

Występowanie *Puccinia graminis* na pszenicy i pszenżycie, jego zróżnicowanie oraz poszukiwanie fenotypowych, molekularnych i metabolicznych markerów odporności na rdzę źdźbłową

Zadanie nr 8

- Jednostka realizująca:** Politechnika Bydgoska
- Kierownik:** dr hab. inż. Grzegorz Lemańczyk
e-mail: grzegorz.lemanczyk@pbs.edu.pl
- Wykonawcy:** dr hab. inż. Anna Baturó-Cieśniewska
dr hab. inż. Dariusz Kulus
dr inż. Aleksander Łukanowski
dr inż. Natalia Miler
- Pomoc techniczna:** dr Karol Lisiecki
dr inż. Sebastian Sendel
- Rok realizacji zadania:** 2022



Cel badań

Celem zadania jest określenie nasilenia występowania *Puccinia graminis* na pszenicy i pszenżycie w Polsce, stworzenie krajowej kolekcji izolatów tego patogena, zbadanie wrażliwości genotypów zbóż (odmian, rodów, linii hodowlanych) oraz poszukiwania markerów fenotypowych, molekularnych i metabolicznych do identyfikacji genów odporności na rdzę żdźbłowa zbóż i traw.



Realizowane tematy badawcze:

1. Określenie nasilenia występowania rdzy żdźbłowej w uprawach pszenicy i pszenżyta w Polsce.
2. Utworzenie krajowej kolekcji izolatów *Puccinia graminis*.
3. Badania zróżnicowania populacji *Puccinia graminis*.
4. Poszukiwanie markerów molekularnych do identyfikacji genów odporności zbóż na *Puccinia graminis*.
5. Wrażliwość genotypów pszenicy i pszenżyta na *Puccinia graminis*.
6. Poszukiwanie markerów metabolicznych wpływających na odporność zbóż na *Puccinia graminis*.





Temat badawczy 1: **Określenie nasilenia występowania rdzy żdźbłowej w uprawach pszenicy i pszenżyta w Polsce**

Cel tematu badawczego:

Celem tematu jest określenie nasilenia występowania rdzy żdźbłowej w uprawach pszenicy i pszenżyta w Polsce.

Realizacja badań:

Oceniano nasilenie występowania objawów rdzy żdźbłowej zbóż i traw na pszenicy i pszenżycie na polach produkcyjnych oraz poletkach doświadczalnych należących głównie do Centralnego Ośrodka Badania Odmian Roślin Uprawnych zlokalizowanych w różnych rejonach Polski, reprezentujących powierzchnię całego kraju i poszczególnych województw. Ocenę wykonywano również w stacjach doświadczalnych firm hodowlanych. Ponadto oceniano choroby na polach produkcyjnych pszenicy i pszenżyta. Ocenę wykonano w lipcu, pod koniec okresu wegetacyjnego. Objawy porażenia potwierdzano w warunkach laboratoryjnych.



Obserwacje na polach produkcyjnych pszenicy i pszenżyta



Obserwacje w Stacjach Doświadczalnych Oceny Odmian COBORU



Obserwacje na poletkach doświadczalnych firm hodowlanych





Temat badawczy 2: **Utworzenie krajowej kolekcji izolatów *Puccinia graminis***

Cel tematu badawczego:

Celem tematu jest utworzenie krajowej kolekcji izolatów *Puccinia graminis* przez pozyskanie zarodników letnich sprawcy rdzy żdźbłowej (uredospor).

Realizacja badań:

Podczas wykonywania ocen nasilenia występowania objawów rdzy żdźbłowej pobierano próbki, na które składały się fragmenty żdźbeł roślin pszenicy, pszenżyta a także żyta z objawami tej choroby. Próbki te pobierano z odmianowych poletek doświadczalnych COBORU i należących do firm hodowlanych, zlokalizowanych w różnych rejonach Polski. W laboratorium została potwierdzona przynależność gatunkowa zebranych izolatów, a następnie ich zarodniki zostały przeniesione do probówek typu Eppendorf i umieszczone w temperaturze -75°C .

W trakcie prowadzonych badań pozyskano 155 próbek żdźbeł z objawami rdzy żdźbłowej (głównie z pszenicy). Przeprowadzono selekcję i spośród nich wybrano 40 izolatów *P. graminis*.

Fragment roślin z urediniami *P. graminis* pobierany do laboratorium w celu stworzenia kolekcji izolatów



Fragmenty żdźbeł z uredosporami *P. graminis* zebrane z różnych lokalizacji





Temat badawczy 3: **Badania różnicowania populacji *Puccinia graminis***

Cel tematu badawczego:

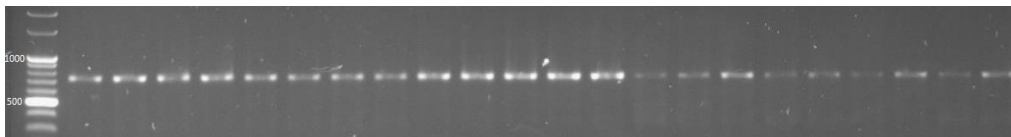
Celem tematu jest określenie stopnia różnicowania genetycznego populacji *Puccinia graminis*

Realizacja badań:

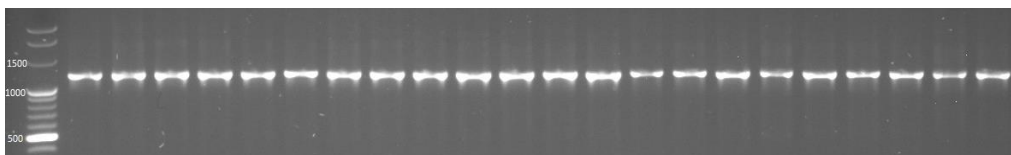
Przeprowadzono analizy molekularne celem potwierdzenia identyfikacji grzyba rdzawnikowego, zdiagnozowanego na podstawie morfologii i objawów na źdźbłach zbóż jako *P. graminis* przy pomocy analizy sekwencji regionów ITS (internal transcribed spacer) i LSU (large subunit) oraz określono jego różnicowania genetycznego na podstawie analizy porównawczej badanych próbek oraz sekwencji zdeponowanych w GenBank NCBI. Materiał badawczy stanowiły 33 próbki pobrane z pszenicy, 3 z pszenżyta oraz 4 z żyta, na których stwierdzono objawy chorobowe sugerujące infekcję grzybem *P. graminis*.



Wynik elektroforezy 22 próbek wykonanej w celu weryfikacji obecności produktów amplifikacji regionów ITS przed sekwencjonowaniem



Wynik elektroforezy 22 próbek wykonanej w celu weryfikacji obecności produktów amplifikacji regionu LSU przed sekwencjonowaniem



Dendrogram sporządzony na bazie sekwencji LSU obrazujący powiązania pomiędzy badanymi izolatami *P. graminis* a wybranymi sekwencjami z GenBank NCBI

- Pg92Ta21 - Nowy Lubliniec PK Triticum aestivum
- Pg367Sc21 - Marianowo PL Secale cereale
- Pg306Sc21 - Minikowo KP Secale cereale
- Pg1Ta21 - Dukla PK Triticum aestivum
- Pg145Ta21 - Krzeczowice PK Triticum aestivum
- Pg143Ta21 - Krzeczowice PK Triticum aestivum
- Pg13Ta21 - Dukla PK Triticum aestivum
- Pg136Ta21 - Krzyzewo PL Triticum aestivum
- Pg116Ta21 - Słupia SK Triticum aestivum
- MT965637 - United Kingdom Festuca ovina
- MT965648 - United Kingdom Dactylis glomerata
- MT965559 - Hungary Lolium perenne
- MK952783 - China Dactylis glomerata
- MK952782 - China Fagopyrum dibotrys
- KY798400 - USA Festuca sp.
- KY798389 - USA Poa annua
- KY764124 - USA Triticum aestivum
- KM249852 - Australia Glyceria maxima
- HQ412648 - Oman Hordeum sp.
- AF522177 - USA żywiciel nieznan
- KY798370 - USA Elymus semicostatus

Numery akcesyjne sekwencji LSU izolatów *P. graminis* zdeponowanych w GenBank w NCBI wraz z informacją o ich pochodzeniu

Symbol izolatu	Roślina żywicielska	Miejscowość pobrania	Województwo	Numer akcesyjny w GenBank
Pg1Ta21	<i>Triticum aestivum</i>	Dukla	podkarpackie	OP926044
Pg13Ta21	<i>Triticum aestivum</i>	Dukla	podkarpackie	OP926046
Pg92Ta21	<i>Triticum aestivum</i>	Nowy Lubliniec	podkarpackie	OP926045
Pg116Ta21	<i>Triticum aestivum</i>	Słupia	świętokrzyskie	OP926903
Pg136Ta21	<i>Triticum aestivum</i>	Krzyżewo	podlaskie	OP926902
Pg143Ta21	<i>Triticum aestivum</i>	Krzeczowice	podkarpackie	OP926904
Pg145Ta21	<i>Triticum aestivum</i>	Krzeczowice	podkarpackie	OP926906
Pg306Sc21	<i>Secale cereale</i>	Minikowo	kujawsko-pomorskie	OP926907
Pg367Sc21	<i>Secale cereale</i>	Marianowo	podlaskie	OP926909



Temat badawczy 4: **Poszukiwanie markerów molekularnych do identyfikacji genów odporności zbóż na *Puccinia graminis***

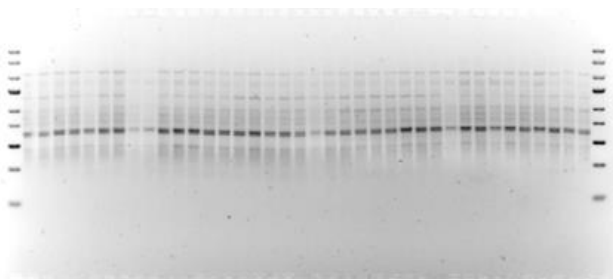
Cel tematu badawczego:

Celem tematu jest oznaczenie zróżnicowania genetycznego badanych grup roślin (gatunków, odmian, rodów, linii), wskazanie najlepszego systemu markerowego do identyfikacji genotypów u badanych gatunków oraz wskazanie potencjalnych genetycznych markerów odporności wspomagających hodowlę opartą na markerach (marker-assisted breeding).

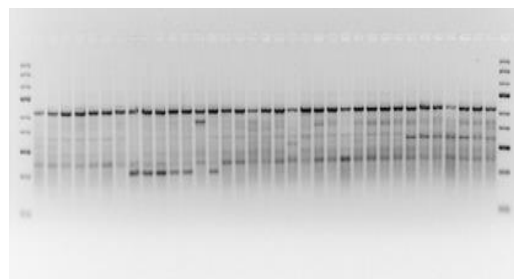
Realizacja badań:

Dla 10 genotypów pszenicy i 10 genotypów pszenżyta przeprowadzono analizy dotyczące molekularnych markerów odporności. Ze względu na brak genotypów mogących stanowić linie kontrolne w badaniach nie zastosowano obiektów kontrolnych, do których można by odnosić uzyskane wyniki badań. Badanie zróżnicowania genetycznego wyselekcjonowanych genotypów pszenicy i pszenżyta oparto na systemach markerowych SCoT (Start Codon Targeted), RAPD (Randomly Amplified Polymorphic DNA) oraz ISSR (Inter-Simple Sequence Repeat). Z bazy internetowej maswheat.ucdavis.edu wybrano 10 markerów genów odporności. Przeprowadzono reakcję PCR z wykorzystaniem starterów flankujących wybrany gen odporności.

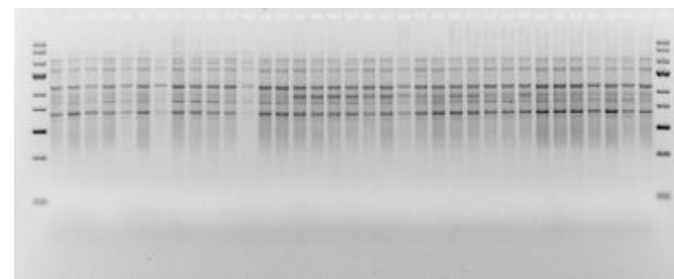
Przykładowe obrazy wzorów prążków DNA uzyskane na żelu agarozowym po rozdiale elektroforetycznym produktów PCR wykonanych zgodnie z założeniami danego systemu markerowego: RAPD, ISSR i SCoT



RAPD starter



ISSR starter



SCoT starter



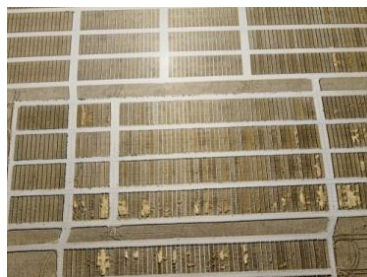
Temat badawczy 5: **Wrażliwość genotypów pszenicy i pszenżyta na *Puccinia graminis***

Cel tematu badawczego:

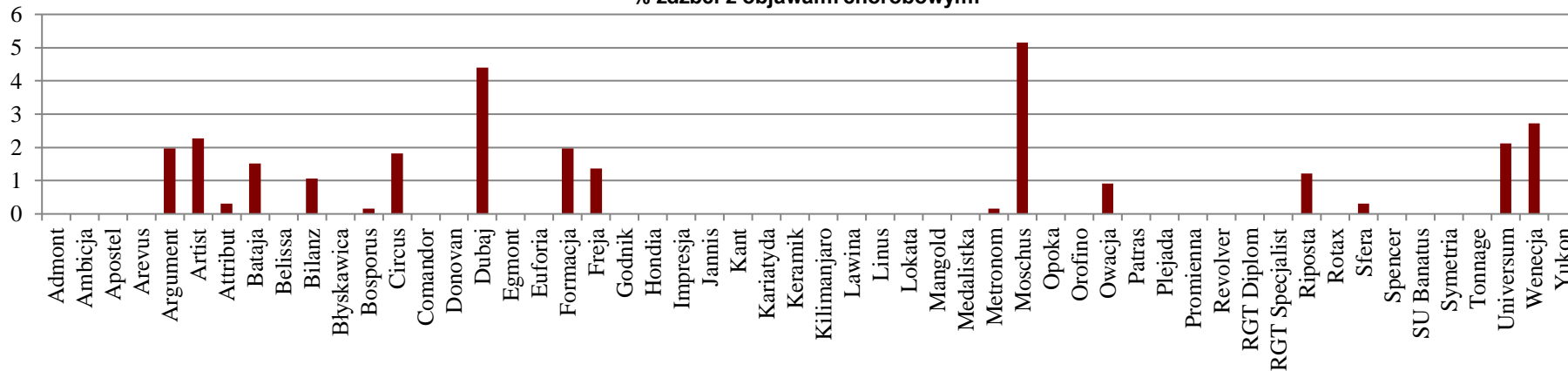
Celem tematu badawczego jest scharakteryzowanie genotypów pszenicy i pszenżyta (odmian, rodów hodowlanych) pod kątem wrażliwości na rdzę żdźbłąwą.

Realizacja badań:

Badania wrażliwości genotypów pszenicy i pszenżyta badano na poletkach doświadczalnych firm hodowlanych, w Stacjach Doświadczalnym Oceny Odmian COBORU, Rolniczym Zakładzie Doświadczalnym PBŚ oraz w warunkach szklarniowych, określając nasilenie rdzy żdźbłowej jako % żdźbeł z objawami chorobowymi



Nasilenie rdzy żdźbłowej w zależności od genotypu pszenicy uprawianej w Stacji Doświadczalnej Oceny Odmian w Węgrzcach
- % żdźbeł z objawami chorobowymi





Temat badawczy 6: **Poszukiwanie markerów metabolicznych wpływających na odporność zbóż na *Puccinia graminis***

Cel tematu badawczego:

Wytypowanie potencjalnych mechanizmów obronnych przeciw *P. graminis* wśród badanych roślin na podstawie obecności i aktywności markerów molekularnych.

Realizacja badań:

10 genotypów (odmian / linii hodowlanych) reprezentujących każdy z badanych gatunków (pszenica i pszenżyto; łącznie 20 genotypów), badanych jest pod kątem występowania cech oporności.

Prowadzone są analizy dotyczące występowania metabolicznych markerów odporności. Oznaczana jest aktywność enzymów (białek PR) oraz zawartość wybranych związków organicznych biorących udział w odpowiedzi na infekcję *P. graminis*, t.j. chitynazy, β -1,3-glukanazy, jak również markery metaboliczne biorące czynny bezpośredni i pośredni udział w procesach obronnych. W ramach analiz biochemicznych i patofizjologicznych, dotyczących identyfikacji i wykorzystania metabolicznych markerów odporności na porażenie przez *P. graminis* prowadzone są następujące analizy:

- Analiza aktywności β -1,3-glukanaz oraz chitynaz, jako wskaźnik potencjału zwalczania bezpośredniego infekcji powodowanych przez *P. graminis*.
- Analiza zawartości wolnych cukrów i stopnia zawartości skrobi, jako wskaźnik zapotrzebowania energetycznego tkanek roślin w przeciwdziałaniu infekcji *P. graminis*.
- Analiza zawartości wolnych związków fenolowych, jako wskaźnik potencjału antyoksydacyjnego tkanek roślin jak również stopnia uwalniania/wiązania/wzmacniania struktury ściany komórkowej.
- Analiza zawartości H_2O_2 w tkankach wraz z barwieniem histochemicznym, jako wskaźnik potencjału zwalczania bezpośredniego (cytotoksyczność) jak również pośredniego przez indukowanie kaskady procesów obronnych.

