

**IGA TOMCZYŃSKA****JADWIGA ŚLIWKA**

Pracownia Badania Odporności na Grzyby i Bakterie

Instytut Hodowli i Aklimatyzacji Roślin — Państwowy Instytut Badawczy, Młochów

## Piramidyzacja genów odporności w roślinach uprawnych\*

### Pyramiding resistance genes in cultivated plants

Intensywna chemiczna ochrona roślin przed chorobami i szkodnikami jest kosztowna, nieobojętna dla środowiska i budzi coraz większy sprzeciw konsumentów. Uzyskiwanie dużego plonu o wysokiej jakości przy jednoczesnym ograniczeniu stosowania pestycydów jest możliwe, jeśli odmiany, oprócz dobrych cech agronomicznych, będą również odporne na patogeny i szkodniki. Ważne jest, aby odporność ta była efektywna i trwała w stosunku do różnych ras/patotypów patogena lub różnych gatunków patogenów lub szkodników. W niniejszej pracy przedstawiono przykłady poprawy odporności odmian kilku roślin uprawnych przez piramidyzację genów *R* oraz *loci* odporności ilościowej (QTL).

**Słowa kluczowe:** hodowla, MAS, odporność, patogen, szkodnik

Intensive chemical protection of the crops against diseases and pests is expensive, harmful for the environment and raises growing consumers' concerns. Obtaining high yield of a good quality with limited pesticide use would be possible, if plant varieties, apart from possessing good agricultural traits, were resistant. It is important that resistance should be effective and durable against wide spectrum of different races/pathotypes or different pathogen and pest species. In this work examples of improvement to resistance in a few varieties of cultivated plants by pyramiding *R* genes and quantitative resistance loci for resistance (QTL) are presented.

**Key words:** breeding, MAS, resistance, pathogen, pest

### WSTĘP

Hodowla odmian roślin uprawnych odpornych na choroby i szkodniki jest uznawana za wartościową metodę walki z nimi. Jeśli odmiana jest odporna, jej uprawa nie wymaga stosowania chemicznych zabiegów ochronnych, co jest korzystne ze względów ekonomicznych oraz sprzyja ochronie środowiska naturalnego. Największe nakłady pracy w tym wypadku ponosi hodowca. Warunkiem sukcesu nowej odmiany, poza parametrami

\* Praca sfinansowana przez NCBiR grant LIDER/06/82/L-1/09/NCBiR/2010.

jakościowymi, które muszą być równie dobre lub lepsze niż popularnych odmian uprawnych, jest, aby cecha odporności była stabilna i trwała.

W 1905 roku Biffen wykazał, że odporność na żółtą rdzę zbóż i traw powodowaną przez *Puccinia striiformis* jest kontrolowana przez jeden gen. W myśl tego odkrycia wiele programów hodowlanych zainicjowanych w początkach XX wieku zakładało, że uzyskanie odpornych odmian będzie prowadziło do całkowitego zwalczenia chorób roślin (Stackman i in., 1918). Wkrótce jednak okazało się, że za odporność na różne rasy patogenów odpowiadają także różne geny gospodarza (McRostie, 1919). Wyjaśnienie tego zjawiska doprowadziło do sformułowania przez Florę hipotezy „gen na gen”, w której autor przedstawił model interakcji pomiędzy patogenem a gospodarzem (Flor, 1956). Do wystąpienia choroby nie dochodzi jedynie wtedy, gdy roślina posiada gen odporności *R* zdolny rozpoznać czynnik awirulencji *Avr* patogena. Jeśli jednak u patogena wystąpi czynnik wirulencji (*avr*), będzie on w stanie porazić roślinę niezależnie czy będzie miała allel *R*, czy nie. Brak allelu *R* będzie skutkowało porażeniem rośliny, nawet jeśli patogen posiada czynnik awirulencji (*Avr*).

Reakcja odpornościowa roślin jest kaskadą sygnałów biochemicznych warunkowaną przez geny odporności *R*, która zostaje zapoczątkowana przez białkowy produkt genu *R* wchodzącego bezpośrednio lub pośrednio w interakcję ze specyficznym czynnikiem awirulencji (*Avr*) wyprodukowanym przez patogena. Białka te są zaangażowane w wykrycie wnikających do rośliny bakterii, wirusów, grzybów, nicieni, owadów oraz uruchomienie reakcji odpornościowych, przede wszystkim reakcji nadwrażliwości, czyli programowanej śmierci zainfekowanych komórek i zatrzymania patogena (McHale i in., 2006).

Wyróżnia się dwa typy odporności: monogeniczną oraz poligeniczną. Odporność monogeniczna, warunkowana przez pojedyncze geny (geny *R*), określana jest także terminem pionowej, wertykalnej lub jakościowej. Ten rodzaj odporności jest zwykle specyficzny w stosunku do rasy patogena (Tuzun, 2001; Castro i in., 2003).

Drugim typem odporności jest odporność warunkowana wieloma genami nazywana horyzontalną, ilościową lub poligeniczną. Jest ona efektem interakcji pomiędzy produktami wielu genów roślinnych. Wpływ pojedynczego genu może być bardzo słaby, dopiero suma efektów wielu genów może zapewniać poprawę odporności. Odporność ilościowa zwykle zapewnia jedynie spowolnienie i ograniczenie występowania objawów chorobowych. Poligeniczna odporność jest zwykle uważana za niespecyficzną w stosunku do rasy patogena (Tuzun, 2001; Castro i in., 2003).

Wymienionym typom odporności przypisywana jest różna trwałość. Podczas gdy trwałość odporności warunkowanej pojedynczym genem *R* zależy od tempa ewolucji zaledwie jednego genu patogena — czynnika *Avr*, pokonanie odporności ilościowej wymaga od patogena zmian interakcji z wieloma białkami rośliny. Pojedyncza mutacja w genie *Avr* patogena powodująca zmianę tego genu prowadzącą do przełamania monogenicznej odporności rośliny jest wysoce prawdopodobna. W przeciwieństwie do pojedynczej mutacji, równoczesne zmiany wielu genów patogena komplementarnych do wielu różnych genów sumujących się w odporności poziomej są zjawiskiem mało prawdopodobnym. W związku z tym odporność ilościowa jest uważana za trwalszą.

Nietrwałość odporności typu „gen na gen” jest powszechnie znana i istnieją sytuacje, kiedy to wirulencja patogena zmieniała się szybciej, niż hodowcy byli w stanie tworzyć nowe odmiany z kolejnym pojedynczym genem odporności (Castro i in., 2003). Wzrost powierzchni upraw nowej odmiany z odpornością monogeniczną powoduje większą presję selekcyjną na populację patogena, która faworyzuje osobniki posiadające allel nie rozpoznawany przez gen *R*.

W przypadku odporności ilościowej problem stanowi fakt, iż korzystny układ wielu alleli leżących u jej podłoża zmienia się wskutek rekombinacji w kolejnym pokoleniu. Ekspresja odporności ilościowej podlega silnym wpływom środowiska, a więc hodowla roślin cechujących się taką odpornością wymaga obszernych i kosztownych testów polowych, co na etapie selekcji czyni program hodowlany trudniejszym (Castro i in., 2003). Obiecującym sposobem wykorzystania genów *R*, który daje nadzieję na zwiększenie spektrum działania i trwałości uzyskanej odporności, jest ich łączenie, czyli piramidyzacja.

Model teoretyczny tworzenia piramid genowych zakłada, że prawdopodobieństwo pasującej kombinacji wirulencji w populacji patogena zmniejsza się proporcjonalnie do liczby nieprzełamanych genów *R* użytych w piramidzie. Jest to jednak założenie czysto teoretyczne. Nie udowodniono jasnego powiązania pomiędzy liczbą genów odporności w odmianie, a trwałością odporności. Przykładem mogą być odmiany pszenicy zawierające piramidę genów odporności na rdzę źdźbłową *Puccinia graminis* f. sp. *tritici*, w których spiramidyzowane geny nie zapewniły trwałej odporności (Mundt, 1990, 1991; Pink, 2002).

Porównanie trwałości genów *R* występujących pojedynczo i w piramidzie genowej nie jest kwestią jednoznaczną. Aby zapewnić maksymalną trwałość genów *R* ważne jest, aby rośliny z pojedynczymi i spiramidyzowanymi genami *R* nie były uprawiane równocześnie. Rośliny posiadające pojedynczy gen mogą stanowić w tym wypadku dla patogena ułatwienie, dzięki któremu będzie mógł stopniowo ewoluować zmieniając kolejne geny *Avr* i zyskując zdolność do infekcji odmiany zawierającej spiramidyzowane geny (Pink, 2002; Tan i in., 2010).

## UŻYCIE MAS

MAS (Marker-Assisted Selection) jest to rodzaj selekcji, która odbywa się w oparciu o genotyp, a nie, jak w przypadku tradycyjnej selekcji, o fenotyp. W porównaniu z selekcją fenotypową metoda ta ma następujące zalety: szybciej otrzymuje się wyniki oraz są one niezależne od wpływów środowiska. Selekcja przy pomocy markerów molekularnych pozwala na wykrycie obecności genu w roślinach oraz łączenie kilku genów lub QTL w jednej roślinie.

MAS jest metodą szczególnie przydatną w hodowli odpornościowej. W sytuacji, kiedy obecność jednego efektywnego genu *R* zapewnia roślinie pełną odporność, odróżnienie takiej rośliny od roślin zawierających spiramidyzowane geny *R* bądź QTL na poziomie fenotypowym jest często niemożliwe. Jedynym rozwiązaniem pozostaje wtedy MAS. Obecność markerów sprzężonych z docelowymi allelami pozwala na określenie czy roślina posiada interesującą nas cechę.

Aby metoda MAS była skuteczna, częstość rekombinacji pomiędzy genem docelowym a markerem musi być możliwie jak najmniejsza. Im odległość ta będzie mniejsza, tym mniej osobników będzie błędnie sklasyfikowanych. Przykładem może być selekcja linii soczewicy odpornych na antraknozę. Użyty do selekcji marker RAPD OPO6<sub>1250</sub> znajdujący się w odległości 6,5 cM od genu głównego dał niezadowalające wyniki. Z 72 linii odpornych tylko 11 posiadało marker, z kolei wśród 84 podatnych linii 66 miało marker obecny. Uznano, że do przeprowadzenia miarodajnej selekcji maksymalna odległość między markerem a genem powinna wynosić mniej niż 5cM (Tar'an i in., 2003). Zdarza się jednak, że używa się markera położonego w większej odległości, a więc tym samym akceptuje się odsetek osobników błędnie sklasyfikowanych, jak miało to miejsce w przypadku markera GP94 oddalonego o 6,7 cM od genu *Rpi-phu1*, który warunkuje odporność ziemniaka na *Phytophthora infestans* (Śliwka i in., 2010) lub markera RZ536 zlokalizowanego w odległości 7,9 cM od genu *Pil* warunkującego odporność ryżu na grzyba *Magnaporthe grisea* (Hittalmani i in., 2000).

#### ŁĄCZENIE GENÓW *R* W CELU UZYSKANIA WYŻSZEGO POZIOMU LUB ZWIĘKSZONEJ TRWAŁOŚCI ODPORNOŚCI

Jest to symultaniczne użycie kilku genów *R* w tej samej odmianie uprawnej. Założenie, że hodowcy kiedykolwiek tworzyli odmiany wyłącznie z jednym genem odporności jest pewnym uproszczeniem. W wielu przypadkach, ponieważ hodowcy wprowadzali nowy gen odporności do już istniejących odmian, dodawali nowy gen do innych, już przełamanych genów *R*, tworząc w ten sposób piramidę genową.

Przykładem mogą być programy hodowlane prowadzone w Holandii do lat 70 XX w. dążące do uzyskania odporności na mączniaka rzekomego sałaty powodowanego przez *Bremia lactucae*. Wiele z wyhodowanych wtedy odmian posiadało piramidę nawet trzech genów *R* (Pink, 2002).

Strategię tę wykorzystała także Osiecka (1988) w hodowli ziemniaków odpornych na zarazę ziemniaka. W toku krzyżowań *S. microdontum* × *S. phureja* oraz *S. stenotomum* × *S. phureja* uzyskała mieszańce o wysokim poziomie odporności pochodzącej z dwóch różnych źródeł. Jako narzędzie selekcji wykorzystano ocenę odporności poprzez zastosowanie materiału infekcyjnego, na który składała się mieszanina ras *Phytophthora infestans* o znanych profilach wirulencji. Zaobserwowano także efekt komplementarnego działania genów odporności w materiałach pochodzących od *S. verrucosum*. Jedna z form potomnych wykazała reakcję odporności bulw na poziomie 8, podczas gdy formy rodzicielskie były na zarazę ziemniaka podatne, ich ocena odporności wynosiła 1–2 (Osiecka, 1988).

Jednoczesne wprowadzanie więcej niż jednego efektywnego genu *R* za pomocą konwencjonalnych metod hodowli było stosowane, jednak bez możliwości potwierdzenia jednoczesnej obecności wprowadzanych genów. Z powodu epistatycznego efektu działania genów nie było możliwe rozróżnienie fenotypowe pomiędzy roślinami odpornymi mającymi jeden lub więcej genów *R*. W konsekwencji hodowcy tworzyli piramidy genów *R*, dla których pasująca specyficzna wirulencja była już obecna w populacji patogena (to

zapewniało możliwość diagnozy przy pomocy różnych izolatów dla każdego komponentu w piramidzie genów). Trwałość odporności w takim wypadku była uzależniona od czasu, jaki patogen potrzebował do mutacji lub rekombinacji generującej odpowiednią kombinację czynników wirulencji oraz czasu w jakim nowy patotyp ustabilizował się w populacji (Pink, 2002).

Trwałość odporności bezpośrednio zależy od biologii patogena. Jeśli jest to patogen glebowy, który ma ograniczoną możliwość rozprzestrzeniania się, piramida z genów *R*, dla których spotykane są kompatybilne izolaty patogena, wykaże większą trwałość, niż w przypadku, kiedy piramida będzie stworzona w celu ochrony przed łatwo szerzącym się patogenem liściowym, takim jak rdze i mączniaki (Pink, 2002). Do patogenów takich zalicza się także *P. infestans*, sprawca zarazy ziemniaka. Odmiana Pentlant Dell, w kilka lat po tym, jak zaczęto ją uprawiać komercyjnie, stała się podatna na zarazę ziemniaka, mimo iż miała piramidę złożoną z trzech genów odporności: *R1*, *R2* i *R3* (Malcolmson, 1969).

Strategia piramidyzacji wydaje się być szczególnie przydatna, kiedy pojedyncze geny nie zapewniają pełnej odporności rośliny. Przykładem takiego podejścia jest piramidyzacja genów odporności na *P. infestans* *R<sub>pi-ber</sub>* i *R<sub>pi-mcd1</sub>* w ziemniaku jadalnym. Jeśli w roślinie geny znajdowały się pojedynczo, gen *R<sub>pi-ber</sub>* wykazywał silniejszy efekt jednostkowy a *R<sub>pi-mcd1</sub>* słabszy. Oczekiwano, że genotyp zawierający piramidę obu genów będzie wykazywał pełny, lub chociaż zwiększony stopień odporności w porównaniu z genotypem zawierającym jeden gen. Aby wyselekcjonować rośliny zawierające obydwa geny posłużono się markerami Q133, CT214 i TG63, które znajdowały się kolejno w odległości 6,4, 5,1 i 1,3 cM od *R<sub>pi-ber</sub>* oraz markerem TG339 wykazującym sprzężenie z *R<sub>pi-mcd1</sub>*. Efektem piramidyzacji, w porównaniu do roślin zawierających tylko gen *R<sub>pi-ber</sub>* było opóźnienie infekcji o kilka dni. Mimo nieznacznego zwiększenia stopnia odporności oraz braku znaczących korzyści ekonomicznych, zabieg ten może przyczynić się do zwiększenia trwałości odporności (Tan i in., 2010).

Zdarza się jednak, że mimo obecności dodatkowego genu w roślinie, nie obserwuje się spodziewanego addytywnego efektu. Przykładem mogą być badania Sharmy i in. (2004). Efektem piramidyzacji genów odporności na pluskwika różnoskrzydłego *Nilaparvata lugens* *Bph1* i *Bph2* na chromosomie XII ryżu był taki sam stopień odporności linii zawierających geny spiramidyzowane jak linii zawierających tylko gen *Bph1*. Prawdopodobną przyczyną takiego wyniku jest fakt, iż na przełomie lat 70 i 80 XX w. wraz z pojawieniem się nowych agresywnych biotypów szkodnika, oba geny zostały przełamane, a więc pod względem praktycznym nie są już użyteczne dla hodowli.

Brak oczekiwanych wyników przyniosły także badania Tan i współpracowników (2009) nad piramidyzacją genów odporności na *Meloidogyne hapla* w ziemniaku. Pojedynczy gen *R<sub>Mh-cheA</sub>* zmniejszał ilość znajdowanych jaj szkodnika o ok. 88% w stosunku do kontroli nie zawierającej żadnego genu odporności, a linia zawierająca gen *R<sub>Mh-tar</sub>* redukowała ilość jaj o 55%. Połączenie obu genów nie wpłynęło na liczbę składanych jaj w stopniu istotnie statystycznie większym, niż robił to pojedynczy gen *R<sub>Mh-cheA</sub>*. Powodem braku addytywnego efektu genu były prawdopodobnie błędy popełnione podczas selekcji. Odległość pomiędzy genem *R<sub>Mh-tar</sub>* a sprzężonym z nim markerem użytym

do selekcji wynosiła 17 cM, a to z kolei powodowało niewłaściwe zakwalifikowanie osobników: te, które miały marker mogły nie posiadać genu a te które były odporne i posiadały gen mogły nie posiadać markera. Do selekcji fenotypowej użyto innych populacji nicieni, niż do mapowania genów. Autorzy zwracają uwagę na niedobór informacji o tych populacjach pod względem charakterystyki alleli wirulencji oraz domieszkach gatunków *M. chitwoodi* i *M. fallax* do populacji *M. hapla*. Konsekwencją tego mogą być różnice w określeniu zakresu efektu genu. W zależności od składu użytej populacji różnicującej *R<sub>Mh-tar</sub>* może być zakwalifikowany jako QTL charakteryzujący się różną siłą lub nawet pojedynczy gen *R* o efekcie całkowitym.

#### UZYSKIWANIE WYŻSZEGO POZIOMU LUB ZWIĘKSZONEJ TRWAŁOŚCI ODPORNOŚCI PRZEZ ŁĄCZENIE WIELU GENÓW O MAŁYM EFEKCIE JEDNOSTKOWYM

Mimo, iż genetyczne podłoże oraz mechanizmy działania odporności ilościowej nie są do końca poznane, w celu uzyskania roślin o bardziej wartościowej odporności podejmuje się próby połączenia QTL. Obiecujące wyniki pod tym względem uzyskał Richardson i współpracownicy (2006). Obiektem badań był jęczmień infekowany przez rdzę *Puccinia striiformis* f. sp. *hordei*. Chcąc określić stopień odporności poszczególnych kombinacji zastosowano ocenę czterech parametrów: opóźnienie infekcji w stosunku do czasu inokulacji, skuteczność infekcji, rozmiar porażonej tkanki roślinnej oraz gęstość punktów zarodnikowania. Linie zawierające pojedyncze QTL wykazywały lepszą odporność pod względem wszystkich ocenianych parametrów niż posiadał podatny rodzic, przy czym zaobserwowano znaczące różnice pomiędzy siłą wpływu na cechę przez allele odporności pochodzące z różnych QTL. Najsilniejszy efekt wykazywał QTL 4H, kolejno 1H i 5H. Piramidyzacja tych trzech QTL prowadziła do uzyskania wyższego stopnia odporności pod względem wszystkich ocenianych parametrów z wyjątkiem opóźnienia infekcji. Sprawdzenie obecności poszczególnych QTL przeprowadzono metodą MAS za pomocą markerów SSR. Problemem, na jaki zwrócili uwagę autorzy był fakt, iż wprowadzenie tych samych QTL do różnych linii hodowlanych nie zawsze zapewniało taki sam stopień odporności. Nawet najwyższy stopień odporności, który warunkowała kombinacja połączonych QTL nie był równy poziomowi, jaki dawał gen główny odporności leżący na chromosomie 7H, który warunkował odporność skrajną.

Piramidyzacja QTL daje również nadzieje na wyhodowanie roślin kukurydzy, w których nie dochodziłoby do kumulacji aflatoksyn. Zanieczyszczenie ziaren tymi mykotoksynami może być zmniejszone poprzez połączenie QTL odporności na szkodniki uszkadzające kolby, które tworzą wrota dla infekcji oraz QTL zaangażowanych bezpośrednio w reakcję odporności na infekcję grzyba *Aspergillus flavus*. Wyniki sugerują epistatyczny efekt kombinacji QTL *umc176+csu3*. Bardziej szczegółowe zmapowanie chromosomów 1S i 2L, gdzie są położone QTL odporności jest niezbędne do ich precyzyjnego zlokalizowania i późniejszej selekcji roślin przy pomocy markerów (Widstrom i in., 2003).

## PIRAMIDYZACJA GENÓW ODPORNOŚCI ILOŚCIOWEJ I JAKOŚCIOWEJ

Połączenie obu typów odporności (ilościowej i jakościowej) daje możliwość uzyskania wysokiej odporności warunkowanej genami głównymi a jednocześnie, dzięki licznym QTL, odporności trwałej. Dwa rodzaje odporności uzupełniając się wzajemnie mogą zmniejszyć prawdopodobieństwo wyselekcjonowania izolatów patogena zdolnych do infekcji i zapobiec powstaniu rasy zdolnej przełamać obydwaj źródła. Nawet w sytuacji kiedy patogen przełamie odporność jakościową, odporność ilościowa wciąż będzie chronić roślinę przed infekcją (Hittalmani i in., 2000; Castro i in., 2003).

Badania nad współdziałaniem genów głównych i QTL prowadzili Castro i współpracownicy (2003). Chcąc uzyskać rośliny jęczmienia odporne na rdzę żółtą (*Puccinia striiformis* f. sp. *hordei*) wyhodowano rośliny zawierające różne połączenia genów: głównego  $R_{psx}$  oraz QTL: QTL4, QTL4B, QTL4C, QTL5 i QTL7. Efekt genów odporności ilościowej był obserwowany jedynie w kombinacjach, które nie zawierały genu  $R_{psx}$ . Rezultat taki nie był zaskoczeniem, ponieważ geny odporności jakościowej maskują efekt QTL, a więc ograniczają przydatność selekcji fenotypowej. Aby prześledzić obecność poszczególnych komponentów piramidy zastosowano MAS. Metoda ta umożliwiła identyfikację osobników mających gen  $R_{psx}$  zlokalizowany na chromosomie 7H pomiędzy dwoma markerami RFLP: Ris44 i ABG461. Analiza statystyczna potwierdziła, że na ekspresję odporności w roślinach o spiramidyzowanych genach największy wpływ miał gen główny  $R_{psx}$  oraz kolejno wszystkie QTL z wyjątkiem QTL7, dla którego nie wykazano znaczącego wpływu na efekt całościowy. Przydatność takiej piramidy może być oceniana wyłącznie za pomocą rasy patogena, która byłaby w stanie porazić gen  $R_{psx}$ . Test taki nie jest możliwy do wykonania, ponieważ w Ameryce Północnej nie zanotowano przypadku przełamania tego genu (Castro i in., 2003).

## ZWIELOKROTNIE NIE TYCH SAMYCH ALLELI

Zwielokrotnienie tych samych alleli powoduje zwiększenie stopnia odporności, jeśli ekspresja pojedynczej kopii genu odporności jest niewystarczająca, aby wygenerować skuteczną reakcję obronną. Zjawisko to wykorzystano w hodowli pszenicy. Gen *Ao*, który posiadała odmiana Sinvalocho MA, zapewniał odporność na izolat 66 rdzy brunatnej (*Puccinia recondita*). Odporność została jednak przełamana. Z izolatu 66 na skutek mutacji powstał nowy, F-05, który był w stanie przełamać *Ao*. Dopiero uzyskanie tetrasomicznych roślin pszenicy o czterech kopiach genu *Ao* gwarantowało brak porażenia przez izolat F-05 (Tranquilli i in., 1997).

Toxopeus (1957) porównując genotypy ziemniaka zawierające dupleks i tripleks genu *R3* (gen warunkujący odporność na *P. infestans*) z genotypami zawierającymi pojedynczą kopię *R3* nie zaobserwował addytywnego efektu. Brak efektu przy zwielokrotnieniu tego samego allelu zaobserwowano również w badaniach z genem *H1* odporności ziemniaka na mątwika ziemniaczanego (*Globodera rostochiensis*), kiedy liczba znajdowanych cyst była taka sama, zarówno na genotypach zawierających simpleks, jak i wiele kopii genu *H1* (Brodie i Plaisted, 1992). Formy o zwiększonej liczbie kopii danego allelu gwarantują

natomiast zwiększoną frekwencję form odpornych w potomstwie, co jest wykorzystywane w hodowli (Świeżyński, 1988).

#### UZYSKIWANIE ODPORNOŚCI O SZEROKIM SPEKTRUM NA RÓŻNE RASY/PATOTYPY PATOGENA

Przykładem zastosowania tej strategii mogą być badania nad odpornością soi na szczepy wirusa mozaiki soi (SMV) (Shi, 2009). Znane były piramidy dwugenowe; *Rsv1Rsv3*, *Rsv1Rsv4* lub *Rsv3Rsv4*, co gwarantowało pełną odporność na szczepy wirusa G<sub>1</sub>-G<sub>7</sub>, jednak uzyskane linie zawierające trzy geny odporności w stanie homozygotycznym (*Rsv1Rsv1Rsv3Rsv3Rsv4Rsv4*) cechowały się dodatkowo szerszym spektrum odporności na SMV. Rośliny z genem *Rsv1* są odporne na szczepy G<sub>1</sub>-G<sub>6</sub>, ale nie na G<sub>7</sub>, natomiast te mające gen *Rsv3* nie są porażane przez szczepy G<sub>5</sub>-G<sub>7</sub>, ale są podatne na szczepy G<sub>1</sub>-G<sub>4</sub>. Gen *Rsv4* zapewnia odporność w stadium siewki, a w późniejszych stadiach spowalnia pojawienie się objawów choroby.

Innym przykładem może być piramidyżacja trzech genów odporności na bakteryjną chorobę ryżu powodowaną przez *Xanthomonas oryzae* pv. *oryzae*. Współdziałanie genów *Xa21*, *xa5* i *xa13* zapewniło wysoki stopień odporności na 17 izolatów pochodzących z rejonu Pendżabu i 6 szczepów pochodzących z Filipin. Najbardziej efektywnym genem okazał się *Xa21*. Jedynie izolat PX04 był zdolny do przełamania odporności, którą warunkował ten gen. Kiedy jednak rośliny posiadały piramidę trzech genów odporności, izolat nie powodował porażenia (Singh i in., 2001).

Przedmiotem badań była również odporność ryżu na plamicę powodowaną przez grzyba *Magnaporthe grisea*. Aby uzyskać pożądane cechy wyhodowano linie mające różne zestawienia genów *Pil*, *Piz-5* i *Pita*. Selekcję fenotypową roślin przeprowadzono za pomocą sześciu izolatów: IK81-25, C9232-5 (zdolne do infekcji roślin z genem *Pil*), C9240-2, C9240-5 (zdolne do infekcji roślin z genem *Piz-5*) oraz V86010 i P06-06 (zdolne do infekcji roślin z genem *Pita*). Poszczególne z wymienionych izolatów były zdolne porazić roślinę z pojedynczym genem odporności, nie były jednak w stanie w warunkach laboratoryjnych całkowicie porazić linii o spiramidyzowanych genach. W testach polowych linie o spiramidyzowanych genach wykazywały całkowitą odporność. Wskazuje to na istnienie efektu komplementarności dwóch nieallelicznych genów znajdujących się w jednej roślinie. Z testowanych dwu i trzygenowych piramid najbardziej odporne okazały się kombinacje zawierające geny *Pil+Piz-5* i *Pil+Piz-5+Pita*. W testach polowych były odporne w jednakowym stopniu, co rośliny zawierające tylko gen *Piz-5*. Mimo, że geny spiramidyzowane nie warunkują odporności o wyższym stopniu, niż pojedynczy gen *Piz-5*, piramida może zmniejszyć presję selekcyjną na patogena, a więc może zapewnić większą trwałość odporności odmiany (Hittalmani i in., 2000).

#### ŁĄCZENIE ODPORNOŚCI NA RÓŻNE GATUNKI PATOGENÓW I SZKODNIKÓW W JEDNEJ ODMIANIE

Najbardziej ekonomicznym i efektywnym rozwiązaniem jest wprowadzenie do jednej odmiany uprawnej genów odporności na wiele różnych chorób i patogenów. Łączenie



takiej odporności jest od dziesięcioleci podstawą postępu hodowlanego. W oparciu o selekcję fenotypową w latach 1985–1990 w Zakładzie Genetyki i Syntezy Materiałów Wyjściowych Instytutu Ziemniaka o. Młochów wyprowadzono 10 rodów ziemniaka, które cechowała jednoczesna odporność na wirusy X, Y i S ziemniaka, mątwika *Globodera rostochiensis* (patotyp Ro1) oraz odporność części nadziemnej i bulw na *P. infestans* (Sieczka i Pakosińska, 1991). Co ważne, odporność na *P. infestans* w tych materiałach determinowana była genami innymi niż te, które miały istniejące wtedy odmiany krajowe i zagraniczne. Podczas gdy w ówczesnych odmianach wyróżniano tylko geny *R1*, *R2*, *R3*, *R4* i *R10*, wyselekcjonowane rody nie ulegały infekcji po zakażeniu inokulum zdolnym porazić komercyjne odmiany (Sieczka i Pakosińska, 1991). Równocześnie prowadzono prace nad uzyskaniem form o jednoczesnej odporności na wirusy Y, M, S, X i liściozwoju ziemniaka (Domański i in., 1991).

Przedmiotem badań było otrzymanie roślin ziemniaka odpornych na wirusy PVY i PVX, mątwika ziemniaczanego (*Globodera rostochiensis*) oraz raka ziemniaka powodowanego przez *Synchytrium endobioticum*. Uzyskano rośliny zawierające jednocześnie gen *Ryadg* warunkujący odporność na PVY, gen *Gro1* warunkujący odporność na mątwika ziemniaczanego, gen *Rx1* odpowiadający za odporność na PVX oraz gen *Sen1* odpowiadający za odporność na raka ziemniaka. Za pomocą markerów sprzężonych z wymienionymi genami wyselekcjonowano rośliny o wysokiej odporności na wszystkie wymienione patogeny (Gebhardt i in., 2006).

#### WYKORZYSTANIE TRANSGENEZY

Próby uzyskania transgenicznych roślin posiadających geny odporności na różne szkodniki i patogeny, a dodatkowo także tolerancję na herbicyd podjęli Wei i współpracownicy (2008). W toku badań uzyskał transgeniczną linię ryżu T7773-1 zawierającą gen *cry1Ab* (warunkujący odporność na szkodnika *Chilo suppressalis* (Lepidoptera), dzięki obecności toksyny z *Bacillus thuringiensis*, *Bt* i gen *bar*, dzięki czemu rośliny były tolerancyjne na herbicyd Basta oraz linię T773-2, która zawierała gen *Xa21* warunkujący odporność na bakteryjną zarazę ryżu. W wyniku krzyżowań otrzymano 50 odpornych roślin pokolenia F<sub>4</sub> zawierających wszystkie trzy geny oraz wykazujących dobre cechy agronomiczne. Rośliny zawierające białko Bt wykazywały silną odporność na szkodnika- stopień uszkodzeń był bardzo niski — poniżej 1% w warunkach polowych, natomiast u kontrolnych roślin ryżu bez transgeny stopień uszkodzeń wynosił ponad 50%. W teście biologicznym po infekcji siedmioma szczepami *X. oryzae* pv. *oryzae* różne rośliny z linii wyposażonych we wszystkie trzy geny wykazywały różne stopnie infekcji, jednak także w tym przypadku powierzchnia uszkodzeń była mniejsza niż w kontroli.

Strategia otrzymywania roślin ryżu odpornego na różne choroby i patogeny została również opisana przez Datta i współpracowników (2002). Do roślin ryżu wprowadzono gen *Xa21* (odporność na *X. oryzae* pv. *oryzae*), gen *Bt* (odporność na motyla *Scirpophaga incertula*) oraz gen *RC7* (odporność na otoczkową zarazę ryżu wywoływaną przez *Rhizoctonia solani*) uzyskując w ten sposób pożądane parametry odporności.

Programy hodowlane dążące do uzyskania odmiany odpornej na różne choroby prowadzono także na jabłoni. W toku badań uzyskano odmianę Ariwa, która cechuje się odpornością na parcha jabłoni powodowanego przez *Venturia inaequalis* oraz mączniaka powodowanego przez *Podosphaera leucotricha*. Wadą tej odmiany jest jednak podatność na zarazę ogniową oraz raka bakteryjnego, w związku z czym kontynuuje się badania nad uzyskaniem odmiany o większej przydatności. Otrzymane 18 roślin zawierających geny *Vf*, *Vh2*, *Vh4*, warunkujących odporność na parcha jabłoni oraz gen *P12* odpowiadający za odporność na mączniaka jabłoni, zakwalifikowano jako materiał wyjściowy do tworzenia nowych odmian (Kellerhals i in., 2009). Przeprowadzono również piramidyzację genów odporności na szkodniki nikli indyjskiej *Melanagromyza obtusa* i *Heliothis armigera* (Tar'an i in., 2003 za Verulkar i in., 1997).

Opisane przykłady piramidyzowania genów i QTL odporności z wykorzystaniem MAS u szerokiej gamy roślin uprawnych jednoliściennych i dwuliściennych świadczą o wysokim potencjale tej strategii. Przy jej zastosowaniu osiągnięto zwiększenie poziomu odporności, rozszerzenie spektrum odporności o różne rasy tego samego patogena, a także kumulację odporności na różne patogeny i szkodniki w jednej linii hodowlanej. Dyskusyjne i trudne w ocenie pozostaje zwiększanie trwałości odporności przez piramidyzowanie genów *R* i/lub QTL, choć leżący u jego podstaw model teoretyczny wydaje się być oparty na solidnych argumentach. Zastosowanie markerów molekularnych do selekcji form odpornych może istotnie usprawnić konstrukcję piramid genowych, zwłaszcza z udziałem genów o efekcie epistatycznym, uniemożliwiającym wykrycie innych składników piramidy na poziomie fenotypu.

#### LITERATURA

- Biffen R. H. 1905. Mendel's laws of inheritance and wheat breeding. *J. Agric. Sci.* 1: 4 — 48.
- Brodie B. B., Plaisted R. L. 1992. Effect of *H1* gene dosage on the development of *Globodera rostochiensis* in potato. *J. Nematol.* 24: 584.
- Castro A. J., Capettini F., Corey A. E., Filichkina T., Hayes P. M., Kleinhofs A., Kudrna D., Richardson K., Sandoval-Islas S., Rossi C., Vivar H. 2003. Mapping and pyramiding of qualitative and quantitative resistance to stripe rust in barley. *Theor. Appl. Genet.* 107: 922 — 930.
- Datta K., Baisakh N., Maung Thet K., Tu J., Datta S. K. 2002. Pyramiding transgenes for multiple resistance in rice against bacterial blight, yellow stem borer and sheath blight. *Theor. Appl. Genet.* 106: 1 — 8.
- Domański L., Domańska M., Zielińska B. 1991. Eksperymentalna hodowla ziemniaków odpornych na wirusy przy wykorzystaniu materiałów wyjściowych z Instytutu Ziemniaka. Synteza materiałów wyjściowych dla hodowli ziemniaka — dorobek i perspektywa: materiały z konferencji zorganizowanej przez Zakład Genetyki i Syntezy Materiałów Wyjściowych Instytutu Ziemniaka 20–21 lutego 1991 r., Bonin: 50 — 57.
- Flor H. H. 1956. The complementary genetic systems in flax and flax rust. *Adv. Genet.* 8: 29 — 54.
- Gebhardt C., Bellin D., Henselewski H., Lehmann W., Schwarzfischer J., Valkonen J. P. 2006. Marker-assisted combination of major genes for pathogen resistance in potato. *Theor. Appl. Genet.* 112: 1458 — 1464.
- Hittalmani S., Parco A., Mew T. V., Zeigler R. S., Huang N. 2000. Fine mapping and DNA marker-assisted pyramiding of the three major genes for blast resistance in rice. *Theor. Appl. Genet.* 100: 1121 — 112.
- Kellerhals M., Székely T., Sauer C., Frey J. E., Patocchi A. 2009. Pyramidisieren von Schorfresistenzen in der Apfelzüchtung. *Erwerbs-Obstbau* 51: 21 — 28.
- Kryczyński S. 2005. Podstawy fitopatologii. Fundacja Rozwój SGGW, Warszawa: 218 — 219.
- Malcolmson J. F. 1969. Races of *Phytophthora infestans* occurring in Great Britain. *Trans. Br. Mycol. Soc.* 53: 417 — 423.

- McHale L., Tan X., Koehl P., Michelmore R. W. 2006. Plant NBS-LRR proteins: adaptable guards. *Genome Biology* 7: 212.
- McRostie G. P. 1919. Inheritance of anthracnose resistance as indicated by a cross between a resistant and a susceptible bean. *Phytopathology* 9: 139 — 148.
- Mundt C. C. 1990. Probability of mutation to multiple virulence and durability of resistance gene pyramids. *Phytopathology* 80: 221 — 22.
- Mundt C. C. 1991. Probability of mutation to multiple virulence and durability of resistance gene pyramids: further comments. *Phytopathology* 81: 240 — 242.
- Osiecka M. 1988. Postępy syntezy ziemniaków diploidalnych odpornych na zarazę ziemniaka (*Phytophthora infestans*) w latach 1980–1984. Genetyczne podstawy hodowli ziemniaka: materiały z konferencji zorganizowanej przez Zakład Genetyki i Syntezy Materiałów Wyjściowych Instytutu Ziemniaka 26–27 lutego 1985 r., Bonin: 47 — 57.
- Pink A. C. D. 2002. Strategies using genes for non-durable disease resistance. *Euphytica* 124: 227 — 236.
- Richardson K. L., Vales M. I., Kling J. G., Mundt C. C., Hayes P. M. 2006. Pyramiding and dissecting disease resistance QTL to barley stripe rust. *Theor. Appl. Genet.* 113: 485 — 495.
- Sharma P. N., Torii A., Takumi S., Mori N., Nakamura C. 2004. Marker-assisted pyramiding of brown planthopper (*Nilaparvata lugens* Stal) resistance genes *Bph1* and *Bph2* on rice chromosome 12. *Hereditas* 140: 61 — 69.
- Shi A., Chen P., Li D., Zheng C., Zhang B., Hou A. 2009. Pyramiding multiple genes for resistance to soybean mosaic virus in soybean using molecular markers. *Mol Breed.* 23: 113 — 124.
- Sieczka M., Pakosińska M. 1991. Synteza materiałów wyjściowych dla hodowli ziemniaków odpornych na wirusy i grzyb *Phytophthora infestans*. Synteza materiałów wyjściowych dla hodowli ziemniaka- dorobek i perspektywa: materiały z konferencji zorganizowanej przez Zakład Genetyki i Syntezy Materiałów Wyjściowych Instytutu Ziemniaka 20–21 lutego 1991r., Bonin: 28 — 40.
- Singh S., Sidhu J. S., Huang N., Vikal Y., Li Z., Brar D. S., Dhaliwal H. S., Khush G. S. 2001. Pyramiding three bacterial blight resistance genes (*xa5*, *xa13* and *Xa21*) using marker-assisted selection into indica rice cultivar PR106. *Theor. Appl. Genet.* 102: 1011 — 1015.
- Stackman E. C., Parker J. H., Piemeisel F. J. 1918. Can biologic forms of stem rust on wheat change rapidly enough to interfere with breeding for rust resistance? *J. Agric. Res.* 14: 111 — 123.
- Śliwka J., Jakuczun H., Kamiński P., Zimnoch-Guzowska E. 2010. Marker-assisted selection of diploid and tetraploid potatoes carrying *Rpi-phu1*, a major gene for resistance to *Phytophthora infestans*. *J. Appl. Genet.* 51: 133 — 140.
- Świeżyński K. M. 1988. Synteza materiałów wyjściowych dla hodowli ziemniaka w latach 1980 — 1984. Genetyczne podstawy hodowli ziemniaka: Materiały z konferencji zorganizowanej przez Zakład Genetyki i Syntezy Materiałów Wyjściowych Instytutu Ziemniaka 26–27 lutego 1985 r., Bonin: 9 — 18.
- Tan M. Y. A., Alles R., Hutten R. C. B., Visser R. G. F., van Eck H. J. 2009. Pyramiding of *Meloidogyne hapla* resistance genes in potato does not result in an increase of resistance. *Potato Res* 52: 331 — 340.
- Tan M. Y. A., Hutten R. C. B., Visser R. G. F., van Eck H. J. 2010. The effect of pyramiding *Phytophthora infestans* resistance genes *Rpi-mcd1* and *Rpi-ber* in potato. *Theor. Appl. Genet.* 121: 117 — 125.
- Tar'an B., Buchwaldt L., Tullu A., Banniza S., Warkentin T. D., Vandenberg A. 2003. Using molecular markers to pyramid genes for resistance to ascochyta blight and anthracnose in lentil (*Lens culinaris* Medik). *Euphytica* 134: 223 — 230.
- Toxopeus H. J. 1957. On the influence of extra *R*-genes on the resistance of the potato to the corresponding p-races of *Phytophthora infestans*. *Euphytica* 6: 106 — 11.
- Tranquilli G. E., Suarez E. Y., Saione H., Sacco F., Tozzini A. 1997. Effect of host allelic dosage on *Triticum aestivum* — *Puccinia recondita* specific interaction. *Plant Breeding* 116: 98 — 100.
- Tuzun S. 2001. The relationship between pathogen-induced systemic resistance (ISR) and multigenic (horizontal) resistance in plants. *Eur. J. Plant Pathol.* 107: 85 — 93.
- Wei Y., Yao F., Zhu C., Jiang M., Li G., Song Y., Wen F. 2008. Breeding of transgenic rice restorer line for multiple resistance against bacterial blight, striped stem borer and herbicide. *Euphytica* 163: 177 — 184.

- Werner K., Friedt W., Ordon F. 2007. Localisation and combination of resistance genes against soil-borne viruses of barley (BaMMV, BaYMV) using doubled haploids and molecular markers. *Euphytica* 158: 323 — 329.
- Widstrom N. W., Butron A., Guo B. Z., Wilson D. M., Snook M. E., Cleveland T.E., Lynch R.E. 2003. Control of preharvest aflatoxin contamination in maize by pyramiding QTL involved in resistance to ear-feeding insects and invasion by *Aspergillus* spp. *Europ. J. Agronomy* 19: 563 — 572.

#### PODZIĘKOWANIA

*Autorzy dziękują prof. Ewie Zimnoch-Guzowskiej za cenne uwagi na temat manuskryptu.*