

*Jerzy Chelkowski, Krzysztof Sznajder
Instytut Genetyki Roślin PAN w Poznaniu*

Identyfikacja genów odporności na patogeny u roślin zbożowych metodami molekularnymi

Słowa kluczowe: patogeny zbóż, geny odporności, markery molekularne

Wstęp

W poprzedniej pracy [6] dokonano przeglądu piśmiennictwa z zakresu molekularnych metod identyfikacji patogenów zbóż do roku 1999. W tej pracy omówiono możliwości identyfikacji genów odporności roślin zbożowych na patogeny i możliwości zastosowania tych metod, przedstawione w pracach opublikowanych do końca roku 1999. Problematyka badań nad genami odporności realizowana jest na pograniczu kilku dziedzin nauki: fitopatologii, genetyki, biologii molekularnej i hodowli roślin, i wymaga ścisłej współpracy różnych specjalistów [1]. W pracach nad genami odporności napotyka się terminologię genetyczną i fitopatologiczną, co powoduje niejednokrotnie nieporozumienia w posługiwaniu się nazewnictwem.

Dziedziczona genetycznie odporność roślin zbożowych (jak i innych grup roślin uprawnych) na patogeny i powodowane przez nie choroby związana jest z obecnością i ekspresją genów odporności określanych w skrócie genami R. Szczegóły dotyczące odporności roślin na choroby i interakcji roślina-patogen znajdzie czytelnik w pracach Boreckiego [4] i Arseniuka [1].

Geny odporności

W tabeli 1 zestawiono dotychczas poznane geny odporności zbóż na patogeny grzybowe, tak biotrofy, jak i nekrotrofy. Na rysunku 1 przedstawiono schematycznie lokalizację genów Pm i Lr oraz QTL na chromosomach pszenicy genomów A, B i D. Metodami genetycznymi poznano ponad 200 genów odporności u zbóż, w tym 25 genów Pm odporności na *Erysiphe graminis* f. sp. *tritici*, powodującego mączniaka prawdziwego pszenicy, i 44 genów Lr odporności na *Puccinia recondita* f. sp. *tritici*, sprawcę rdzy brunatnej u pszenicy [7, 38]. W ostatnich dziesięciu latach identyfikacji

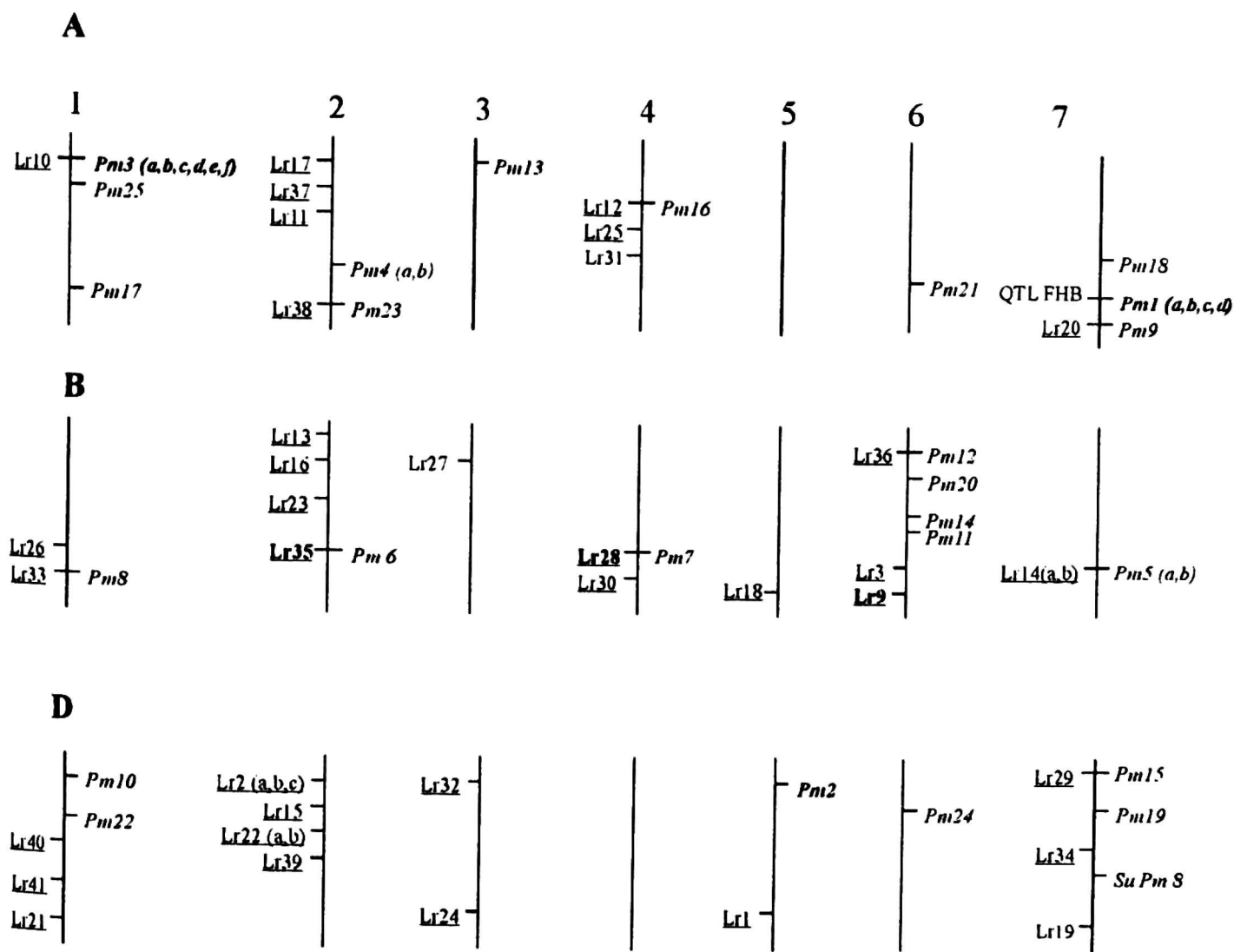
genów odporności dokonywano na podstawie łączenia metod genetycznych i testów inokulacyjnych z fizycznym i genetycznym mapowaniem za pomocą sond molekularnych – markerów RFLP [7, 12, 13, 15, 16, 42, 43, 44, 46, 48], a ostatnio także techniki AFLP [3].

Tabela 1. Oznaczenia zidentyfikowanych genów odporności roślin zbożowych na patogeny

Oznaczenie symboli genów odporności	Liczba zidentyfikowanych genów odporności	Choroba, na którą geny zapewniają odporność
Lr	45	rdza liściowa pszenicy i żyta [38]
Sr	38	rdza źdźbłowa [38]
Yr	18	rdza żółta [38]
Pm	25	mączniak prawdziwy pszenicy [7, 44]
Rph	14	rdza liściowa jęczmienia [36]
Mlo (ml-o)	grupa genów długości 30 kb.	geny pochodzenia mutacyjnego, nieodpowiadające teorii gen-na-gen, dające odporność jęczmienia na wszystkie rasy mączniaka jęczmienia [19]; locus Mlo zlokalizowano na chromosomie 4L [45]
Mla	30 genów (11 grup alleli)	geny odporności na mączniaka jęczmienia pochodzące od <i>Hordeum spontaneum</i> , zlokalizowane na chromosomie 1H [18]
MI(La)		geny odporności pochodzące z <i>Hordeum laevigatum</i> , zlokalizowane na chromosomie 2 [12]
Rcs	2	geny kontrolujące odporność jęczmienia na <i>Cochliobolus sativus</i> ; w stadium siewki na chr. 1P, u roślin dorosłych na chr. 5P [47]
Rpt	5	geny kontrolujące odporność jęczmienia na <i>Pyrenophora teres</i> , w stadium siewki, zlokalizowane na chromosomach 4 i 6, u roślin dorosłych na chromosomach 1,2 i 3 [47]
Rrs	13	geny odporności jęczmienia na <i>Rhynchosporium</i> , zlokalizowane na chromosomach 1S, 6H [13]
Geny ypr (1-3)- β -glukanazy	~7 genów	geny uaktywniane po infekcji przez różne patogeny, zlokalizowane na chromosomic 3HL [24]

Poniższe geny odporności zapewniają całkowitą odporność na pojedyncze populacje wirulencji czy rasy fizjologiczne patogenów.

Geny: Lr, Sr, Yr, Pm, Rph, Mlo, Mla, MI(La) zostały zidentyfikowane genetycznie, choć kilka z nich naniesiono na mapy chromosomowe za pomocą markerów RFLP. W zamieszczonej w tabeli 1 pierwszej grupie czterech genów symbole literowe odpowiadają pierwszym literom angielskim nazw chorób, na które geny te warunkują



Rysunek 1. Schematyczne rozmieszczenie genów odporności Pm i Lr oraz QTL odporności na *Fusarium* na chromosomach pszenicy genomów A, B i D

odporność, a więc: Lr — leaf rust (rdza liściowa, czyli brunatna), Sr — stem rust (rdza żdźbłowa), Yr — yellow rust (rdza żółta) i Pm — powdery mildew (mączniak prawdziwy), Ml — mączniak prawdziwy jęczmienia.

Geny Rcs, Rpt, Rrs oraz gen kodujący białko ypr (1-3)- β -glukanazy naniesiono na mapę genetyczną jęczmienia metodami molekularnymi. Przy oznaczaniu genów odporności identyfikowanych w ostatnich latach ich skrót literowy poprzedza litera R. przed skrótem literowym łacińskiej nazwy patogena, np. Rrs — gen odporności na *Rhynchosporium secalis* (tab. 1).

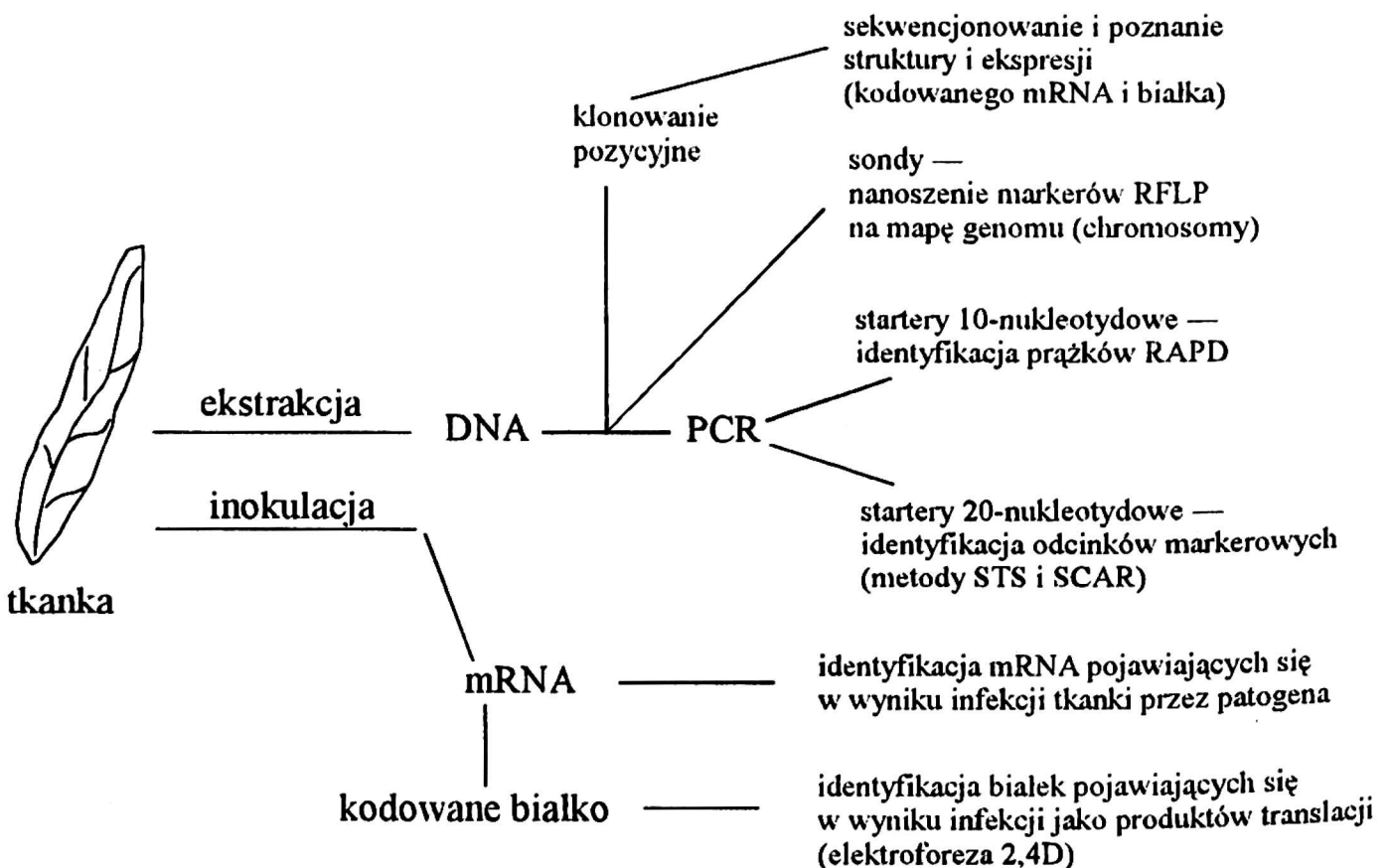
Metody identyfikacji genów odporności na patogeny

Identyfikacja genów odporności na patogeny biotroficzne (patogeny powodujące rdze i mączniaka) jest dokonywana metodą inokulacji zestawami izolatów ras patogena, zawierających określone geny wirulencji [21, 28, 50, 51]. Geny odporności można lokalizować na chromosomach za pomocą tzw. populacji mapujących i zestawów linii (near izogenic lines — skrót NILs) lub też zestawów linii podwojonych haploidów (li-

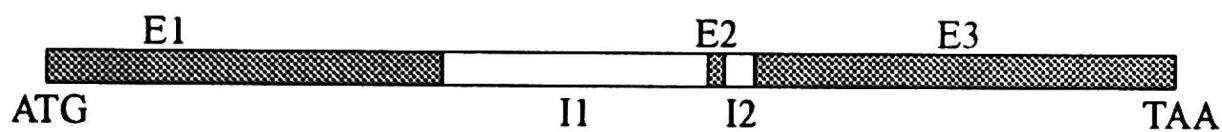
nii DH). Przykładem może być naniesienie na mapę jęczmienia genów odporności Rpt na *Pyrenophora teres* i genów Rcs odporności na *Cochliobolus sativus*, przy wykorzystaniu 150 linii DH wyprowadzonych z odmian Streptoe i Morex [47].

Prace molekularne nad genami odporności u zbóż i innymi genami roślin mają na celu poznanie zarówno struktury genu, czyli sekwencji zasad całego genu, jednego lub kilku egzonów i intronów (średnio około 2000–10000 bp), w tym sekwencji odcinka kodującego i promotora, jak i funkcji tego genu, a więc kodowanego przez ten gen białka oraz jego funkcji w metabolizmie (aktywności enzymatycznej) lub strukturze komórki. Dopiero poznanie wszystkich tych elementów pełniej charakteryzuje dany gen. Dokładne molekularne badania nad poznaniem genów odporności prowadzono na dwóch roślinach modelowych — rzodkiewniku pospolitym (*Arabidopsis thaliana*) oraz pomidorze, a wyniki tych prac opublikowano w ostatnich latach [22]. Dokładnie scharakteryzowany od strony molekularnej jako pierwszy dla zbóż był gen Lr10 pszenicy, opracowany przez zespół ze Szwajcarii [10, 11]. Sklonowany odcinek DNA tego genu położonego na chromosomie A ma długość 3878 bp, z czego część kodująca zawiera 3 egzony i 2 introny (rys. 3), koduje on białko nazwane kinazą odpornościową LRK10 o cechach białka receptorowego, o określonej sekwencji aminokwasów [10].

Drugim genem odporności, który sklonowano i poznano jego sekwencję, jest gen Mlo pochodzenia mutacyjnego, warunkujący odporność jęczmienia na wszystkie



Rysunek 2. Schematyczne przedstawienie możliwości identyfikacji genów odporności u zbóż metodami molekularnymi



Rysunek 3. Schemat genu Lr10: ATG — kodon początkowy, TAA — kodon końcowy, I1, I2 — introny, E1, E2, E3 — egzony

rasy mączniaka porażające jęczmień, zlokalizowany na chromosomie 4L. Locus Mlo okazał się w rzeczywistości grupą genów (długości 30 kb) pochodzenia mutacyjnego, nieodpowiadającego teorii „gen na gen”. Locus Mlo koduje białko o łańcuchu długości 60 kD, wchodzące w skład błony cytoplazmatycznej jęczmienia [20, 45].

Identyfikacji genu i naniesienia na mapę chromosomową dokonuje się różnymi metodami, np. sondami RFLP, poprzez detekcję specyficznego mRNA czy kodowanego białka, jak i produktu jego ekspresji. Umożliwia ona zaprojektowanie specyficznych starterów i opracowanie metod jego identyfikacji metodą PCR, co omówione zostanie niżej (rys. 3).

Geny kodujące białka odpornościowe PR

W latach 80. odkryto białka odpornościowe u roślin, nazwane w skrócie białkami PR (od ang. nazwy pathogenesis related). Przykładem mogą być białka PR2, które wykazują aktywność β -glukanazy. Geny kodujące β -glukanazy u jęczmienia zlokalizowano na chromosomie 3 [24]. Są one uaktywniane po infekcji roślin jęczmienia przez różne patogeny. Białka PR w niektórych wypadkach stanowiły około 10% sumy białek rozpuszczalnych liści roślin. Oznaczono je jako PR1-PR11, a odpowiadające im geny *ypr1-ypr11*. Okazało się, że białka te nie pojawiają się w porażonych tkankach roślin wtedy, gdy ma miejsce infekcja przez patogena o określonej formie specjalnej i rasie fizjologicznej. Metabolity będące produktami ekspresji genów, uaktywniane w tkankach roślin w wyniku ich infekcji przez patogeny biotroficzne, są słabo poznane. Niemniej białka odpornościowe PR cechują się tym, że są wynikiem ekspresji powodowanej infekcją przez patogeny wirusowe, bakteryjne i grzybowe, a takie metabolity, jak kwas salicylowy i jasmonian, wzmagają ich wytwarzanie w roślinach oraz ogólną odporność roślin na choroby powodowane przez patogeny polifagiczne. Genom kodującym białka PR przypisywanych jest wiele innych funkcji w roślinie, szczególnie w fazie generatywnej [52]. Geny te nie są analogiczne z genami odporności na patogeny wymienione w tabeli 1, choć początkowo tak sądzono.

Populacje wirulencji patogenów

Każdy z regionów geograficznych cechuje się występowaniem odmiennej grupy ras fizjologicznych poszczególnych patogenów [4]. W ostatnich dwóch dekadach do badań nad patogenami biotroficznymi wprowadzono pojęcie populacji wirulencji kompatybilnych do poszczególnych genów odporności. W ramach krajów Unii Europejskiej, jak i krajów nienależących do UE utworzono międzynarodową grupę współpracy nad patogenami zbóż. W ramach tej współpracy określono m.in. najczęściej występujące grupy wirulencji mączniaka prawdziwego pszenicy. Są to grupy wirulencji Pm1, Pm2, Pm3, Pm4, Pm5, Pm6, Pm8 i Pm9 [21, 32, 51]. W Europie Zachodniej zidentyfikowano też 50 populacji wirulencji *Puccinia recondita* f. sp. *tritici*, z których cztery dominowały i stanowiły 64% izolatów [25, 32], a wszystkie były awirulentne wobec grupy genów odporności rdzy brunatnej, a mianowicie: Lr9, Lr19, Lr21, Lr24, Lr25 i Lr29.

Poważne nasilenie chorób grzybowych w uprawach zbóż, stwierdzenie braku skuteczności ochrony chemicznej, narastanie tendencji proekologicznych w rolnictwie i opracowanie nowych metod analizy DNA organizmów żywych przyspieszyły w ostatnich latach realizację prac molekularnych nad genami odporności u tych roślin. W pracach tych łączone są metody genetyki klasycznej z metodami molekularnymi.

Metody molekularne badań nad genami

W najnowszych pracach nad DNA roślin wyróżnia się dwa różne spojrzenia na geny odporności na stresy u roślin — przyjmując, że odporność jest cechą dziedziczną jednogenowo lub też wielogenowo. W związku z tym wyodrębnia się dwie grupy genów odporności. Pierwsza grupa obejmuje geny R (putative resistance genes), w których wyróżnia się klasę RGAs (resistance gene analogs) — analogi genów odporności. Zawierają one konserwatywne motywy (sekwencje) w klasie genów zawierających domeny, wiążące nukleotydy (NBC), i domeny bogate w leucynę (LRR). Geny zawierające domeny NBC-LRR obecne są u różnych grup roślin [22]. Dobrze scharakteryzowany gen tej klasy Cre3, warunkujący odporność pszenicy (*Triticum tauschii*) na nicienie (cereal cyst nematode — *Heterodera avenae* Woll.), został wykorzystany dla przygotowania sond i zmapowania homologicznych loci w genomie pszenicy zwyczajnej (*T. aestivum*). Loci homologiczne występowały na wszystkich 7 chromosomach pszenicy. Podobieństwo składu aminokwasowego kodowanych przez nie białek do składu aminokwasowego kodowanego przez sekwencję z locus Cre wynosiło 30–70% [46]. Geny tej grupy występują też w genomach innych zbóż — jęczmieniu i ryżu [23]. Zmapowano 29 loci, z których 3 występowały w genomach A, B i D, a 6 w dwóch genomach (A i B lub B i D). Nie udało się jednak żadnego z tych loci

powiązać ze znanymi genami odporności naniesionymi na genom pszenicy (rys. 1). Geny R najprawdopodobniej kodują białka receptorowe — odbierające sygnał infekcji. Przykładem takiego genu jest omówiony wyżej gen Lr10. Salamini [39] wyraził pogląd, że to właśnie geny z tej grupy są najbardziej obiecujące dla poprawy odporności roślin na agrofagi na drodze transformacji.

Druga grupa to geny DR (defence response) — geny reakcji obronnej, określane też genami QTL — loci cech ilościowych odporności [9]. Naniesiono na mapę pszenicy ponad 50 loci, reprezentujących kilka klas genów reakcji obronnej, za pomocą 508 markerów mapy pszenicy i 36 klonów reprezentujących 7 klas genów. Grupa ściśle sprzężonych genów DR na chromosomie 7B, w skład którego wchodziły geny kodujące katalazę, chitynazę, thaumatyny i regulatory kanałów jonowych, wykazywała największy wpływ na reakcję odporności na naturalną infekcję na rdzę brunatną roślin dorosłych. Jak dotąd wyróżniono 25 genów głównych Pm odporności na mączniaka prawdziwego pszenicy (*E. graminis*). Geny te zapewniają odporność na określone populacje wirulencji. Równocześnie odporność danej odmiany pszenicy na patogena jest wypadkową ekspresji licznych genów, z których każdy warunkuje odporność cząstkową. Geny te mogą występować w grupach określanych jako QTL — loci cech ilościowych [3]. Sumarycznie ich działanie przyczynia się do zadowalającej trwałej odporności roślin w warunkach uprawy polowej. Dzięki obecności genów tej grupy uzyskano znaczną tolerancję odmian pszenicy na porażenie przez mączniaka w Wielkiej Brytanii (J. Brown — informacja ustna).

Powyższe prace wnoszą wiele danych dla identyfikacji i działania genów odporności. Wykazują one, że dla wielu patogenów cecha odporności na choroby funkcjonuje tak jak cechy ilościowe z udziałem kilku sprzężonych genów.

Markery molekularne pośrednie umożliwiające identyfikację genów odporności

Genomy roślin zbożowych, a szczególnie genom pszenicy, mają znaczną wielkość i duży procent sekwencji niekodujących, repetytywnych w DNA. Najprostszy genom wśród roślin zbożowych ma ryż i stąd najbardziej zaawansowane jest poznanie genomu tego gatunku (tab. 2). Prowadzone są prace porównawcze nad genami odporności u ryżu i innych zbóż [11].

W ostatnich latach pojawiło się w piśmiennictwie wiele danych o pośrednich markerach molekularnych opracowanych dla identyfikacji genów odporności roślin zbożowych typu RFLP, RAPD i STS [54]. Wiele markerów naniesiono na mapy genetyczne i fizyczne genomu zbóż. Przy znacznej liczbie naniesionych markerów i dużym ich zagęszczeniu zlokalizowano dość dokładnie położenie genów odporności na chromosomie [27, 40, 44]. Markery specyficzne, typu STS lub SCAR, opracowano

Tabela 2. Wielkość genomów roślin zbożowych [2]

Roślina	Wielkość genomu (Mbp)
Ryż	415–439
Kukurydza	2292–2716
Pszenica	15966
Jęczmień	4873
Owies	11315

Tabela 3. Markery DNA pośrednie opracowane dla identyfikacji genów odporności na mączniaka prawdziwego u pszenicy

Geny odporności	Lokalizacja na chromosomie	Pochodzenie genu	Typ markera DNA i pozycja literatury
Pm1a	7AL	<i>T. aestivum</i>	RAPD, OPG-111900 RFLP [15, 17]
Pm1b	7AL	<i>T. monococcum</i>	
Pm1d	7AL	<i>T. spelta</i> var. <i>duham</i>	
Pm2	5DS	<i>Ae. squarrosa</i>	RAPD, OPG-111900 RFLP [15]
Pm3a	1AS	<i>T. aestivum</i>	STS [29] RFLP [16]
Pm3b	1AS	<i>T. aestivum</i>	
Pm3c	1AS	<i>T. aestivum</i>	
Pm3d	1AS	<i>T. aestivum</i>	
Pm3e	1AS	<i>T. aestivum</i>	
Pm3f	1AS	<i>T. aestivum</i>	
Pm4a	2AL	<i>T. durum</i>	RFLP [44]
Pm4b	2AL	<i>T. carthlicum</i>	
Pm13	3S	<i>Ae. longissima</i>	RFLP, RAPD, STS, DDRT-PCR [5]
Pm18 (Pm1c)	7AL	<i>T. aestivum</i>	RAPD, OPG-111900 RFLP [15]
Pm25	1A	<i>T. beoticum</i>	RAPD OPX061050 OPAG04950 OPAI14600 [44]

dotąd dla niewielkiej liczby genów odporności. W tabeli 3 zestawiono opisane dotychczas markery DNA dla wykrywania genów odporności na mączniaka u pszenicy, a w tabeli 4 markery dla genów odporności na rdzę liściową pszenicy. Startery (RAPD lub STS) pozwalają na wykrycie na żelu poliakrylamidowym lub agarowym pasm amplifikowanego w reakcji PCR odcinka DNA, leżącego na chromosomie w bliskim sąsiedztwie właściwego genu odporności [8]. Idealnym markerem jest część DNA genu odporności (marker bezpośredni), amplifikowana przy udziale odpowiednich starterów metodą PCR. Aktualnie takie markery opracowano dla genu Lr10, gdyż poznana jest jego całkowita sekwencja [10]. Gen ten nie zapewnia jednak odporności pszenicy na populacje rdzy występujące w Polsce i Europie. Marker STS zastosowano do identyfikacji genu odporności Lr10 w 50 odmianach i liniach hodowlanych pszenic europejskich. Zestaw zaprojektowanych starterów Lrk10 D1, Lrk10 D2 (tab. 4) w reakcji PCR powodował amplifikację dwóch prążków długości 282 bp i 362 bp. Sekwencjonowanie wykazało, że różne długości prążków pochodzą od dwóch insercji i mutacji obecnych w jednym z alleli: jeden (282 bp) występował w 6 odmianach, a drugi, dłuższy (362 bp) w 15. Obecność odcinków markerowych w odmianach była zgodna z odpornością na populację wirulencji Lr10, testowaną po inokulacji (41). Podobna sytuacja może występować przy identyfikacji innych genów odporności.

Najwcześniej opracowano markery wykorzystujące polimorfizm fragmentów restrykcyjnych, czyli RFLP (restriction fragment length polymorphism). W metodzie RFLP wykorzystuje się dostępne, znakowane sondy molekularne. DNA wyizolowane preparatywnie z tkanki roślinnej i dobrze oczyszczone poddaje się działaniu enzymów restrykcyjnych, tnących nić w określonych miejscach. Fragmenty te rozdziela się na żelu metodą elektroforezy, przenosi na membranę nylonową metodą Southerna, a następnie hybryduje ze znakowaną sondą o znanej sekwencji. Jeśli hybrydyzacja zachodzi, to na kliszy uzyskuje się sygnał w postaci prążka. Wykorzystanie dziesiątek, a nawet setek sond pozwala na uzyskanie nasyconej mapy okolicy badanego genu odporności i wybór markera leżącego najbliżej poszukiwanego genu, to jest najściślej z nim sprzężonego, najlepiej w odległości mniejszej od 1 cM (1 cM odpowiada u *A. thaliana* u około 200 000 par zasad a u pszenicy 1–3 Mbp). Taka bliska odległość powoduje, że szansa przerwania tego sprzężenia w wyniku crossing-over jest niewielka, a więc w potomstwie markerowy odcinek DNA będzie obecny we wszystkich osobnikach z genem odporności, a nie będzie obecny w osobnikach, które nie odziedziczyły genu odporności. Opracowanie markera RFLP jest na ogół wstępem do uzyskania prostszych w użyciu markerów RAPD i STS (sequence tagged site), nazywanych też markerami SCAR (sequence characterized amplified region). Markery RAPD w wypadku pszenicy dają mało powtarzalne wyniki [8], dlatego przekształca się je w markery typu STS lub SCAR.

Amplifikacja fragmentu, z którym hybryduje sonda, i określenie jego sekwencji pozwala na zaprojektowanie pary specyficznych starterów. Startery te, określane

jako „forward” i „reverse”, w reakcji PCR pozwalają na amplifikację markerowego odcinka DNA długości 200–1000 bp i jego wykrycie po elektroforezie na żelu [49].

Tabela 4. Markery DNA opracowane dla identyfikacji genów odporności na rdzę liściową pszenicy

Gen	Lokalizacja	Pochodzenie genu	Typ markera DNA i źródło
Lr9	6BL	<i>Aegilops umbellulata</i>	RFLP cMW 684 STS [43]
Lr10	1AS	<i>Thatcher Lr10</i>	RFLP [11], STS [10, 41]
Lr19	7DL	<i>Agropyron elongatum</i>	RFLP [34]
Lr21	1DL	<i>Triticum tauschii</i>	
Lr24	3DL	<i>Agropyron elongatum</i>	RFLP PSR 1205, PSR 1203, PSR 388, PSR 904, PSR 931, PSR 1067 RAPD OPJ-09 STS; J09/1 i J09/2 [42]
Lr25	4AB	Rosen Rye	RAPD [35]
Lr28	4BL	<i>Aegilops speltoides</i>	RAPD OPJ-01 [31]
Lr29	7DS	<i>Agropyron elongatum</i>	RAPD [35]
Lr35	2B	<i>Triticum speltoides</i>	RFLP, STS [40]

Skróty w tabelach 3 i 4 oznaczają:

A, B, D — genomy składające się na genom pszenicy zwyczajnej;

S — genom *Triticum speltoides* (zaraz za numerem chromosomu);

S — krótkie ramię chromosomu (numery chromosomów 1–7);

L — długie ramię chromosomu.

Lokalizacja na chromosomie oznacza połączenie genu na odpowiednim chromosomie i na jego krótszym (S) lub dłuższym (L) ramieniu, co pomaga wyjaśnić rysunek 1.

Zaprojektowanie starterów reakcji PCR ściśle dla genu odporności uwarunkowane jest poznaniem sekwencji genu. Jest możliwe poznanie takiej sekwencji dwiema metodami:

- poprzez sklonowanie i zsekwencjonowanie genu [10],
- poprzez naniesienie w okolice odcinka DNA, zawierającego gen R, licznych sond molekularnych RFLP i poznanie tym sposobem sekwencji genu lub jego części [5, 12, 13, 15, 17, 18, 44].

Udało się uzyskać mapy chromosomów pszenicy z naniesionymi genami odporności i markerami RFLP zebranymi w tabelach 3 i 4. Mapy z zagęszczonymi markerami RFLP pozwalają odczytać sekwencje leżące blisko genu odporności. W dalszej kolejności dobrano specyficzne startery 20-nukleotydowe, pozwalające na amplifikację tego odcinka DNA w reakcji PCR.

Aktualne piśmiennictwo wymienia 25 genów odporności u pszenicy na *E. graminis*. Ich oznaczenia od Pm1 do Pm25 wskazują na obecność w roślinach pszenicy loci o określonej ekspresji występowania lub braku kolonii przy obecności danego genu

odporności mączniaka na skutek infekcji określonymi populacjami wirulencji patogena. W ostatnich latach dla kilku loci wykryto po kilka alleli [33]. W tych wypadkach do oznaczenia locus dodano odpowiednią literę (np. Pm 1a, Pm 1b, Pm 1d). Większość zidentyfikowanych genów odporności na mączniaka pochodzi z tetraploidalnych gatunków *Triticum*, kilka z heksaploidalnego *T. aestivum*, a także z *Secale cereale* (geny w obrębie translokacji z żyta) i z gatunków *Aegilops* (tab. 3) [21, 26, 45, 48, 49, 54].

Żaden z „genów” odporności na mączniaka u pszenicy nie został jeszcze sklonowany ani też w pełni zlokalizowany za pomocą sond molekularnych RFLP, co umożliwiłoby określenie jego sekwencji. Udało się natomiast opracować markery molekularne RFLP, RAPD lub STS dla kilku genów (tab. 3). Markery te nazywane markerami pośrednimi identyfikują odcinek DNA leżący w bliskiej odległości od właściwego genu. Markery takie mogą być użyteczne dla identyfikacji odporności (czyli genu odporności) w pracach hodowlanych, choć pewniejsze są markery bezpośrednie. Dodatkowym utrudnieniem może być obecność w danej odmianie czy linii genu — supresora. Geny supresory wykryto dla genów odporności Pm8 i Pm17 [14, 53]. W takich wypadkach fizyczna obecność sekwencji genu odporności nie będzie związana z odpornością danej rośliny (linii, odmiany), gdyż zablokowana będzie funkcja i ekspresja genu. Wymienione geny Pm8 i Pm17 są najprawdopodobniej różnymi allelami tego samego genu.

Rdza brunatna pszenicy, powodowana przez *Puccinia recondita* Rob. Ex Desm. f. sp. *tritici*, jest jedną z ważniejszych chorób pszenicy na świecie. W obrębie populacji tego grzyba rozpoznano w Polsce wiele ras patogena o zróżnicowanej wirulencji wobec różnych odmian i linii pszenicy. Obecnie poznano 44 geny odporności na rdzę brunatną pszenicy [38]. Dla kilku z nich są opracowane markery molekularne RAPD, STS lub RFLP [31, 42, 43]. Geny Lr9, Lr19 i Lr24 są jednymi z efektywniejszych genów odporności na rdzę w Polsce.

Marker SCAR dla identyfikacji trzech genów równocześnie opracowali Robert i in. [37]. Marker ten jest sprzężony z trzema różnymi genami odporności Yr17, Lr37 i Sr38 i może być wykorzystany do identyfikacji tych genów w materiałach hodowlanych. Marker SCAR opracowano również dla genu warunkującego odporność na mszycę *Diuraphis noxia* Mardvilko [30].

QTL odporności na fuzariozę kłosa zmapowano na chromosomie 7A, posługując się analizą AFLP i RAPD [3]. Temu głównemu lokusowi przypisać można do 60% genetycznej zmienności odporności na fuzariozę kłosa u pszenicy. Można oczekiwać opracowania starterów specyficznych typu STS dla wymienionego głównego QTL odporności na fuzariozę.

Prowadzenie hodowli uprawnych odmian pszenicy, jęczmienia i innych zbóż o małej podatności na patogeny i powodowane przez nie choroby, z których najważniejsze wymienione są w tabeli 1, związane jest z wprowadzeniem do materiałów hodowlanych genów odporności i jest procesem wieloletnim. Cechą aktualnie dostępnych odmian polskich tych zbóż jest mała różnorodność genetyczna, szczególnie mała w

odniesieniu do genów odporności na patogeny [21]. Jest to wynikiem wykorzystywania przez hodowców małej liczby wyjściowych źródeł odporności. Opracowywane obecnie markery dla genów odporności, zarówno DNA jak i enzymatyczne i białkowe stwarzają szansę na ułatwienie i przyspieszenie skutecznej selekcji potomstwa po krzyżowaniu pod kątem dziedziczenia genów odporności na patogeny.

Podsumowując, należy podkreślić, że w ostatnich kilku latach dokonano znacznego zaawansowania prac związanych z lokalizacją na chromosomach i identyfikacją genów odporności na ważne patogeny grzybowe zbóż. W najbliższych latach spodziewać się można opracowania markerów specyficznych dla szeregu istotnych genów odporności, co może przyspieszyć prace hodowlane zmierzające do poprawy odporności odmian zbóż na ważne patogeny. Obecnie możliwa staje się ich identyfikacja w materiałach hodowlanych reakcją PCR po uprzedniej ekstrakcji DNA z listków około 7-dniowych siewek.

Literatura

- [1] Arseniuk E. 1995. Odporność roślin uprawnych na stesy biologiczne i fizyczne. Materiały 2. krajowego sympozjum: Odporność roślin na choroby, szkodniki i niesprzyjające czynniki środowiska. 12–14 września 1995 r., IHAR Radzików: 19–37.
- [2] Arumuganathan K., Earle E.D. 1991. Nuclear DNA content of some important plant species. *Plant Molecular Biology Reporter* 9: 208–218.
- [3] Bai G., Kolb F.L., Shaner G., Domier L.L. 1999. Amplified fragment length polymorphism markers linked to a major quantitative trait locus controlling scab resistance in wheat. *Phytopathology* 89: 343–348.
- [4] Borecki Z. 1987. Nauka o chorobach roślin. PWRiL: 360 ss.
- [5] Cenci A., D'Ovidio R., Tanzarella O.A., Ceoloni C., Porceddu E. 1999. Identification of molecular markers linked to Pm13, an *Aegilops longissima* gene conferring resistance to powdery mildew in wheat. *Theor. Appl. Genet.* 98: 448–454.
- [6] Chelkowski J., Witkowska I. 1999. Identyfikacja patogenów grzybowych zbóż i badanie ich różnorodności genetycznej za pomocą łańcuchowej reakcji polimerazy (PCR). *Post. Nauk Rol.* 4: 49–60.
- [7] Chen Yu, Chelkowski J. 1999. Genes for resistance to wheat powdery mildew. *J. Appl. Genet.* 40: 317–334.
- [8] Devos K.M., Gale M.D. 1992. The use of random amplified polymorphic DNA markers in wheat. *Theor. Appl. Genet.* 84: 567–572.
- [9] Faris J.D., Li W.L., Liu D.J., Chen P.D., Gill B.S. 1999. Candidate gene analysis of quantitative disease resistance in wheat. *Theor. Appl. Genet.* 98: 219–225.
- [10] Feuillet C., Schachermayr G., Keller B. 1997. Molecular cloning of a new receptor-like kinase gene encoded at the Lr10 disease resistance locus of wheat. *The Plant Journal* 11(1): 45–52.

- [11] Gallego F., Feuillet C., Messmer M., Penger A., Graner A., Yano M., Sasaki T., Keller B. 1998. Comparative mapping of the two wheat leaf rust resistance loci Lr1 and Lr10 in rice and barley. *Genome* 41: 328–336.
- [12] Giese H., Holm-Jensen A.G., Jensen H.P., Jensen J. 1993. Localization of the *Laevigatum* powdery mildew resistance gene to barley chromosome 2 by the use of RFLP markers. *Theor. Appl. Genet.* 85: 897–900.
- [13] Graner A., Tekauz A. 1996. RFLP mapping in barley of a dominant gene conferring resistance to scald (*Rhynchosporium secalis*). *Theor. Appl. Genet.* 93: 421–425.
- [14] Hanusova R., Bartos P., Zeller F.J. 1997. Characterization of the suppressor gene of powdery mildew resistance gene Pm8 in common wheat (*Triticum aestivum* L.) cv. Regina. *J. Appl. Genet.* 38(1): 11–17.
- [15] Hartl L., Weiss H., Stephan U., Zeller F.J., Jahoor A. 1995. Molecular identification of powdery mildew resistance genes in common wheat (*Triticum aestivum* L.). *Theor. Appl. Genet.* 90: 601–606.
- [16] Hartl L., Weiss H., Zeller F.J., Jahoor A. 1993. Use of RFLP markers for the identification of alleles of the Pm3 locus conferring powdery mildew resistance in wheat (*Triticum aestivum* L.). *Theor. Appl. Genet.* 86: 959–963.
- [17] Hu X.Y., Ohm H. W., Dweikat J. 1997. Identification of RAPD markers linked to the gene Pm1 for resistance to powdery mildew in wheat. *Theor. Appl. Genet.* 94: 832–840.
- [18] Jahoor A., Jacobi A., Schuller M.E., Fischbeck G. 1993. Genetical and RFLP studies at the Mla locus conferring powdery mildew resistance in barley. *Theor. Appl. Genet.* 85: 713–718.
- [19] Jorgensen J.H., Mortensen K. 1977. Primary infection by *Erysiphe graminis* f. sp. *hordei* of barley mutants with resistance genes in the ml-o locus. *Phytopathology* 67: 678–685.
- [20] Jorgensen J.H. 1992. Discovery, characterization and exploitation of Mlo powdery mildew resistance in barley. *Euphytica* 63: 141–152.
- [21] 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. *J. Appl. Genet.* 39(3): 225–236.
- [22] Lehmann P. 1997. Molekularne podstawy odporności roślin na choroby; Struktura i funkcja roślinnych genów odporności. *Postępy biologii komórki* 24(2): 99–125
- [23] Leister D., Kurth J., Laurie D.A., Yano M., Sasaki T., Graner A., Schulze-Lefert P. 1999. RFLP- and physical mapping of resistance gene homologues in rice (*O. sativa*) and Barley (*H. vulgare*). *Theor. Appl. Genet.* 98: 509–520.
- [24] Li C.D., Langridge P., Lance R.C.M., Xu P., Fincher G.B. 1996. Seven members of the (1-3)- β -glucanase gene family in barley (*Hordeum vulgare*) are clustered on the long arm of chromosome 3 (3 HL). *Theor. Appl. Genet.* 92: 791–796.
- [25] Limpert E., Finckh M.R., Wolfe M.S. 1996. Eur 16884 — COST 817 — Population studies of airborne pathogens on cereals as a means of improving strategies for disease control — Integrated control of cereal mildews and rusts: Towards coordination of research across Europe: 109–118.
- [26] Lutz J., Hsam S.L.K., Limpert E., Zeller F.J. 1995. Chromosomal location of powdery mildew resistance genes in *Triticum aestivum* L. (common wheat). 2. Genes Pm2 and Pm19 from *Aegilops squarrosa* L. *Heredity* 74: 152–156.

- [27] Ma Z.Q., Sorrels M.E., Tanksley S.D. 1994. RFLP markers linked to powdery mildew resistance genes Pm1, Pm2, Pm3 and Pm4 in wheat. *Genome* 37: 871–875.
- [28] McIntosh R.A. 1998. Breeding wheat for resistance to biotic stress. *Euphytica* 100: 19–34.
- [29] Mohler V., Jahoor A. 1996. Allele-specific amplification of polymorphic sites for the detection of powdery mildew resistance loci in cereals. *Theor. Appl. Genet.* 93: 1078–1082.
- [30] Myburg A.A., Cawood M., Wingfield B.D., Botha A.M. 1998. Development of RAPD and SCAR markers linked to the Russian wheat aphid resistance gene Dn2 in wheat. *Theor. Appl. Genet.* 96: 1162–1169.
- [31] Naik S., Gill K.S., Prakasa R.V.S., Gupta V.S., Tamhankar S.A., Pujar S., Gill B.S., Ranjekar P.K. 1998. Identification of a STS marker linked to the *Aegilops speltoides*-derived leaf rust resistance gene Lr28 in wheat. *Theor. Appl. Genet.* 97: 535–540.
- [32] Ostergard H. Eur 18422 — COST 817 — Population studies of airborne pathogens on cereals as a means of improving strategies for disease control — Annual report 1997: 229–245.
- [33] Peuscha H., Hsam S.L.K., Zeller F.J. 1996. Chromosomal location of powdery mildew resistance genes in common wheat (*Triticum aestivum* L.em.Thell.). 3. Gene Pm22 in cultivar Virest. *Euphytica* 91: 149–152.
- [34] Prins R., Marais G.F., Janse B.J.H., Pretorius Z.A., Marais A.S. 1996. A physical map of the Thinopyrum-derived Lr19 translocation. *Genome* 39: 1013–1019.
- [35] Procunier J.D., Townley-Smith T.F., Fox S., Prashar S., Gray M., Kim W.K., Czarnecki E., Dyck P.L. 1995. PCR-based RAPD/DGGE markers linked to leaf rust resistance genes Lr29 and Lr25 in wheat (*Triticum aestivum* L.). *J. Genet. and Breed.* 49: 87–92.
- [36] Qi X., Niks R.E., Stam P., Lindhout P. 1998. Identification of QTLs for partial resistance to leaf rust (*Puccinia hordei*) in barley. *Theor. Appl. Genet.* 96: 1205–1215.
- [37] Robert O., Abelard Ch., Dedryver F. 1999. Identification of molecular markers for the detection of the yellow rust resistance gene Yr17 in wheat. *Molecular Breeding* 5: 167–175.
- [38] Roelfs A.P., Singh R.P., Saari E.E. 1992. Rust disease of wheat: Concepts and methods of disease management. Mexico, D.F.: CIMMYT.
- [39] Salamini F. 1999. Where do we go from this point. Genetics and Breeding for crop quality and resistance: 397–417.
- [40] Seyfarth R., Feuillet C., Schachermayr G., Winzeler M., Keller B. 1999. Development of a molecular marker for the adult plant leaf rust resistance gene Lr35 in wheat. *Theor. Appl. Genet.* 99: 554–560.
- [41] Schachermayr G., Feuillet C., Keller B. 1997. Molecular markers for the detection of the wheat leaf rust resistance gene Lr10 in diverse genetic backgrounds. *Molecular Breeding* 3: 65–74.
- [42] Schachermayr G.M., Messmer M.M., Feuillet C., Winzeler H., Winzeler M., Keller B. 1995. Identification of molecular markers linked to the *Agropyron elongatum* — derived leaf rust resistance gene Lr24 in wheat. *Theor. Appl. Genet.* 90: 982–990.
- [43] Schachermayr G., Siedler H., Gale M.D., Winzeler H., Winzeler M., Keller B. 1994. Identification and localization of molecular markers linked to the Lr9 leaf rust resistance gene of wheat. *Theor. Appl. Genet.* 88: 110–115.
- [44] Shi A.N., Leath S., Murphy J.P. 1998. A major gene for powdery mildew resistance transferred to common wheat from wild einkorn wheat. *Phytopathology* 88: 144–147.

- [45] Simons G., van der Lee T., Diergaarde P., van Daelen R., Groenendijk J., Frijters A., Buschges R., Hollricher K., Topsch S., Schulze-Lefert P., Salamini F., Zabeau M., Vos P. 1997. AFLP-based fine mapping of the Mlo gene to a 30-kb DNA segment of the barley genome. *Genomics* 44: 61–70.
- [46] Spielmeier W., Robertson M., Collins N., Leister D., Schulze-Lefert P., Seah S., Moullet O., Lagudah E.S. 1998. A superfamily of disease resistance gene analogs is located on all homoeologous chromosome groups of wheat (*Triticum aestivum*). *Genome* 41: 782–788.
- [47] Steffenson B.J., Hayes P.M., Kleinhofs A. 1996. Genetics of seedling and adult plant resistance to net blotch (*Pyrenophora teres* f. *teres*) and spot blotch (*Cochliobolus sativus*) in barley. *Theor. Appl. Genet.* 92: 552–558.
- [48] Szunics L., Szunics Lu. 1999. Wheat powdery mildew resistance genes and their application in practice. *Acta Agronomica Hungarica* 47(1): 69–89.
- [49] Tyrka M. 1998. Możliwości i perspektywy wykorzystania reakcji łańcuchowej polimerazy (PCR) w hodowli pszenicy zwyczajnej (*Triticum aestivum* L.). *Hodowla Roślin i Nasiennictwo* 3: 1–7.
- [50] Woźniak-Strzembicka A. 1997. Rdza brunatna pszenicy — genetyczne podstawy odporności. *Biuletyn Instytutu Hodowli i Aklimatyzacji Roślin* 204: 245–252.
- [51] Woźniak-Strzembicka A., Łazarska B. 1994. Struktura wirulencji w populacji mączniaka pszenicy (*Erysiphe graminis* f.sp. *tritici*) w Polsce. *Hodowla Roślin, Aklimatyzacja i Nasiennictwo* 38 (1/2): 97–106.
- [52] Van Loon L.C. 1999. Occurrence and properties of plants pathogenesis related proteins. cRc Press. 1–19.
- [53] Zeller F.J., Hsam S.L.K. 1996. Chromosomal location of a gene suppressing powdery mildew resistance genes Pm8 and Pm17 in common wheat (*Triticum aestivum* L.em.Thell). *Theor. Appl. Genet.* 93: 38–40.
- [54] Zeller F.J., Lutz J., Remlein E.I., Limpert E., Koenig J. 1993. Identification of powdery mildew resistance genes in common wheat (*Triticum aestivum* L.). *Agronomie* 13: 201–207.

Molecular identification methods of pathogen resistance genes in cereals

Key words: cereal pathogens, resistance genes, molecular identification

Summary

Recent research results concerning identification methods of resistance genes to fungal pathogens in cereals are reviewed in the paper. PCR (polymerase chain reaction) methods (STS, SCAR) are presented, useful for detection of resistance genes to

powdery mildew and leaf rust in breeding forms of wheat. Methods and possibilities of new markers design are described. Examples of cloned resistance genes in cereals are given, followed with genes mapping in wheat and barley genomes.

*.Adres do korespondencji:
prof. dr hab. Jerzy Chelkowski
Instytut Genetyki Roślin
ul. Strzeszyńska 34
60-479 Poznań*