bloku 95ºC przez 3 min.

Obserwacje rozdziału elektroforetycznego oraz zbieranie i analizowanie danych przeprowadzono przy użyciu programu GeneScan 3.1 (Applied Biosystems). W celu wyodrębnienia roślin, które posiadały wprowadzony gen odporności *Pm34*, przeprowadzono selekcję materiału roślinnego, wykorzystując do tego celu wzorzec, uzyskany produkt dawcy odporności. Umożliwiło to wybór pożądanych roślin do dalszych etapów prowadzonych badań.

Wyniki i dyskusja / Results and discussion

W pierwszej części doświadczenia przeprowadzono dwa krzyżowania zbieżne, które otrzymano po skrzyżowaniu pokolenia F_3BC_1 [(Bogatka × *Pm21*) × Bogatka] oraz F_3BC_1 [(Nadobna × *Pm21*) × Nadobna] z drugim źródłem odporności na mączniaka prawdziwego zbóż i traw – linią *Pm34*.

Uzyskano czwarte pokolenie F_4BC_1 dwóch populacji mieszańcowych, odpowiednio: [(Bogatka × *Pm21*) × *Pm34*] oraz [(Nadobna × *Pm21*) × *Pm34*]. W wyniku tego przekrzyżowania zbieżnego, otrzymano łącznie 188 roślin. Na podstawie wyników doświadczenia fitopatologicznego, do selekcji molekularnej wyselekcjonowano 94 rośliny odporne na izolat Bgt Kadett. Następnie przeprowadzono selekcję metodami molekularnymi pod kątem obecności genu *Pm21*. W celu identyfikacji genu *Pm21*, wykorzystano marker *NAU/xibao*. Obecność genu *Pm21* potwierdzono łącznie u 80 roślin, i te włączono do dalszych badań. Z roślin tych zostało wyizolowane DNA, za pomocą kolumienkowego zestawu Plant Mini Kit (QIAGEN), a otrzymane tą metodą matryce, zostały wykorzystane do selekcji materiału roślinnego pod kątem obecności genu *Pm34* za pomocą dwóch markerów mikrosatelitarnych: X*barc177* oraz X*barc144*. Podstawowym kryterium przy selekcji genotypów z genem *Pm34* była potwierdzona jednoczesna obecność układu markerowego (X*barc177* + X*barc144*). W przypadku potwierdzenia amplifikacji pojedynczego markera w badanym materiale roślinnym, genotypy takie, były eliminowane z dalszych etapów badań. W badanych dwóch populacjach obecność genu *Pm34* potwierdzono u 33 roślin. Jedynym kryterium przy selekcji genotypów o profilu (*Pm21* + *Pm34*) była potwierdzona obecność obydwu genów za pomocą trzech markerów molekularnych (*NAU/xibao* + X*barc177* + X*barc144*). Wśród 188 roślin z dwóch populacji mieszańcowych dokonano selekcji pod względem obecności dwóch *loci* odporności, w wyniku czego do pierwszego krzyżowania wstecznego wyselekcjonowano 16 roślin z populacji [(Bogatka × *Pm21*) × *Pm34*] oraz 17 roślin z populacji mieszańcowej [(Nadobna × *Pm21*) × *Pm34*].

Wybrane rośliny skrzyżowano drugi raz wstecznie z rodzicem wypierającym – odmiana pszenicy Bogatka (pierwsza populacja) oraz z odmianą Nadobna (druga populacja). Otrzymano F_4BC_2 populacji mieszańcowych [(Bogatka × *Pm21*) × Bogatka × *Pm34*] × Bogatka oraz [(Nadobna × *Pm21*) × Nadobna × *Pm34*] × Nadobna, w liczbie odpowiednio 142 oraz 168 roślin.

Na dwóch populacjach F_4BC_2 przeprowadzono selekcję fenotypową pod kątem oceny odporności/podatności na mączniaka prawdziwego zbóż i traw. Na podstawie przeprowadzonych testów fitopatologicznych do selekcji molekularnej wyselekcjonowano łącznie 201 roślin. Wykonano ją pod kątem obecności wprowadzonych genów odporności: (*Pm21* + *Pm34*). W pierwszej kolejności wybrano genotypy według oceny molekularnej odporne na mączniaka prawdziwego zbóż i traw. Obecność genu *Pm21* potwierdzono łącznie dla 111 roślin. Następnie, u wyselekcjonowanych 111 roślin zostało wyizolowane DNA, za pomocą kolumienkowego zestawu Plant Mini Kit. Przeprowadzono selekcję materiału roślinnego pod kątem obecności genu *Pm34* za pomocą dwóch markerów mikrosatelitarnych: X*barc177* oraz X*barc144*. Podstawowym kryterium przy selekcji genotypów z genem *Pm34* była potwierdzona jednoczesna obecność układu markerowego (X*barc177* + X*barc144*). Obecność dwóch markerów związanych z występowaniem genu *Pm34*, w dwóch populacjach mieszańcowych, potwierdzono łącznie dla 45 roślin, odpowiednio 19 roślin z populacji F_4BC_2 [(Bogatka × *Pm21*) × Bogatka × *Pm34*] × Bogatka oraz 26 roślin z populacji mieszańcowej [(Nadobna × *Pm21*) × Nadobna × *Pm34*] × Nadobna.

Uzyskano piąte pokolenie F_5BC_2 dwóch populacji mieszańcowych {[(Bogatka × *Pm21*) × Bogatka × *Pm34*] × Bogatka} oraz {[(Nadobna × *Pm21*) × Nadobna × *Pm34*] × Nadobna}, odpowiednio 94 oraz 132 rośliny (łącznie 226 roślin). W warunkach kontrolowanych (fitotron) oceniono odporność wytworzonych dwóch populacji mieszańcowych F_5BC_2 na inokulację izolatem Bgt Kadett. Na podstawie testów fitopatologicznych do selekcji molekularnej wybrano łącznie 168 roślin. Analogicznie do poprzednich etapów selekcji materiału roślinnego w pierwszej kolejności przeprowadzono selekcję materiału roślinnego w celu potwierdzenia obecności genu *Pm21* z wykorzystaniem specyficznego markera *NAU/xibao*. Na podstawie wyników reakcji amplifikacji obecność genu *Pm21* stwierdzono łącznie dla 106 badanych roślin. Przeprowadzono selekcję molekularną materiału roślinnego pod kątem obecności wprowadzanego drugiego genu odporności na mączniaka prawdziwego pszenicy zbóż i traw – *Pm34*. Z wykorzystaniem dwóch markerów mikrosatelitarnych w analizowanych dwóch populacjach mieszańcowych, obecność genu *Pm34* potwierdzono łącznie dla 56 roślin, odpowiednio 22 roślin z populacji F_5BC_2 {[(Bogatka × *Pm21*) × Bogatka × *Pm34*] × Bogatka} oraz 34 roślin z populacji mieszańcowej {[(Nadobna × *Pm21*) × Nadobna × *Pm34*] × Nadobna}.

Otrzymano szóste pokolenie F_6BC_2 dwóch populacji mieszańcowych {[(Bogatka × *Pm21*) × Bogatka × *Pm34*] × Bogatka} oraz {[(Nadobna × *Pm21*) × Nadobna × *Pm34*] ×

Tabela 1. Analiza molekularna (selekcja genów) oraz ocena odporności na mączniaka prawdziwego zbóż i traw
Table 1. Molecular analysis (foreground selection) and assessment of resistance to powdery mildew of cereals and grasses

Pokolenie – Generation		F_4BC_1			F_4BC_2			F_5BC_2			F_6BC_2		
Populacja – Population		[(Bogatka × *Pm21*) × Bogatka × *Pm34*]	[(Nadobna × *Pm21*) × Nadobna × *Pm34*]	Razem – All	[(Bogatka × *Pm21*) × Bogatka × *Pm34*] × Bogatka	[(Nadobna × *Pm21*) × Nadobna × *Pm34*] × Nadobna,	Razem – All	{[(Bogatka × *Pm21*) × Bogatka × *Pm34*] × Bogatka}	{[(Nadobna × *Pm21*) × Nadobna × *Pm34*] ×Nadobna}	Razem –All	{[(Bogatka × *Pm21*) × Bogatka × *Pm34*] × Bogatka}	{[(Nadobna × *Pm21*) × Nadobna × *Pm34*] ×Nadobna}	Razem – All
Ocena fenotypowa – Resistance test		94	94	188	142	168	310	94	132	226	108	144	252
Selekcja molekularna Molecular selection	*Pm21*	45	35	80	61	50	111	41	65	106	56	63	119
	(*Pm21* + *Pm34*)	16	17	33	19	26	45	22	34	56	26	33	56

Nadobna}, odpowiednio 108 oraz 144 rośliny (łącznie 252 roślin). Materiał roślinny poddano selekcji fenotypowej pod kątem odporności na mączniaka prawdziwego zbóż i traw. Reakcją odporności na *B. graminis* charakteryzowało się łącznie 178 roślin F_6BC_2. Następnie, na wszystkich roślinach przeprowadzono selekcję molekularną pod kątem obecności genu *Pm21*. Do dalszego etapu badań wybrano łącznie 119 roślin, na których następnie przeprowadzono identyfikację genu *Pm34* przy użyciu dwóch flankujących markerów SSR. Na podstawie rozdziałów elektroforetycznych, obecność genu *Pm34* zidentyfikowano łącznie u 143 roślin. Zestawiając wyniki z przeprowadzonych selekcji molekularnych, obecność genów (*Pm21* + *Pm34*) potwierdzono u 59 roślin, odpowiednio 26 linii z populacji F_6BC_2 {[(Bogatka × *Pm21*) × Bogatka × *Pm34*] × Bogatka} oraz 33 roślin z populacji mieszańcowej F_6BC_2 {[(Nadobna × *Pm21*) × Nadobna × *Pm34*] × Nadobna}. W tabeli 1. przedstawiono uzyskane wyniki selekcji fenotypowej oraz molekularnej.

Wszystkie otrzymane homozygotyczne linie o profilu odpornościowym (*Pm21* + *Pm34*) zostały przekazane do Krajowego Centrum Roślinnych Zasobów Genowych w Radzikowie IHAR –PIB oraz stanowić będą wyjściowy materiał roślinny, który wykorzystany zostanie w kolejnych pracach badawczych.

Piramidyzacja genów jest skutecznym zabiegiem uzyskania kompleksowej odporności na kilka patogenów i różnych ich ras (patotypów). Kumulacja genów warunkuje odporność na ważne, z rolniczego punktu widzenia, choroby zbóż i przyczynia się do znacznego ograniczenia stosowania środków ochrony roślin. Odporność roślin uprawnych na patogeny i szkodniki powinna być różnorodna genetycznie, trwała i stabilna w czasie oraz efektywna w różnych warunkach środowiskowych. O trwałości piramid genowych stanowią prace badawcze przeprowadzone zarówno w światowych, jak i krajowych programach hodowlanych. W wyniku wieloletnich badań do polskiej odmiany Nadobna oraz niemieckiej odmiany Lexus wprowadzono kombinację dwóch efektywnych genów odporności w kombinacji (*Lr41*(=*Lr39*) + *Pm21*) (Pietrusińska i wsp. 2011, 2013). Wytworzony materiał został następnie włączony do programów hodowlanych prowadzonych przez polskie spółki hodowlane. W duńskich odmianach pszenic spiramidyzowano efektywne geny odporności w kombinacjach: (*Pm4b* + *u*), (*Pm2* + *Pm6* + *Pm8*) oraz (*Pm6* + *u*), które w testach fitopatologicznych charakteryzowały się reakcją odporności w odniesieniu do zastosowanych izolatów (Hysing i wsp. 2007). Elkot i wsp. (2015) wprowadził do indyjskich roślin dwa geny odporności na mączniaka prawdziwego zbóż i traw w połączeniu (*PmTb7A.1* + *PmTb7A.2*). Przy wykorzystaniu markerów molekularnych oraz w warunkach naturalnej infekcji, w doświadczeniach polowych przeprowadzono selekcję roślin o spiramidyzowanym profilu genetycznym (Elkot i wsp. 2015). Na podstawie bieżącej literatury naukowej, brak jest przykładów uzyskania efektywnej piramidy genowej (*Pm21* + *Pm34*), jaka została uzyskana przez zespół prof. Jerzego H. Czembora. Wyselekcjonowane genotypy, charakteryzują się wysoką odpornością na mączniaka prawdziwego zbóż i traw (*B. graminis* f. sp. *tritici*) warunkowaną dwoma efektywnymi genami *Pm* przy jednoczesnym zachowaniu korzystnych, innych cech użytkowych.

Wnioski / Conclusions

1. Markery DNA w sposób efektywny mogą być wykorzystywane w programach hodowlanych opartych na selekcji metodami tradycyjnymi, których celem jest

poszukiwanie źródeł odporności pszenicy ozimej na mączniaka prawdziwego zbóż i traw.

2. Translokacyjna linia 6VS/6AL Yangami 5 (donor genu gen *Pm21*) oraz linia NC97BGTD7 (donor genu gen *Pm34*) mogą być wykorzystywane w programach hodowlanych pszenicy ozimej jako źródła na mączniaka prawdziwego zbóż i traw i stworzenie piramidy genowej (*Pm21* + *Pm34*).
3. Marker *NAU/xibao* oraz markery mikrosatelitarne X*barc177* i X*barc*144, a także oceny fenotypowe prowadzone metodami tradycyjnymi mogą wspomagać programy hodowlane, których celem jest uzyskanie form pszenicy ozimej o wysokiej odporności na mączniaka prawdziwego zbóż i traw, uwarunkowane genami *Pm21* oraz *Pm34* jednocześnie.

Literatura / References

Cao A.Z., Wang X.E., Chen Y.P., Zou X.W., Chen P.D. 2006. A sequence-specific PCR marker linked with *Pm21* distinguishes chromosomes 6AS, 6BS, 6DS of *Triticum aestivum* and 6VS of *Haynaldia villosa*. Plant Breeding 125: 201–205.

Czembor H.J. 2008. Odporność na mączniaka prawdziwego (*Blumeria graminis* f. sp. *hordei*) odmian jęczmienia jarego włączonych do badań rejestrowych w Polsce w latach 2004–2006. [Resistance to powdery mildew (*Blumeria graminis* f. sp. *hordei*) in barley cultivars included in 2004–2006 in registration trials in Poland]. Biuletyn Instytutu Hodowli i Aklimatyzacji Roślin 248: 33–42.

Elkot A.F.A., Chhuneja P., Kaur S., Saluja M., Keller B., Singh K. 2015. Marker Assisted Transfer of two powdery mildew resistance genes *PmTb7A.1* and *PmTb7A.2* from *Triticum boeoticum* (Boiss.) to *Triticum aestivum* (L.). PLoS One 10 (6): e128297.

Higgins C.M., Hall R.M., Campbell R.P., Dietzgen R.G. 2000. PCR rescue and analysis of transgene sequences directly from crude extracts of transgenic embryos and plants. Plant Molecular Biology Reporter 18: 285a–285g.

http://doradca-rolniczy.pl/maczniak-prawdziwy-zboz/ [dostęp: 15.06.2016].

Hysing S.C., Merker A., Liljeroth E., Koebner R.M.D., Zeller F.J., Hsam S.L.K. 2007. Powdery mildew resistance in 155 Nordic bread wheat cultivars and landraces. Hereditas 144: 102–119.

Jańczak C., Pawlak A. 2006. Występowanie i szkodliwość mączniaka prawdziwego (*Blumeria graminis*) w pszenicy ozimej w latach 2003–2005. [An occurrence and harmfulness of powdery mildew (*Blumeria graminis*) on winter wheat in the years 2003–2005]. Progress in Plant Protection/Postępy w Ochronie Roślin 46 (2): 538–542.

Kochman J., Węgorek W. 1997. Ochrona roślin. Choroby infekcyjne. Wyd. V. Plantpress, Kraków: 445–447.

Kowalczyk K., Hsam S.L.K., Zeller F.J. 1998. Identification of powdery mildew resistance genes in common wheat (*Triticum aestivum* L. em. Thell.). XI. Cultivars grown in Poland. Journal of Applied Genetics 39 (3): 225–236.

Liu J., Liu D., Tao W., Li W., Wang S., Chen P., Cheng S., Gao D. 2000. Molecular marker -facilitated pyramiding of different genes for powdery mildew resistance in wheat. Plant Breeding 119: 21–24.

Miranda L.M., Murphy J.P., Leath S., Marshall D. 2006. *Pm34*: a new powdery mildew resistance gene transferred from *Aegilops tauschii* Coss. to common wheat (*Triticum aestivum* L.). Theoretical and Applied Genetics 113: 1497–1504.

Pietrusińska A. 2009. Wprowadzenie do pszenicy ozimej genów odporności *Lr41* na rdzę brunatną (*Puccinia recondita* f. sp. *tritici*) i genu odporności *Pm21* na mączniaka prawdziwego (*Blumeria graminis* f. sp. *tritici*). Rozprawa doktorska. Instytut Hodowli i Aklimatyzacji Roślin – Państwowy Instytut Badawczy. Przegląd literatury: 11–25.

Pietrusińska A. 2010. Wykorzystanie markerów molekularnych do wprowadzania genów odporności na rdzę brunatną (*Puccinia recondita* f. sp. *tritici*) i mączniaka prawdziwego (*Blumeria graminis* f. sp. *tritici*) do pszenicy ozimej. [The use of molecular markers for introduction of leaf rust (*Puccinia recondita* f. sp. *tritici*) and powdery mildew (*Blumeria graminis* f. sp. *tritici*) resistance genes in winter wheat (*Triticum aestivum*)]. Biuletyn Instytutu Hodowli i Aklimatyzacji Roślin 256: 31–54.

Pietrusińska A., Czembor J.H. 2014. Struktura wirulencji populacji *Blumeria graminis* f. sp. *tritici* występującej na terenie Polski w latach 2012–2013. [Virulence structure of the *Blumeria graminis* f. sp. *tritici* population occurring in Poland across 2012–2013]. Biuletyn Instytutu Hodowli i Aklimatyzacji Roślin 274: 15–25.

Pietrusińska A., Czembor J.H. 2015. Piramidyzacja genów - narzędzie powszechne używane w programach hodowlanych pszenicy. [Gene pyramiding - a tool commonly used in breeding programs breeding programs]. Biuletyn Instytutu Hodowli i Aklimatyzacji Roślin 278: 3–16.

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*, as a new effective combination of resistance genes for leaf rust and powdery mildew. Czech Journal of Genetics and Plant Breeding 49: 109–115.

Qi L., Cao M., Chen P., Li W., Liu D. 1996. Identification, mapping, and application of polymorphic DNA associated with resistance gene *Pm21* of wheat. Genome 39: 191–197.

Tratwal A., Jakubowska M. 2004. Ocena przydatności systemów wspomagania decyzji o ochronie pszenicy ozimej przed mączniakiem prawdziwym na terenie Wielkopolski. [Evaluation of decision support systems usefulness in winter wheat chemical control of powdery mildew in Wielkopolska region]. Progress in Plant Protection/Postępy w Ochronie Roślin 44 (2): 1169–1172.