

Uniwersytet Przyrodniczy w Lublinie

Wybrane zagadnienia z zakresu rolnictwa

Tom 2

Środowisko - Roślina - Zwierzę - Produkt

WUP

Wybrane zagadnienia
z zakresu rolnictwa

Tom 2

Środowisko – Roślina – Zwierzę – Produkt

Wybrane zagadnienia z zakresu rolnictwa

Tom 2

pod redakcją
Marka Babicza
Kingi Kropiwiiec-Domańskiej

Lublin 2022

Recenzent

dr hab. inż. Stefan Stojałowski, prof. uczelni

Redaktor prowadzący
Magdalena Marcewicz

Opracowanie redakcyjne
Agnieszka Brach

Skład i łamanie
Małgorzata Lużyńska

Projekt okładki
Jacek Pałyszka



Ten utwór jest dostępny na licencji Creative Commons Uznanie autorstwa –
Użycie niekomercyjne – Bez utworów zależnych 4.0 Międzynarodowe.

ISBN 978-83-7259-367-2 on-line

DOI: 10.24326/mon.2022.7

WUP

Wydawnictwo Uniwersytetu Przyrodniczego w Lublinie

ul. Akademicka 15, 20-950 Lublin

<https://up.lublin.pl/nauka/wydawnictwo/>

2,6 ark. wyd.

Spis treści

Martyna Bocek, Adrianna Koper, Iga Figura, Emilia Dunia, Joanna Toporowska, Edyta Paczos-Grzęda, Sylwia Sowa

Ocena za pomocą metody ISSR zróżnicowania genetycznego izolowanych z liści owsa grzybów z gatunku <i>Puccinia graminis</i> f. sp. <i>Avenae</i>	7
Assessment of genetic diversity of fungi <i>Puccinia graminis</i> f. sp. <i>avenae</i> isolated from oat leaves by the ISSR	

Emilia Dunia, Iga Figura, Adrianna Koper, Martyna Bocek, Joanna Toporowska, Edyta Paczos-Grzęda, Sylwia Sowa

Analiza za pomocą metody ISSR polimorfizmu genetycznego izolowanych z liści owsa grzybów z gatunku <i>Puccinia coronata</i> f. sp. <i>avenae</i>	15
Genetic polymorphisms of <i>Puccinia coronata</i> f. sp. <i>avenae</i> isolated from oat leaves analysis using the ISSR method	

Iga Figura, Emilia Dunia, Martyna Bocek, Adrianna Koper, Joanna Toporowska, Edyta Paczos-Grzęda, Sylwia Sowa

Ocena możliwości identyfikacji polimorfizmu DNA za pomocą metody ISSR grzybów z gatunku <i>Blumeria graminis</i> f. sp. <i>avenae</i>	23
Assessment of the possibility of identifying DNA polymorphism of <i>Blumeria</i> <i>graminis</i> f. sp. <i>avenae</i> using the ISSR method	

Adrianna Koper, Martyna Bocek, Emilia Dunia, Iga Figura, Joanna Toporowska, Edyta Paczos-Grzęda, Sylwia Sowa

Wpływ sposobu pozyskiwania materiału genetycznego na ocenę zróżnicowania izolatów <i>Puccinia coronata</i> f. sp. <i>avenae</i> metodą ISSR	31
The influence of the method of obtaining genetic material on the evaluation of the diversity of <i>Puccinia coronata</i> f. sp. <i>avenae</i> isolates by the ISSR	

Martyna Bocek¹, Adrianna Koper¹, Iga Figura¹, Emilia Dunia¹, Joanna Toporowska¹,
Edyta Paczos-Grzęda ¹, Sylwia Sowa ¹

Ocena za pomocą metody ISSR zróżnicowania genetycznego izolowanych z liści owsa grzybów z gatunku *Puccinia graminis* f. sp. *avenae*

Assessment of genetic diversity of fungi *Puccinia graminis* f. sp. *avenae* isolated
from oat leaves by the ISSR

Puccinia spp. zaliczane są do głównych grzybowych patogenów roślin. W rankingu najgroźniejszych grzybów chorobotwórczych roślin na całym świecie zajmują trzecie miejsce [Dean i in. 2012]. Do rodziny tej należą takie grzyby, jak *Puccinia graminis*, *P. coronata* czy *P. striiformis*. Jedną z poważniejszych chorób owsa, wywołanych infekcją grzyba z tej rodziny, jest rdza źdźbłowa, która pojawia się po porażeniu *P. graminis* f. sp. *avenae*. Choroba ta występuje w większości miejsc, w których uprawiany jest owies, i powoduje stratę znacznej ilości plonów [Martens 1985]. Objawy infekcji pojawiają się głównie na łodygach i liściach, rzadziej na plewach w postaci małych, odbarwionych plamek występujących na początku zakażenia. Po ok. 10 dniach od porażenia tworzy się kilkumilimetrowa szpara w skórce liścia, która powstaje w wyniku pęknięcia tkanki roślinnej pod wpływem nacisku masy ceglastoczerwonych uredinospór będących jednym z zarodników powstających w trakcie cyklu rozwojowego *P. graminis* f. sp. *avenae*. Masy uredinospór wyglądem przypominają rdzawe plamy. Z czasem grzyb przestaje wytwarzać uredinospory i w ich miejsce tworzy się warstwa czarnych teliospor, co wywołuje czernienie pod koniec sezonu łodyg silnie porażonych roślin [Leonard i Szabo 2005].

Puccinia graminis ma złożony cykl życiowy, obejmujący dwie różne rodziny żywicieli: krzew berberysu i trawy. Grzyb zimuje na słomie i resztkach roślinnych w postaci dwukomórkowych czarnych zarodników zwanych teliosporami. Po przezimowaniu z teliospor formuje się bazidium, na którym tworzą się cztery bazydiospory. Po uwolnieniu są one przenoszone przez wiatr na inne rośliny, w wyniku czego może dojść do zakażenia żywiciela pośredniego, jakim jest berberys. Po infekcji żywiciela pośredniego na górnej części liścia tworzą się pyknidia (spermogonie), które otwierają się po 1–2 tygodniach, uwalniając pikniospory (spermatia). Spermogonie zawierają także strzępki, które działają jak gamety żeńskie. Fuzja między spermatiami a strzępkami żeńskimi prowadzi do powstania dikariotycznego ecjum na dolnej części liścia berberysu. Wewnątrz ecjów tworzone są dikariotyczne ecjospory, które rozprzestrzeniane drogą powietrzną infekują pobliskie zboża lub trawy. Po infekcji ecjospory przekształcają się w uredinia i kończą cykl

¹ Uniwersytet Przyrodniczy w Lublinie, Wydział Agrobiotechnologii, Koło Naukowe Studentów Bioinżynierii i Biotechnologii BioGen, martynabocek@gmail.com

życiowy rdzy źdźbłowej [Berlin i in. 2012, Szabo i in. 2014]. W urediniach powstają urediniospory – czerwono-brunatne, jednokomórkowe, dwujądrowe zarodniki o grubej i chropowatej ścianie komórkowej [Malinowski 1966].

Rozmnażanie płciowe umożliwia rekombinacje genetyczne, w których wyniku powstają osobniki o różnym stopniu wirulencji, co może mieć poważne konsekwencje dla produkcji roślinnej zbóż [Berlin i in. 2012]. Jednym ze sposobów umożliwiających zbadanie polimorfizmu w obrębie różnych gatunków są markery ISSR. Technika, która polega na zastosowaniu sekwencji mikrosatelitarnych jako starterów w łańcuchowej reakcji polimerazy w celu wygenerowania markerów z wielu loci jest PCR-ISSR. Metoda ta opiera się na amplifikacji segmentu DNA znajdującego się w możliwej do powielenia odległości pomiędzy dwoma identycznymi, skierowanymi w przeciwnym kierunku regionami powtórzeń mikrosatelitarnych. Markery ISSR charakteryzują się wysokim polimorfizmem i są przydatne w badaniach nad różnorodnością genetyczną, filogenezą czy biologią ewolucyjną [Reddy i in. 2002].

W ostatnich latach wzrosło zainteresowanie owsem zwyczajnym (*Avena sativa* L.) i produktami owsianymi. Jest to wyjątkowo atrakcyjne i wartościowe zboże posiadające wiele właściwości prozdrowotnych. Przyczynia się m.in. do obniżenia poziomu cholesterolu w surowicy krwi, reguluje poziom glukozy we krwi, korzystnie wpływa również na układ sercowo-naczyniowy, wzmacnia system odpornościowy i nerwowy. Ponadto owies wykorzystywany jest również do produkcji pasz dla zwierząt [Kawka i Achremowicz 2014]. Wszystko to sprawia, że owies jest uprawiany na szeroką skalę, a niskie wymagania uprawne oraz temperaturowe prowadzą ponadto do tego, że jest to jedno z najczęściej uprawianych zbóż w Polsce [Gąsiorowski 1995, Zarzecka i in. 2018]. W 2021 roku uprawa owsa w Polsce zajmowała 0,5 mln ha, a plony wynosiły 1,7 mln ton [GUS 2021]. Wszelkie patogeny atakujące owies powodują znaczne utraty w zbiorach, dlatego ważne jest to, aby analizować wirulencję i biologię drobnoustrojów chorobotwórczych, a do takich należy np. *Puccinia graminis* f. sp. *avenae*.

Z uwagi na budowę urediniospor (gruba ściana komórkowa) izolacja materiału genetycznego bezpośrednio z zarodników jest bardzo trudna, a ilość wyekstrahowanego materiału jest zazwyczaj niewielka. Z tego powodu sprawdzono, czy jest możliwe wyizolowanie materiału genetycznego *P. graminis* f. sp. *avenae* z liści owsa porażonych tym patogenem. Poniższa praca koncentruje się na ocenie możliwości wykorzystania metody ISSR do wykrycia polimorfizmu DNA izolatów *P. graminis* f. sp. *avenae* o zróżnicowanym pochodzeniu geograficznym w oparciu o DNA grzyba wyizolowane wraz z DNA rośliny żywicielskiej.

Material i metody

Wszystkie izolaty *P. graminis* f. sp. *avenae* wykorzystane w badaniu pochodziły z Polski, z miejscowości: Czesławice, Kopaszewo, Ożarów, Strzelce i Lublin (ryc. 1, tab. 1). Izolaty pochodzące z pojedynczego zarodnika wyodrębniono z zebranych populacji metodą pięciokrotnego pasażowania. Pasażowanie prowadzono na fragmentach liści 10-dniowych siewek odmiany 'Kasztan' wyłożonych na szalki Petriego, które wypełnione były agarem (0,6%) z dodatkiem benzimidazolu (3,4 mM). Szalki inokulowano zarodnikami z poszczególnych lokalizacji, po czym umieszczono w fitotronie na 10 dni, w odpowiednich warunkach: temperaturze 17°C oraz natężeniu światła 4 kLx i wilgotności powietrza 70%.



Ryc. 1. Rozmieszczenie lokalizacji, z których pochodziły analizowane izolaty *Puccinia graminis* f. sp. *avenae*

Tabela 1. Charakterystyka izolatów *Puccinia graminis* f. sp. *avenae* wykorzystanych do analizy

Lp.	Nazwa	Poziom wyrównania	Lokalizacja	Województwo
1.	C. 18/1 PK 2/6	izolat	Czesławice	lubelskie
2.	C. 18/3 PK 1/6	izolat	Czesławice	lubelskie
3.	K. 18/1 PK 1/6	izolat	Kopaszewo	wielkopolskie
4.	K. 18/1 PK 1/5	izolat	Kopaszewo	wielkopolskie
5.	O. 18 PK 1/6	izolat	Ożarów	świętokrzyskie
6.	O. 18 PK 2/6	izolat	Ożarów	świętokrzyskie
7.	S. 18/1 PK 1/5	izolat	Strzelce	łódzkie
8.	S. 18/2 PK 1/5	izolat	Strzelce	łódzkie
9.	S. 18/3 PK 1/5	izolat	Strzelce	łódzkie
10.	L. 18/1 PK 1/5	izolat	Lublin	lubelskie

Po upływie 10 dni porażony owies zebrano i przeprowadzono izolację całkowitego DNA z wykorzystaniem zestawu Plant & Fungi DNA Purification Kit (EURx, Polska). Materiał izolowano według procedury opisanej przez producenta. Przed wykonaniem izolacji na mikrokolumny naniesiono 40 μ l buforu aktywacyjnego i pozostawiono w temperaturze pokojowej do chwili naniesienia lizatu na kolumnę. Zarodniki zhomogenizowano w ciekłym azocie z wykorzystaniem moździerza i tłuczka. Uzyskany materiał przeniesiono do probówki 2 ml typu Eppendorf. Osad zawieszono w 400 μ l buforu Lyse F w celu osadzenia rozdrobnionej tkanki na dnie probówki. Do zawiesiny dodano 3 μ l RNase A i 10 μ l Proteinase K. Probówkę poddano działaniu wortexu i inkubowano przez 30 min w temp. 65°C. Podczas inkubacji mieszaninę dwukrotnie mieszano. Dodano 130 μ l buforu AC, dokładnie wymieszano przez inwersję i inkubowano przez 5 min na lodzie. Wirowano 10 min z prędkością 15 000 \times g. Znad osadu zebrano 400 μ l supernatantu, przeniesiono do nowej probówki, a następnie dodano 350 μ l buforu Sol P i 250 μ l 96% etanolu. Wymieszano przez inwersję oraz zwirowano przez 1 min z prędkością 14 000 \times g. Następnie przeniesiono 600 μ l supernatantu do minikolumny znajdującej się w probówce i zwirowano przez 1 min z prędkością 14 000 \times g. Wyjęto kolumnę, wylano przesącz, a następnie umieszczono minikolumnę z powrotem w próbce odbierającej. Pozostały supernatant przeniesiono do minikolumny. Zwirowano przez 1 min z prędkością 14 000 \times g. Wylano przesącz, a minikolumnę umieszczono z powrotem w probówce. Dodano 500 μ l buforu płuczającego Wash PX i zwirowano przez 1 min z prędkością 14 000 \times g. Wirowanie powtórzono dwukrotnie. Minikolumnę umieszczono w nowej probówce typu Eppendorf 1,5 ml. Dodano 120 μ l buforu Elution (10 mM Tris-HCl, pH 8,5) ogrzanego do temp. 80°C. Minikolumnę pozostawiono na 3 min w temperaturze pokojowej, a następnie poddano wirowaniu przez 1 min 14 000 \times g w celu zwiększenia wydajności izolacji. DNA gotowe do dalszych analiz zamrożono w temp. -20°C. Dodatkowo, w celu identyfikacji prązków pochodzących z rośliny, wyizolowano DNA z liści odmiany 'Kasztan' niepoddanych infekcji. Izolacja została wykonana tą samą metodą.

Stężenie oraz czystość wyizolowanego DNA sprawdzono z wykorzystaniem spektrofotometru Nanodrop dla próby o objętości 1 μ l. Przygotowane w ten sposób próby doprowadzono do jednakowego stężenia 10 ng \cdot μ l⁻¹. Kolejnym etapem był rozdział elektroforetyczny, który przeprowadzono z użyciem zestawu do elektroforezy poziomej Agagel Maxi (Biometra). Elektroforeza była wykonana w obecności bromku etydyny (50 ng \cdot ml⁻¹) w 1,5% żelu agarozowym, w buforze 1 \times TBE przez 1,5 godziny przy napięciu 120 V. Efekt rozdziału zwizualizowano w świetle UV i udokumentowano przy użyciu aparatu fotograficznego.

Amplifikację regionów mikrosatelitarnych przeprowadzono z użyciem metody PCR z zastosowaniem 80 starterów ISSR. Wstępna analiza obejmowała amplifikację dwóch wybranych losowo prób. Następnie sporządzono elektroforegram, na którego podstawie wybrano 13 starterów, które zostały wykorzystane do przeprowadzenia dalszych analiz. W skład mieszaniny reakcyjnej o objętości 10 μ l wchodziły: 1 \times bufor do PCR (75 mM Tris-HCl pH 8,8; 20 mM (NH₄)₂SO₄, 0,01% Tween 20; Thermo Fischer); 200 μ M każdego dNTP; 5 pM startera; 1,5 mM MgCl₂; 20 ng genomowego DNA; 0,5 U DreamTaq Polymerase (Thermo Fischer). Reakcja PCR została przeprowadzona w termocyklerze TProfessional Basic firmy Biometra®. Profil termiczny reakcji był następujący: wstępna denaturacja przez 4 min, 36 cykli: denaturacja 94°C – 30 s, przyłączanie starterów: trzy pierwsze cykle 54°C – 45 s, trzy kolejne cykle 53°C – 45 s i 30 cykli 52°C – 45 s, wydłużanie starterów 72°C – 1 min, z końcową inkubacją 7 min w 72°C.

Aby zobrazować produkty reakcji amplifikacji oraz zidentyfikować prawdopodobne polimorfizmy, przeprowadzono rozdział elektroforetyczny. Rozdział wykonano w 1,5% żelu agarozowym z 0,01% EtBr w buforze TBE (89 mM Tris-boran, 2,5 mM EDTA) przez 1,5 godziny przy napięciu 120 V. Efekt rozdziału zwizualizowano w świetle UV i udokumentowano przy użyciu aparatu fotograficznego.

W celu określenia polimorfizmu obecność prążka odnotowano jako pojedynczą cechę, której przypisano wartość w systemie 0/1 i przekonwertowano na matrycę binarną. Otrzymaną matrycę poddano analizie statystycznej w programie XLSTAT (Addinsoft, Inc., Brooklyn, NY, USA) [XLSTAT 2019] oraz PAST 4.0 [Hammer i in. 2001]. Oce-niono dystans genetyczny, stosując współczynnik Dice'a [Dice 1945] i skonstruowano dendrogram metodą Warda [Ward 1963].

Wyniki i dyskusja

Aby sprawdzić możliwość wykorzystania metody ISSR do analizy polimorfizmu DNA *P. graminis* f. sp. *avenae* w tle odmiany owsa zwyczajnego 'Kasztan', przeprowadzono reakcje z DNA izolatów w celu identyfikacji takich starterów, które inicjowały amplifikację największej liczby łatwo rozróżnialnych produktów. Wybrano cztery startery: ISSR 16, ISSR 17, ISSR 31, ISSR 33, których sekwencje zostały podane w tabeli 2. Wytypowane startery wykorzystano następnie do reakcji PCR-ISSR, stosując jako matryce DNA 10 izolatów.

Cztery startery ISSR inicjowały amplifikację łącznie 76 typów ampikonów DNA, z których 41 (54%) pochodziło z odmiany 'Kasztan' (tab. 2). Liczba polimorficznych prążków obejmowała 18 fragmentów (23,7%). Największą liczbę amplifikowanych produktów zaobserwowano dla startera ISSR 16; dla niego uzyskano także najwięcej fragmentów polimorficznych. Jedynie 11 prążków zidentyfikowano jako monomorficzne dla *P. graminis*, a w przypadku prążków specyficznych dla pojedynczych izolatów *P. graminis* otrzymano 6 fragmentów, co daje 7,9% z całkowitej liczby uzyskanych produktów.

Tabela 2. Charakterystyka polimorfizmu badanych izolatów *Puccinia graminis* f. sp. *avenae* zidentyfikowanego metodą ISSR

Lp.	Starter	Sekwencja 5'-3'	Liczba fragmentów				
			całkowita	specyficznych dla odmiany 'Kasztan'	polimorfi- cznych dla <i>P. graminis</i>	monomorfi- cznych dla <i>P. graminis</i>	specyficznych dla <i>P. graminis</i>
1.	ISSR16	(GA) ₈ C	25	13	7	3	2
2.	ISSR17	(GA) ₈ YC	24	16	3	2	3
3.	ISSR31	(AG) ₈ YC	15	4	6	5	0
4.	ISSR33	(AG) ₈ T	12	8	2	1	1
Suma			76	41	18	11	6
Średnia			19	10,25	4,5	2,75	1,5
%			100	54	23,6	14,5	7,9

Biorąc pod uwagę produkty uzyskane dla poszczególnych izolatów, suma wszystkich prążków była bardzo podobna dla każdego z nich i wynosiła od 58 do 62 (tab. 3). Suma prążków monomorficznych dla *P. graminis* wyniosła 10. Najwięcej prążków polimorficznych (11) uzyskano w oparciu o DNA izolatu K. 18/1 PK 1/5 pochodzącego z Kopaszewa, natomiast najmniej dla izolatu S. 18/1 PK 1/5 pozyskanego ze Strzelec (7). Prążki specyficzne dla badanego izolatu patogenu zaobserwowano tylko dla 4 genotypów (K. 18/1 PK 1/6, S. 18/1 PK 1/5, S. 18/2 PK 1/5, S. 18/3 PK 1/5), przy czym najwięcej (3 amplikony) uzyskano dla S. 18/2 PK 1/5 ze Strzelec.

Tabela 3. Charakterystyka badanych izolatów *Puccinia graminis* f. sp. *avenae*

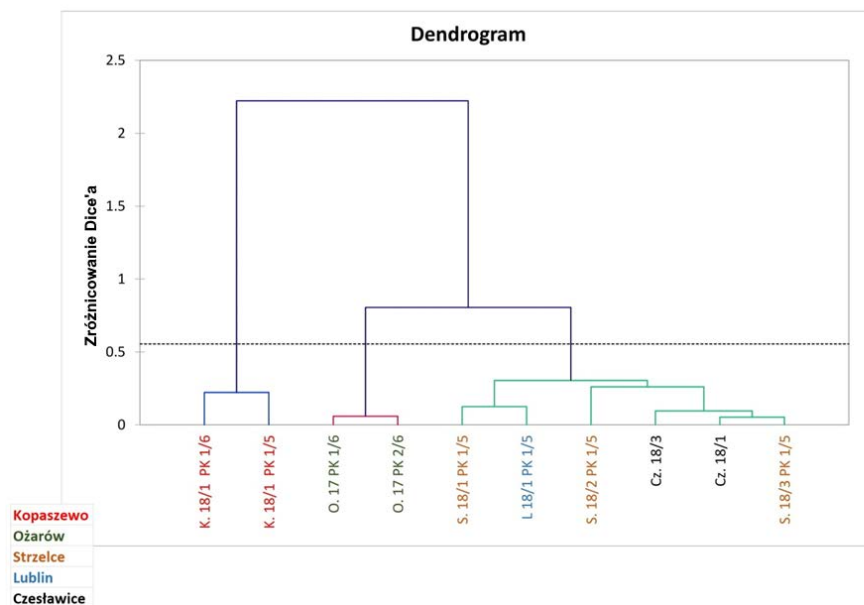
Lp.	Izolat	Suma prążków					
		wszystkich	z odmiany 'Kasztan'	monomorficznych dla grzyba	polimorficznych dla grzyba	specyficznych dla grzyba	wszystkich z grzyba
1.	C. 18/1 PK 2/6	58	39	10	9	0	19
2.	C. 18/3 PK 1/6	58	40	10	8	0	18
3.	K. 18/1 PK 1/6	59	40	10	8	1	19
4.	K. 18/1 PK 1/5	61	40	10	11	0	21
5.	O. 18 PK 1/6	59	41	10	8	0	18
6.	O. 18 PK 2/6	60	41	10	9	0	19
7.	S. 18/1 PK 1/5	59	41	10	7	1	18
8.	S. 18/2 PK 1/5	61	41	10	8	2	20
9.	S. 18/3 PK 1/5	62	42	10	9	1	20
10.	L. 18/1 PK 1/5	59	41	10	8	0	18

Na podstawie polimorfizmu zidentyfikowanego metodą ISSR-PCR dla 10 izolatów określono ich dystans genetyczny. Średnia wartość dystansu wynosiła 0,497, wahając się od 0,053 pomiędzy S. 18/3 PK 1/5 a C. 18/1 PK 2/6 do 1,00 między S. 18/1 PK 1/5 a K. 18/1 PK 1/6, L. 18/1 PK 1/5 a K. 18/1 PK 1/6 oraz S. 18/1 PK 1/5 a K. 18/1 PK 1/5 (tab. 4).

Na dendrogramie skonstruowanym metodą Warda (ryc. 2) można wyodrębnić dwie główne grupy skupień, w tym jedną obejmującą izolaty z Kopaszewa oraz drugą zawierającą wszystkie pozostałe analizowane izolaty. W obrębie tej drugiej grupy uformowały się dwa subklastry: pierwszy grupujący izolaty z Ożarowa oraz drugi grupujący izolaty ze Strzelec, Czesławic i Lublina. Na podstawie dendrogramu można stwierdzić, że najbardziej odmienne od pozostałych badanych izolatów były te pochodzące z Kopaszewa, a w następnej kolejności izolaty z Ożarowa.

Tabela 4. Matryca indeksów dystansu genetycznego Dice'a pomiędzy analizowanymi izolatami *Puccinia graminis* f. sp. *avenae* określonych na podstawie polimorfizmu identyfikowanego metodą ISSR

	C. 18/1 PK 2/6	C. 18/3 PK 1/6	K. 18/1 PK 1/6	K. 18/1 PK 1/5	O. 18 PK 1/6	O. 18 PK 2/6	S. 18/1 PK 1/5	S. 18/2 PK1/5	S. 18/3 PK 1/5
C. 18/1 PK 2/6									
C. 18/3 PK 1/6	0,059								
K. 18/1 PK 1/6	0,882	0,875							
K. 18/1 PK 1/5	0,789	0,889	0,222						
O. 18 PK 1/6	0,294	0,375	0,875	0,556					
O. 18 PK 2/6	0,222	0,294	0,882	0,579	0,059				
S. 18/1 PK 1/5	0,176	0,125	1,000	1,000	0,500	0,412			
S. 18/2 PK 1/5	0,200	0,158	0,895	0,905	0,474	0,400	0,263		
S. 18/3 PK 1/5	0,053	0,111	0,889	0,800	0,333	0,263	0,222	0,238	
L. 18/1 PK 1/5	0,176	0,125	1,000	0,889	0,375	0,294	0,125	0,263	0,222



Ryc. 2. Dendrogram badanych izolatów *Puccinia graminis* f. sp. *avenae* uzyskany metodą Warda w oparciu o polimorfizm identyfikowany za pomocą metody ISSR-PCR

W oparciu o uzyskane wyniki można stwierdzić, że wykorzystana w pracy metoda izolacji jest wiarygodna i istnieje możliwość uzyskania DNA specyficznego dla *P. graminis* f. sp. *avenae*, ekstrahując materiał z liści porażonych tym patogenem. Technika ta jest prostsza i mniej pracochłonna niż bezpośrednia izolacja DNA z zarodników. Metoda PCR-ISSR jest ponadto dobra do oceny różnicowania genetycznego *P. graminis* f. sp. *avenae*, na co wskazuje fakt, że zidentyfikowano łącznie 46% amplikonów pochodzenia grzybowego.

Bibliografia

- Berlin A., Djurle A., Samils B., Yuen J., 2012. Genetic variation in *Puccinia graminis* collected from oats, rye and barberry. *Phytopathology* 102, 1006–1012.
- Dean R., Van Kan J.A., Pretorius Z., Hammond-Kosack K., Pietro A., Spanu P., Rudd J., Dickman M., Kahmann R., Ellis J., Foster G., 2012. The top 10 fungal pathogens in molecular plant pathology. *Mol. Plant Pathol.* 13(4), 414–430.
- Dice L.R., 1945. Measures of the amount of ecologic association between species. *Ecology* 26(3), 297–302.
- Gąsiorowski H., 1995. Charakterystyka ogólna. W: *Owies: chemia i technologia*. Państwowe Wydawnictwo Rolnicze i Leśne, Poznań, 47–102.
- Główny Urząd Statystyczny, 2021. Wynikowy szacunek głównych ziemiopłodów rolnych i ogrodniczych w 2021 r. *Informacje Sygnalne*.
- Hammer Ø., Harper D.A.T., Ryan P.D., 2001. PAST: Paleontological Statistics Software Package for education and data analysis. *Palaeontol. Electron.* 4(4), 1–9.
- Kawka A., Achremowicz B., 2014. Owies – roślina XXI wieku. Wykorzystanie żywieniowe i przemysłowe. *Nauka Przyr. Technol.* 8, 3.
- Leonard K.J., Szabo L.J., 2005. Stem rust of small grains and grasses caused by *Puccinia graminis*. *Mol. Plant Pathol.* 6(2), 99–111.
- Malinowski E., 1966. *Anatomia roślin*. PWN, Warszawa.
- Martens J.W., 1985. Oat stem rust. W: *The cereal rust vol. II: Diseases, distribution, epidemiology and control*, Roelfs A.P., Bushnell W. R. (red.). Academic Press INC., London, 116–142.
- Reddy M., Sarla N., Siddiq E., 2002. Inter simple sequence repeat (ISSR) polymorphism and its application in plant breeding. *Euphytica* 128, 9–17.
- Szabo L., Cuomo Ch., Park R., 2014. *Puccinia graminis*. W: *Genomics of plant-associated fungi: monocot pathogens*, R. Dean, A. Lichens-Park, C. Kole (red.). Springer Heidelberg, New York Dordrecht London, 177–197.
- Ward J.H., 1963. Hierarchical grouping to optimize an objective function. *J. Am. Stat. Assoc.* 58, 301, 236–244.
- XLSTAT 2019. XLSTAT 2019.4.1 statistical and data analysis solution. Addinsoft, Inc., Brooklyn, NY, USA.
- Zarzecka K., Gugala M., Mystkowska I., Baranowska A., Sikorska A., Zarzecka M., 2018. Odżywcze i prozdrowotne właściwości ziarna owsa i przetworów owsianych. *Kosmos* 67(2), 409–414.

Analiza za pomocą metody ISSR polimorfizmu genetycznego izolowanych z liści owsa grzybów z gatunku *Puccinia coronata* f. sp. *avenae*

Genetic polymorphisms of *Puccinia coronata* f. sp. *avenae* isolated from oat leaves
analysis using the ISSR method

Owies zwyczajny (*Avena sativa* L.) należy do rodzaju *Avena* L., rodziny *Poaceae* Barnh [Frey i Rutkowski 2002]. Pod względem wielkości upraw owies zwyczajny zajmuje szóste miejsce na świecie [FAO 2022]. W Polsce powierzchnia uprawy owsa stanowi 7% ogólnych zasiewów zbóż według Głównego Urzędu Statystycznego [GUS 2020]. *Avena sativa* jest rośliną jednoroczną, występującą w dwóch formach: jarej i ozimej, które różnią się między sobą okresem wegetacji. W większości krajów Europy, również w Polsce, uprawia się odmiany jare, które mają zdolność do pełnego rozwoju w trakcie jednego okresu wegetacyjnego [Chawade i in. 2012]. Owies ozimy daje większe plony i możliwy jest jego wcześniejszy zbiór, niemniej jednak jego niska mrozoodporność ogranicza wykorzystanie tej rośliny w warunkach klimatycznych Polski. *Avena sativa* jest rośliną fitosanitarną, dzięki czemu bardzo często stosowana jest w płodozmianie zdominowanym przez gatunki zbożowe [Michtha i in. 2021]. Owies jest wykorzystywany jako pasza dla zwierząt, ale dzięki poznaniu jego korzystnych właściwości wzrosło jego znaczenie w żywieniu ludzi, kosmetologii oraz medycynie. Działa on prozdrowotnie na organizm ludzki oraz zwierzęcy, ponieważ jest źródłem składników odżywczych i związków bioaktywnych, np. błonnika. Również białko znajdujące się w owsie zwyczajnym jest cenniejsze i bogatsze w aminokwasy egzogenne niż pochodzące z innych zbóż [Kawka i Achremowicz 2014]. Owies jest zbożem łatwym w uprawie ze względu na doskonałe wykorzystanie składników pokarmowych znajdujących się w glebie, a także zdolność wzrostu na zakwaszonym podłożu o niskich wartościach pH [Michtha i in. 2021].

Jedną z najczęściej występujących chorób grzybowych owsa jest rdza koronowa wywoływana przez grzyb *Puccinia coronata* f. sp. *avenae*. Grzyb ten uszkadza tkankę liściową, co prowadzi do nieprawidłowości podczas procesu fotosyntezy, a następnie wpływa na obniżenie plonu oraz zmniejszenie masy i ilości ziarna [Kebede i in. 2019, Paczos-Grzęda i Sowa 2019]. Objawem zakażenia owsa rdzą koronową jest duża ilość pomarańczowo-żółtych okrągłych lub podłużnych skupisk uredyniów na liściach. Uredyniospory uwalniające się z uredyniów mogą przemieszczać się na duże odległości za pomocą wiatru [Jackson i in. 2008]. W ten sposób może dojść do zarażenia upraw owsa

¹ Uniwersytet Przyrodniczy w Lublinie, Wydział Agrobiotechnologii, Studenckie Koło Naukowe Bioinżynierów i Biotechnologów BioGen, emilia.dunia@onet.pl

² Uniwersytet Przyrodniczy w Lublinie, Wydział Agrobiotechnologii, Instytut Genetyki, Hodowli i Biotechnologii Roślin

w promieniu wielu kilometrów. Zakażenie widoczne jest głównie na powierzchni liści, a sporadycznie także na pochwach liściowych, źdźbłach lub strukturach kwiatowych. Porażenie często wiąże się z wystąpieniem chloroz lub nekroz. Największy odsetek upraw owsa zarażonych rdzą koronową występuje na obszarach o dużej wilgotności i wysokiej temperaturze [Nazareno i in. 2018].

Puccinia coronata f. sp. *avenae* jest grzybem należącym do typu podstawczaków i pochodzącym z rodziny rdzowatych (*Pucciniaceae*), rzędu rdzowców (*Pucciniales*). Pierwszy raz został opisany przez Cordę w 1837 r. [Liu i Hambleton 2013]. Do rozwoju i rozmnażania *P. coronata* potrzebuje tkanek żywych organizmów, poza nimi może przetrwać jedynie w formie wyspecjalizowanych zarodników. Grzyb jest obligatoryjnym biotrofem, a do przejścia pełnego cyklu rozwojowego potrzebuje dwóch żywicieli: ostatecznego, którym jest owies, oraz pośredniego, czyli szklaku (*Rhannus*) [Nazareno i in. 2018]. Zarodniki po wykiełkowaniu tworzą appresoria – fragmenty strzępek pozwalające na przymocowanie się grzyba do grzbietowej strony liścia. W wyniku penetracji grzyb przedostaje się do przestrzeni między górną a dolną epidermą liścia. W jamie aparatu szparkowego powstaje pęcherzyk, z którego wytwarzane są wydłużające się strzępki infekcyjne. Z nich powstają haustoria – ssawki, są one wyspecjalizowanymi strukturami żywieniowymi, umożliwiającymi pobieranie składników odżywczych i wydzielanie białek efektorowych do komórek gospodarza. Badania patogennych grzybów rdzawnikowych (*Uredinales*) wykazały, że zewnętrzna warstwa ściany komórkowej struktur zakażających, które tworzą się na powierzchni liści, zawiera chitynę, podczas gdy w warstwie ściany komórkowej struktur grzyba znajdujących się we wnętrzu rośliny występuje chitozan [Goździcka-Józefiak i in. 2009].

Narzędziem wykorzystywanym w biologii molekularnej do oceny zróżnicowania genetycznego są markery molekularne. Metoda ISSR jest modyfikacją PCR. Polega na amplifikacji fragmentów DNA znajdujących się pomiędzy dwoma mikrosatelitarnymi regionami, które są zorientowane w przeciwnych kierunkach. Metoda ISSR może być użyta do analizy DNA wszystkich gatunków zawierających wystarczającą liczbę odpowiednio zlokalizowanych sekwencji mikrosatelitarnych. Otrzymane amplikony mają zwykle od 200 do 2000 bp długości. Technika ta jest prosta, szybka oraz odznacza się wysoką powtarzalnością. Uzyskane za jej pomocą wyniki są łatwe do zwizualizowania za pomocą elektroforezy w żelu agarozowym lub poliakrylamidowym. Do przeprowadzenia analizy potrzebna jest niewielka ilość materiału genetycznego [Ziętkiewicz i in. 1994]. Wiarygodność metody wynika między innymi ze stosowania stosunkowo wysokiej temperatury przyłączania starterów wykorzystywanych w reakcji. Startery w swojej sekwencji mają fragment komplementarny do sekwencji powtarzalnej oraz nukleotydy zakotwiczone na końcu 5' lub 3'. Uzyskiwane przy udziale tej metody markery mają charakter dominujący, a więc nie pozwalają na rozróżnienie alleli w obrębie jednego locus.

Jedną z najważniejszych cech charakteryzujących każdą populację jest zróżnicowanie genetyczne będące wynikiem selekcji naturalnej występującej w środowisku. Stanowi ono podstawę zachowania zdolności adaptacyjnych populacji do zmiennych warunków środowiskowych. Umożliwia zachowanie stabilności i trwałości populacji podczas zmiany warunków klimatycznych, jest również czynnikiem chroniącym przed stresem biotycznym lub abiotycznym. Zmieniające się warunki środowiska mogą prowadzić do zubożenia zmienności genetycznej poprzez eliminację określonych genotypów z populacji. Niski stopień zróżnicowania genetycznego prowadzi zazwyczaj do obniżenia zdolności adaptacyjnej populacji.

Celem niniejszej pracy była ocena możliwości wykorzystania metody ISSR do wykrycia polimorfizmu DNA wśród izolatów *P. coronata* f. sp. *avenae* o zróżnicowanym pochodzeniu geograficznym. W pracy wykorzystano odmienną od dotychczas stosowanych metodę izolacji

DNA grzyba. W przeciwieństwie do standardowej metody izolacji z zarodników przeprowadzono izolację z zainfekowanych liści. Materiał wyjściowy do ekstrakcji kwasów nukleinowych stanowiły porażone rdzą koronową liście wrażliwej odmiany ‘Kasztan’.

Material i metody

Materiał do badań stanowiło sześć izolatów *Puccinia coronata* f. sp. *avenae* zebranych w różnych częściach Polski w latach 2017–2018 (tab. 1). Uredinospory zbierane były w Polsce w trzech lokalizacjach: Czesławice i Kijany (woj. lubelskie) oraz Polanowice (woj. małopolskie).

Tabela 1. Charakterystyka izolatów *Puccinia coronata* f. sp. *avenae* wykorzystanych do analizy

Lp.	Nazwa	Poziom wyrównania	Miejsce pochodzenia	Rok pochodzenia
1.	Cz. 14 2/5 50	izolat	Czesławice	2017
2.	Cz. 17 3/5 68		Czesławice	2017
3.	P. 3 2/5 9210 70		Polanowice	2017
4.	P. 1.1/5		Polanowice	2017
5.	P. 3 1/5 94		Polanowice	2017
6.	K. 18 PK 2/5		Kijany	2018

Izolaty pochodzące z pojedynczego zarodnika uzyskano w wyniku pięciokrotnego pasażowania. Prowadzono je na fragmentach liści 10-dniowych siewek odmiany ‘Kasztan’ wyłożonych na szalki Petriego wypełnione agarom (0,6%) z dodatkiem benzimidazolu (3,4 mM). Szalki inokulowano zarodnikami pochodzącymi z poszczególnych lokalizacji, a następnie umieszczano na 10 dni w fitotronie przy kontrolowanym natężeniu światła (4 kLx) i wilgotności powietrza (70%), w temp. 17°C. Po pojawieniu się na powierzchni liści dużych ilości zarodników przeprowadzono izolację całkowitego DNA z liści odmiany ‘Kasztan’ porażonych sześcioma izolatami *P. coronata* zgodnie z metodą dołączoną do zestawu komercyjnego Plant & Fungi DNA Purification Kit (EURx, Polska). Przed izolacją tkankę zhomogenizowano w ciepłym azocie z wykorzystaniem móżdziejca i tłuczka. Uzyskany materiał przeniesiono do próbówki 2 ml typu Eppendorf i zawieszono w buforze Lyse F przeznaczonym do izolacji kwasów nukleinowych z grzybów. Po przeprowadzeniu izolacji uzyskane w buforze do elucji roztwory DNA zamrożono w temp. –20°C.

W celu oznaczenia jakości wyizolowanego DNA został przeprowadzony rozdział elektroforetyczny w 1% żelu agarozowym. W tym celu wykorzystano zestaw do elektroforezy poziomej Agagel Maxi (Biometra). Rozdział przeprowadzono w buforze 1 × TBE przez 0,5 godziny przy napięciu 120 V. Stężenie wyizolowanego DNA zostało ocenione przy użyciu spektrofotometru Nanodrop dla próby o objętości 1 µl. Opierając się na uzyskanych wynikach, wykonano rozcieńczenia wszystkich próbek do jednakowego stężenia 10 ng/µl. W ten sposób uzyskano matrycę do reakcji PCR.

Do przeprowadzenia analiz wytypowano na podstawie wcześniej prowadzonych badań sześć starterów (tab. 2). Reakcję prowadzono w objętości 10 µl. W skład mieszaniny reakcyjnej wchodziły: 1 × bufor do PCR [(NH₄)₂SO₄]; 200 nM dNTP; 5 pM startera ISSR; 1,5 mM MgCl₂; 40 ng genomowego DNA; 0,8U polimerazy *Taq*. Zastosowano następujący profil termiczny: wstępna denaturacja przez 4 min w temp. 94°C, 36 cykli: denaturacja 94°C

– 30 s, przyłączanie starterów: trzy pierwsze cykle 54°C – 45 s, trzy kolejne cykle 53°C – 45 s i trzy cykle 52°C – 45 s, wydłużanie starterów 72°C – 1 min, z końcową inkubacją 7 min w 72°C. Produkty reakcji PCR rozdzielano w 2% żelu agarozowym z 0,01% EtBr w buforze TBE (89 mM Tris-boran, 2,5 mM EDTA). Żele fotografowano, wykorzystując system dokumentacji. Analizę zdjęć dokonano, przekształcając je na matrycę binarną. Obecność produktu ISSR oznaczano jako 1, zaś jego brak jako 0. Otrzymaną matrycę poddano analizie statystycznej w programie PAST 3.19 [Hammer i in. 2001].

Wyniki i dyskusja

Do analizy wykorzystano sześć starterów: ISSR 1, ISSR 14, ISSR 16, ISSR 17, ISSR 31, ISSR 33 (tab. 2), których użyto do reakcji PCR-ISSR, wykorzystując jako matryce DNA sześć izolatów *P. coronata* f. sp. *avenae* izolowanych wraz z tkanką żywiciela – *A. sativa* ‘Kasztan’. W reakcji z wymienionymi wyżej starterami uzyskano łącznie 93 typy produktów, w tym 21 na matrycy DNA grzyba, spośród których 13 (13,9%) było polimorficznych, a 8 (8,6%) monomorficznych. Średnio na starter przypadało 16 produktów PCR. Największą liczbę amplikonów obserwowano w przypadku startera ISSR 33, największą liczbę fragmentów polimorficznych uzyskano w przypadku startera ISSR 14, a monomorficznych – w obecności startera ISSR 16, jednocześnie w obecności tego startera zaobserwowano najwięcej amplikonów pochodzących z *P. coronata* f. sp. *avenae* (38%) w stosunku do wszystkich amplikonów. Zaledwie dwa produkty specyficzne dla pojedynczych genotypów, stanowiące 2% wszystkich amplikonów, uzyskano dla starterów ISSR 1 oraz ISSR 31.

Tabela 2. Charakterystyka starterów ISSR wykorzystanych w badaniu polimorfizmu izolatów *P. coronata* f. sp. *avenae* izolowanych z liści odmiany ‘Kasztan’

Lp.	Starter	Sekwencja 5'–3'	Liczba fragmentów				
			całkowita	polimorficznych dla <i>P. coronata</i>	monomorficznych dla <i>P. coronata</i>	specyficznych dla <i>P. coronata</i>	specyficznych dla odmiany 'Kasztan'
1.	ISSR1	(AG) ₈ G	11	1	1	1	8
2.	ISSR14	(GA) ₇ YG	16	4	1	0	11
3.	ISSR16	(GA) ₈ C	16	3	3	0	10
4.	ISSR17	(GA) ₈ YC	15	1	2	0	12
5.	ISSR31	(AG) ₈ YC	17	1	1	1	14
6.	ISSR33	(AG) ₈ T	19	3	0	0	16
Suma			94	13	8	2	71
Średnia			15,67	2,16	1,33	0,33	11,83
%			100	13,9	8,6	2,15	76,3%

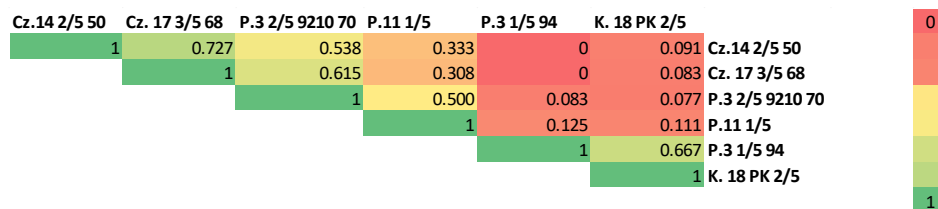
Największą liczbę fragmentów polimorficznych uzyskano dla izolatu P. 3 2/5 9210, dla tego izolatu uzyskano również najwięcej amplikonów pochodzących z *P. coronata* f. sp. *avenae* (tab. 3). Analiza produktów uzyskanych dla poszczególnych izolatów wykazała, że liczba amplikonów wynosiła od 80 (P.3 1/5 94) do 89 (P.3 2/5 9210 70) – tabela 3. Suma amplikonów monomorficznych dla *P. coronata* wynosiła 8. Najwięcej produktów polimorficznych (11) uzyskano w analizie w oparciu o DNA izolatu P.3 2/5 9210 pochodzącego z Polanowic, natomiast najmniej (2) dla izolatu P.3 1/5 94 również

pozyskanego w tej lokalizacji. Prążki specyficzne dla pojedynczych izolatów *P. coronata* zaobserwowano tylko dla izolatów Cz.14 2/5 50 oraz Cz.17 3/5 68 zebranych w Czesławicach w woj. lubelskim.

Tabela 3. Charakterystyka polimorfizmu ISSR izolatów *Puccinia coronata* f. sp. *avenae* izolowanych z liści odmiany 'Kasztan'

Lp.	Izolat	Suma amplikonów					
		wszystkich	pocho- dzą- cych z odmiany 'Kasztan'	monomor- ficznych dla <i>P. coronata</i>	polimorficz- nych dla <i>P. coronata</i>	specyficz- nych dla <i>P. coronata</i>	wszystkich z <i>P. coronata</i>
1.	Cz.14 2/5 50	87	70	8	8	1	17
2.	Cz.17 3/5 68	88	70	8	9	1	18
3.	P.3 2/5 9210	89	70	8	11	0	19
4.	P.11 1/5	85	70	8	7	0	15
5.	P.3 1/5 94	80	70	8	2	0	10
6.	Kijany 18 PK 2/5	81	70	8	3	0	11

Na podstawie polimorfizmu zidentyfikowanego dla badanych genotypów określono podobieństwo genetyczne oparte o współczynnik Jaccarda [Jaccard 1908]. Średnia wartość podobieństwa wynosiła 0,284 i wahała się od 0 pomiędzy izolatem P.3 1/5 94 a Cz.14 2/5 50 oraz Cz.17 3/5 68 do 0,727 pomiędzy izolatami Cz.14 2/5 50 i Cz.17 3/5 68 (ryc. 1).

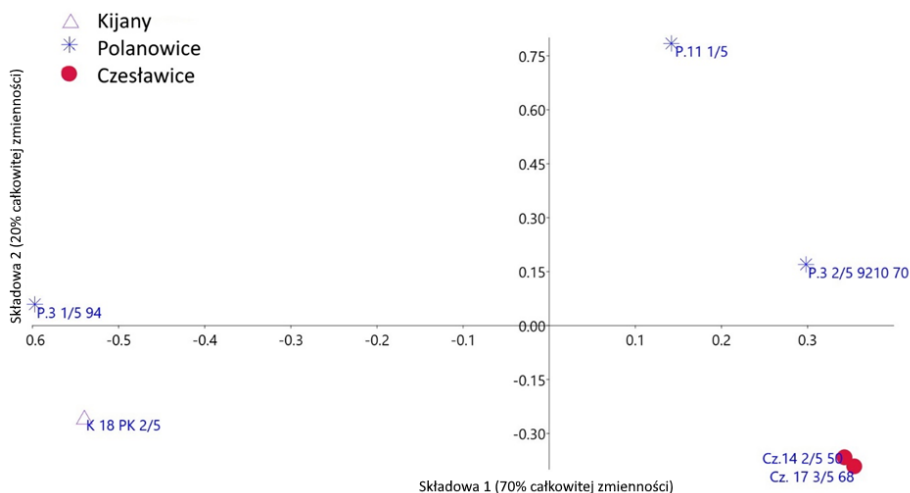


Ryc. 1. Wartości podobieństwa genetycznego Jaccarda uzyskane na podstawie polimorfizmu produktów ISSR dla izolatów *Puccinia coronata* f. sp. *avenae*

W oparciu o podobieństwo genetyczne Jaccarda przeprowadzono analizę składowych głównych (PCoA), ryc. 2. Dwie pierwsze składowe tłumaczą 90% całkowitej zmienności. Wykres zgodnie z matrycą obrazuje duże podobieństwo pomiędzy izolatami pochodzącymi z Czesławic. Na jego podstawie można również stwierdzić, że izolat K.18 PK 2/5 jest najbardziej podobny genetycznie do P.3 1/5 94.

Analiza metodą ISSR jest wysoce efektywna w identyfikacji zróżnicowania genetycznego w obrębie *P. coronata* f. sp. *avenae* i umożliwia jego ocenę w obrębie badanego

gatunku. Udział amplifikowanych produktów polimorficznych wyniósł 13,9%. Zidentyfikowano 8,6% produktów monomorficznych, które mogą stanowić podstawę do opracowania potencjalnych sekwencji specyficznych, możliwych do wykorzystania w identyfikacji patogenu, jakim jest *Puccinia coronata* f. sp. *avenae*.



Ryc. 2. Analiza PCoA badanych izolatów *Puccinia coronata* f. sp. *avenae* w oparciu o polimorfizm identyfikowany z wykorzystaniem ISSR

Identyfikująca polimorfizm w obrębie sekwencji międzymikrosatelitarnych metoda ISSR obejmuje użycie jednego startera komplementarnego do docelowego regionu mikrosatelitarnego w reakcji PCR [Ziętkiewicz i in. 1994]. Podstawowe cechy sekwencji satelitarnych i międzymikrosatelitarnych to hiperzmienność i losowe rozmieszczenie w całym genomie. Ewolucyjne tempo zmian w regionach mikrosatelitarnych jest znacznie wyższe niż w innych regionach i to właśnie hiperzmienność markerów ISSR umożliwia wykrycie wyższego poziomu polimorfizmu w porównaniu z innymi markerami molekularnymi. W porównaniu z innymi technikami molekularnymi, takimi jak SSR (ang. *simple sequence repeats* – powtórzenia sekwencji mikrosatelitarnych), AFLP (ang. *amplified fragments length polymorphisms* – polimorfizm długości amplifikowanych fragmentów) czy RAPD (ang. *random amplified polymorphic DNA* – losowo amplifikowany polimorficzny DNA), główne zalety techniki ISSR obejmują również prostotę wykonania, wysoką stabilność i powtarzalność oraz brak konieczności posiadania wcześniejszych informacji o sekwencji badanego gatunku. Technika ta została po raz pierwszy pokazana jako przydatna do oceny różnorodności genetycznej roślin i zwierząt, a następnie wykazano, że jest użyteczna w przypadku analizy różnorodności genetycznej grzybów patogenicznych dla roślin [Menzies i in. 2003, Hannachi i in. 2015]. Co więcej, markery ISSR mogą być dalej przekształcane w bardziej specyficzne markery SCAR (ang. *sequence characterized amplified region* – amplifikowane regiony o charakterystycznej se-

kwencji) [Kiran i in. 2010]. Specyficzne dla gatunku markery SCAR zostały z powodzeniem opracowane do identyfikacji fitopatogennych grzybów, takich jak *Bipolaris sorokiniana* [Aggarwal i in. 2011], *Tilletia controversa* [Gao i in. 2011] i *Fusarium mangiferae* [Wu i in. 2016].

Izolacja grzyba wraz z tkanką żywiciela – *A. sativa*, wpływa negatywnie na identyfikowany polimorfizm. Udział amplikonów pochodzących z tkanki roślinnej jest bardzo wysoki i wynosi 76,3%. Biorąc pod uwagę, że *P. coronata* jest obligatoryjnym biotrofem i nie można prowadzić hodowli tego grzyba na pożywkach, a jedynie na żywej tkance żywiciela, jedynym możliwym materiałem do izolacji DNA są zarodniki – urediniospory, produkowane ok. 10 dni po zakażeniu. Niestety zarodniki są otoczone trudną do zniszczenia ścianą, poza tym ich ilość jest stosunkowo niewielka. Potencjalną alternatywą była izolacja DNA grzyba wraz z tkanką żywiciela i odrzucanie produktów charakterystycznych tylko dla wrażliwej odmiany owsa. Porównując otrzymane wyniki do uzyskanych w oparciu o DNA izolowane z grzyba [Gorczyca i in. 2021], można zauważyć bardzo duży spadek ilości uzyskiwanych amplikonów pochodzenia grzybowego.

Przedstawiony w pracy sposób izolacji wraz z tkanką żywiciela może być stosowany w przypadku izolatów, które produkują małą ilość urediniospor, jednak w pozostałych przypadkach preferowana jest metoda izolacji DNA bezpośrednio z zarodników.

Bibliografia

- Aggarwal R., Gupta S., Banerjee S., Singh V.B., 2011. Development of a SCAR marker for detection of *Bipolaris sorokiniana* causing spot blotch of wheat. *Canadian J. Microbiol.* 57, 934–942.
- Chawade A., Lindén P., Bräutigam M., Jonsson R., Jonsson A., Moritz T., Olsson O., 2012. Development of a model system to identify differences in spring and winter oat. *PLoS ONE*, 7(1), e29792.
- Food and Agriculture Organization (FAO), 2022. FAOSTAT Statistical Database, Rome: FAO, Statistics division; www.fao.org [dostęp: 20.03.2022].
- Frey L., Rutkowski L., 2002. Wykaz gatunków (supl. 3). W: *Polska księga traw*, L. Frey (red.). Kraków, Instytut Botaniki im. W. Szafera, 87–95.
- Gao L., Chen W.Q., Liu T.G., 2011. An ISSR-based approach for the molecular detection and diagnosis of dwarf bunt of wheat, caused by *Tilletia controversa* KÜHN. *J. Phytopathol.* 159, 155–158.
- Główny Urząd Statystyczny (GUS), 2020. Wiosenna ocena stanu upraw rolnych i ogrodnictwa w 2020 r. Informacje Sygnalne.
- Gorczyca A., Toporowska J., Krawczyk A., Sadurski J., Sowa S., Paczos-Grzęda E., 2021. Assessment of the possibility of using ISSR method to analysis the intraspecific diversity of *Puccinia graminis* f. sp. *avenae*. W: *Wybrane zagadnienia z zakresu rolnictwa*, M. Babicz, B. Nowakowicz-Dębek (red.). Uniwersytet Przyrodniczy w Lublinie, 56–64.
- Goździcka-Józefiak A., Woźny A., Przybył K., Durzyńska J., 2009. Podstawy biologii komórki (bakterie, archeony, rośliny i grzyby). Wirusy. Wydawnictwo Naukowe UAM, Poznań.
- Hammer Ø., Harper D.A.T., Ryan P.D., 2001. PAST: Paleontological Statistics Software Package for education and data analysis. *Palaeontol. Electron.* 4(4), 1–9.
- Hannachi I., Poli A., Rezgui S., Prasad R.D., Cherif M., 2015. Genetic and phenotypic differences of *Fusarium oxysporum* f. sp. *citri* isolated from sweet orange and tangerine. *Eur. J. Plant Pathol.* 142, 269–280.
- Jaccard P., 1908. Nouvelles recherches sur la distribution florale. *Bull. Soc. Vaud. Sci. Nat.* 44, 223–270.

- Jackson E.W., Obert D.E., Chong J., Avant J. B., Bonman J.M., 2008. Detached-leaf method for propagating *Puccinia coronata* and assessing crown rust resistance in oat. *Plant Dis.* 92(10), 1400–1406.
- Kawka A., Achremowicz B., 2014. Owies – roślina XXI wieku. Wykorzystanie żywieniowe i przemysłowe. *Nauka Przyr. Technol.* 8, 3, 41.
- Kebede A., Friesen-Enns J., Gnanesh B.N., Menzies J.G., Mitchell Fetch J.W., Chong J., Beattie A.D., Paczos-Grzęda E., McCartney C., 2019. Mapping oat crown rust resistance gene *Pc45*. *G3 Gen. Genom. Genet.* 9(2), 505–511.
- Kiran U., Khan S., Mirza K.J., Ram M., Abdin M. Z., 2010. SCAR markers: a potential tool for authentication of herbal drugs. *Fitoterapia* 81(8), 969–976.
- Liu M., Hambleton S., 2013. Laying the foundation for a taxonomic review of *Puccinia coronata* s.l. in a phylogenetic context. *Mycol. Progress* 12, 63–89.
- Menzies J.G., Bakkeren G., Matheson F., Procnier J.D., Woods S., 2003. Use of inter-simple sequence repeats and amplified fragment length polymorphisms to analyze genetic relationships among small grain-infecting species of *Ustilago*. *Phytopathology*, 93, 167–175.
- Michta G., Gorczyca A., Toporowska J., Chalimoniuk J., Paczos-Grzęda E., Sowa S., 2021. Assessment of genetic diversity of *Puccinia coronata* f. sp. *avenae* by ISSR method. W: *Wybrane zagadnienia z zakresu rolnictwa*, M. Babicz, B. Nowakowicz-Dębek (red.). Uniwersytet Przyrodniczy w Lublinie, 77–86.
- Nazereno S.E., Li F., Smith M., Park R.F., Kinian S.F., Figureroa M., 2018. *Puccinia coronata* f. sp. *avenae*: a threat to global oat production. *Mol. Plant Pathol.* 19(5), 1047–1060.
- Paczos-Grzęda E., Sowa S., 2019. Virulence structure and diversity of *Puccinia coronata* f. sp. *avenae* P. Syd. & Syd in Poland during 2013–2015. *Plant Dis.* 103(7), 1559–1564.
- Wu J.B., Liu F., Zhan R.L., Li G.P., Zhao Y.L., Chang J.M., He Y.B., 2016. Development of a sensitive molecular detection assay for mango malformation disease caused by *Fusarium mangiferae*. *Biotechnol. Lett.* 38, 835–840.
- Ziętkiewicz E., Rafalski A., Labuda D., 1994. Genome fingerprinting by simple-sequence repeat (SSR)-anchored polymerase chain reaction amplification. *Genomics* 20, 176–183.

Iga Figura¹, Emilia Dunia¹, Martyna Bocek¹, Adrianna Koper¹, Joanna Toporowska²,
Edyta Paczos-Grzęda^{1,2}, Sylwia Sowa^{1,2}

Ocena możliwości identyfikacji polimorfizmu DNA za pomocą metody ISSR grzybów z gatunku *Blumeria graminis* f. sp. *avenae*

Assessment of the possibility of identifying DNA polymorphism of *Blumeria graminis*
f. sp. *avenae* using the ISSR method

Owies zwyczajny (*Avena sativa* L.) jest przedstawicielem rodzaju *Avena* należącego do rodziny traw (*Poaceae*), podrodziny wiechlinowatych (*Poaeoideae*) i plemienia owosowatych (*Aveneae*). Jest powszechnie uprawiany na całym świecie. Jak podaje Organizacja Narodów Zjednoczonych do spraw Wyżywienia i Rolnictwa, produkcja owsa w skali całego świata w roku 2020 wynosiła 25 181 805 ton, a w skali Europy – 15 054 296 ton [FAO 2020]. Polska należy do czołowych producentów tego zboża wśród państw europejskich. Według Głównego Urzędu Statystycznego w Polsce w roku 2021 oszacowano zbiory owsa na 1,7 mln ton [GUS 2021]. W ciągu ostatnich kilku lat w Polsce powierzchnia zasiewów owsa w strukturze zasiewów zbóż stanowiła 6,9–7,5%. Zdecydowanie większa część produkcji przeznaczona jest na paszę dla zwierząt, jednak ze względu na dużą wartość odżywczą i działanie prozdrowotne stale rośnie znaczenie owsa w żywieniu człowieka, przemyśle farmaceutycznym i kosmetycznym. Ze względu na mniejszą zawartość węglowodanów oraz rozpuszczalnych cukrów i dekstryn owies jest uważany za najzdrowsze zboże. Stanowi alternatywę dla osób chorych na celiakię, ponieważ nie zawiera glutenu. Dzięki wysokiej zawartości błonnika pokarmowego znacznie poprawia perystaltykę jelit, a także redukuje poziom cholesterolu we krwi ze względu na obecność β -glukanów [Gąsiorowski 1995]. Produkty owsiane są zaliczane do żywności funkcjonalnej dzięki dużej zawartości substancji odżywczych oraz niwelowaniu ryzyka chorób cywilizacyjnych, takich jak: cukrzyca typu 2, otyłość oraz choroby układu krążenia [Gibiński i in. 2005, Nazareno i in. 2018].

Owies na tle innych zbóż wykazuje mniejsze wymagania glebowe (dzięki lepiej rozwiniętemu systemowi korzeniowemu), tolerancję na niskie pH gleby, mniejsze wymagania przedplonowe. Sam jest ponadto dość dobrym przedplonem dla innych zbóż. Do cech charakterystycznych tego gatunku należy także mała odporność na suszę. Wymagania termiczne owsa są niewielkie. Ziarno zaczyna kiełkować już w temp. 3°C. Niezaskodliwe dla owsa są wiosenne przymrozki, a niska temperatura po wzejściu roślin jest korzystna dla uzyskania wysokich plonów. Korzenie owsa mają bardzo dużą zdolność

¹ Uniwersytet Przyrodniczy w Lublinie, Wydział Agrobiotechnologii, Studenckie Koło Naukowe Bioinżynierów i Biotechnologów BioGen, igafigura@gmail.com

² Uniwersytet Przyrodniczy w Lublinie, Wydział Agrobiotechnologii, Instytut Genetyki, Hodowli i Biotechnologii Roślin

pobierania składników pokarmowych znajdujących się w glebie w formie trudno dostępnej dla roślin. Pod tym względem owies przewyższa inne zboża, nawet żyto. Postrzegany jest jako odporny na wiele chorób oraz łatwy w uprawie. Mimo jego niewrażliwości dochodzi do znacznego obniżenia jakości i ilości plonów w wyniku porażenia patogenami. Ziarno owsa porażone przez choroby ma ograniczoną wartość siewną, paszową i konsumpcyjną [Danilewicz i in. 2016].

Za najważniejsze choroby w uprawie owsa uważa się: głównie pyłącą owsa, głównie zwartą owsa, zgorzel siewek, rdzę owsa (koronową, zwaną także wieńcową), rdzę żdźbłową zbóż i traw, mączniaka prawdziwego zbóż i traw, helmintosporiozę liści, fuzariozę kłosów i wiech oraz sporysz zbóż [Danilewicz i in. 2016]. Grzyby do swojego rozwoju potrzebują określonych warunków, tj. odpowiedniej wilgotności i temperatury. W przypadku niektórych ze sprawców chorób warunki te będą stanowiły o wielkości powodowanej infekcji oraz rodzaju wywoływanych strat ilościowych lub jakościowych. W naszym kraju nasilenie poszczególnych chorób zależy nie tylko od warunków pogodowych w trakcie wegetacji, ale również od zmieniającej się w czasie wirulencji populacji patogenów. Mączniak prawdziwy to wysoce inwazyjna choroba owsa występująca głównie w warunkach podwyższonej wilgotności i stosunkowo niskiej temperatury. Infekcja powoduje redukcję plonu od 10% do 39% w zależności od odmiany.

W klimacie charakteryzującym się zwiększoną wilgotnością i stosunkowo niską temperaturą to mączniak prawdziwy jest najgroźniejszą z chorób występujących w owsie. Wywoływany jest przez biotroficzny grzyb *Blumeria graminis* f. sp. *avenae* Em. Marchal należący do *Erysiphales* [Takamatsu 2004], który, rozmnażając się płciowo, wytwarza askospory, zaś bezpłciowo – konidia. Oba typy zarodników są w stanie porazić rośliny owsa na różnych etapach ich rozwoju. Zarodniki grzyba *B. graminis* kiełkują na zewnętrznej powierzchni liści owsa i pobierają z ich wewnętrznej warstwy składniki odżywcze [Harder i Haber 1992]. Występowanie choroby na blaszkach liściowych powoduje zmniejszenie powierzchni asymilacyjnej liści oraz gorsze wypełnienie wiech. Na grzybni na powierzchni rośliny powstają nowe konidiofory, struktury zawierające nowe zarodniki – konidia. Konidiofory te tworzą charakterystyczny mączysty biały nalot, który jest typowy dla mączniaka prawdziwego. Z czasem biały nalot szarzeje i widoczne są na nim ciemne owocniki – klejstotecja. W wyniku silnego porażenia liście mogą przedwcześnie zamierać.

Największym wyzwaniem dla izolacji DNA z grzybów jest przerwanie sztywnych, zbudowanych z chityny ścian komórkowych, ponieważ są one często odporne na tradycyjne procedury ekstrakcji DNA [Fredricks i in. 2005]. W izolacji genomowego DNA z grzybów wyróżnia się dwa główne etapy: przerwanie ściany komórkowej oraz ekstrakcję, po której następuje oczyszczanie genomowego DNA. Spośród kilku metod stosowanych do rozbijania ścian komórkowych jedną z najczęściej wykorzystywanych jest rozcieranie grzybni z użyciem ciekłego azotu [Lee i in. 1988]. Dodatkowe zgrubienia ścian komórkowych u zarodników grzybów i ich ogólna trudność w skolekcjonowaniu odpowiedniej ich ilości powoduje dodatkowe niedogodności w izolacji DNA.

Markery molekularne są narzędziem wykorzystywanym w biologii molekularnej do oceny zróżnicowania genetycznego. Mutacje punktowe, insercje lub delecje powodują zmiany w tandemowej sekwencji w obrębie regionów krótkich sekwencji powtarzalnych (SSR, ang. *short tandem repeats*) w DNA, co skutkuje powstawaniem polimorfizmów różnicujących poszczególne osobniki. Technika ISSR (ang. *inter simple sequence repeat*)

wykorzystuje reakcję łańcuchową polimerazy (PCR, ang. *polymerase chain reaction*) i polega na amplifikacji fragmentów DNA, które znajdują się pomiędzy dwoma regionami SSR zorientowanymi w przeciwnych kierunkach [Ziętkiewicz i in. 1994]. Otrzymane amplikony mają zwykle od 200 do 2000 bp długości. Detekcje uzyskanych wyników umożliwia elektroforeza w żelu zarówno agarozowym, jak i poliakrylamidowym. Metoda ISSR jest relatywnie prosta, szybka oraz odznacza się wysoką powtarzalnością. Wiarygodność metody wynika m.in. z powodu używania względnie długich starterów, które w konsekwencji pozwalają na zastosowanie wyższych temperatur hybrydyzacji. Startery w swojej sekwencji mają fragment komplementarny do sekwencji powtarzalnej oraz nukleotydy zakotwiczące na końcu 5' lub 3'. Zaletą metody jest brak konieczności dużej ilości materiału wyjściowego potrzebnego do przeprowadzenia analizy oraz znajomości jakichkolwiek sekwencji badanego gatunku. Uzyskiwane przy udziale tej metody markery mają charakter dominujący, a więc nie pozwalają na rozróżnienie alleli w obrębie jednego locus.

Markery ISSR są wykorzystywane z powodzeniem do oceny stopnia różnorodności genetycznej dużej liczby gatunków roślin uprawnych, w tym zbóż. W ich przypadku przewaga ISSR nad innymi technikami markerowymi została potwierdzona licznymi badaniami.

Na duże zróżnicowanie w obrębie formy specjalnej patogenu oprócz zmienności osobniczej ma wpływ również zmienność występująca w obrębie populacji, będąca konsekwencją presji selekcyjnej i doboru naturalnego, migracji, a także dryfu genetycznego [Kryczyński i Weber 2010]. Poniższa praca koncentruje się na ocenie przydatności markerów ISSR do badania zróżnicowania genetycznego w obrębie *B. graminis* f. sp. *avenae* w oparciu o DNA grzyba izolowane z liści odmiany owsa zwyczajnego 'Kasztan'.

Material i metody

Do badań wykorzystano sześć izolatów *B. graminis* f. sp. *avenae* pochodzących z trzech lokalizacji (tab. 1). Izolaty pochodzące z pojedynczego zarodnika wyodrębniono z zebranych populacji poprzez pięciokrotne pasażowanie. Pasażowanie prowadzono na fragmentach liści 10-dniowych siewek odmiany 'Kasztan' wyłożonych na szalki Petriego wypełnione agarem (0,6%) z dodatkiem benzimidazolu (3,4 mM) [Paczos-Grzęda i in. 2018]. Liście inokulowano zarodnikami z poszczególnych lokalizacji, a następnie umieszczano na 10 dni w fitotronie, w temp. 17°C przy kontrolowanym natężeniu światła (4 kLx) i wilgotności powietrza (70%).

Tabela 1. Charakterystyka izolatów *Blumeria graminis* f. sp. *avenae* wykorzystanych do analizy

Lp.	Nazwa	Poziom wyrównania	Lokalizacja	Kraj pochodzenia
1.	Aber C PM 6	izolat	Aberystwyth	Wielka Brytania
2.	Aber C szal. 5a	izolat	Aberystwyth	Wielka Brytania
3.	Cz.18/1 PK 1/6	izolat	Czesławice	Polska
4.	Cz. 18/2 PK 1/5	izolat	Czesławice	Polska
5.	K. 18 PK 1/6	izolat	Kopaszewo	Polska
6.	K. 18 PK 2/5	izolat	Kopaszewo	Polska

Izolację całkowitego DNA ze zdrowych oraz zainfekowanych liści odmiany ‘Kasztan’ przeprowadzono z wykorzystaniem komercyjnego zestawu Plant & Fungi DNA Purification Kit (EURx, Polska), stosując metodykę producenta. Izolacja zdrowych liści została przeprowadzona z wykorzystaniem buforu przeznaczonego zarówno dla roślin (Buf. P), jak i dla grzybów (Buf. F). Przed izolacją tkankę zhomogenizowano w ciekłym azocie. Uzyskany materiał przeniesiono do próbówki 2 ml typu Eppendorf i zawieszono w buforze Lyse F przeznaczonym do izolacji kwasów nukleinowych z grzybów. Do zawiesiny dodano 3 μ l RNase A i 10 μ l Proteinase K. Poddano działaniu worteksu i inkubowano przez 30 min w temp. 65°C. Dodano 130 μ l buforu AC, dokładnie wymieszano przez inwersję i inkubowano przez 5 min na lodzie. Wirowano przez 10 min z prędkością 15 000 \times g. Znad osadu zebrano 400 μ l supernatantu, przeniesiono do nowej próbówki, a następnie dodano 350 μ l buforu Sol P i 250 μ l 96% etanolu. Wymieszano przez inwersję oraz zwirowano przez 1 min z prędkością 14 000 \times g. Po zwirowaniu przeniesiono 600 μ l supernatantu do minikolumny znajdującej się w próbówce odbierającej. Poddano wirowaniu przez 1 min z prędkością 14 000 \times g. Dodano 500 μ l buforu płuczącego Wash PX i zwirowano. Płukanie powtórzono dwukrotnie. DNA wymyto z kolumny 120 μ l buforu Elution (10 mM Tris-HCl, pH 8,5) ogrzanego do temp. 80°C. Minikolumnę pozostawiono na 3 min w temperaturze pokojowej, a następnie poddano wirowaniu przez 1 min z prędkością 14 000 \times g w celu zwiększenia wydajności izolacji. Gotowe do dalszych analiz DNA zamrożono w temp. -20°C.

W celu oznaczenia jakości wyizolowanego DNA przeprowadzono rozdział elektroforetyczny w 1% żelu agarozowym. Do rozdziału wykorzystano zestaw do elektroforezy poziomej Agagel Maxi (Biometra). Rozdział przeprowadzono w buforze 1 \times TBE z 0,01% EtBr przez 1,5 godziny przy napięciu 120 V. Efekt rozdziału zwizualizowano w świetle UV i udokumentowano przy użyciu aparatu fotograficznego. Ocena stężenia wyizolowanego DNA została przeprowadzona przy użyciu spektrofotometru Nanodrop dla próby o objętości 1 μ l. Na podstawie uzyskanych wyników rozcieńczono wszystkie próbki do jednakowego stężenia 10 ng/ μ l. Uzyskano w ten sposób matrycę do reakcji PCR.

W celu amplifikacji regionów międzymikrosatelitarnych przeprowadzono reakcję PCR z użyciem czterech wyselekcjonowanych starterów ISSR. Reakcję prowadzono w objętości 10 μ l. W skład mieszaniny reakcyjnej wchodziły: 1 \times bufor do PCR [(NH₄)₂SO₄], 200 μ M dNTP, 5 pM startera SR, 1,5 mM MgCl₂, 20 ng DNA, 0,8 U Polymerase *Taq*. Zastosowano następujący profil termiczny: wstępna denaturacja przez 5 min w 94°C, 36 cykli: denaturacja 94°C – 30 s, przyłączanie starterów: 3 pierwsze cykle 54°C – 45 s, 3 kolejne cykle 53°C – 45 s i 30 cykli 52°C – 45 s, wydłużanie starterów 72°C – 1 min, z końcową inkubacją 7 min w 72°C. Produkty reakcji rozdzielano w 2,5% żelu agarozowym z 0,01% EtBr w buforze TBE (89 mM Tris-boran, 2,5 mM EDTA). Żele fotografowano, wykorzystując system dokumentacji żeli. Uzyskane zdjęcia analizowano, przekształcając uzyskane wyniki na matryce binarną. Obecność produktu ISSR oznaczano jako jeden, zaś jego brak jako zero. Uzyskaną matrycę poddano analizie przy użyciu programu komputerowego Office Excel 2016 (Microsoft, Redmond, USA).

Wyniki i dyskusja

W pracy wykorzystano odmienną od dotychczas stosowanych metodę izolacji. Standardowo DNA grzyba jest izolowane z zarodników. W tym przypadku materiał wyj-

ściowy do izolacji kwasów nukleinowych stanowiły zainfekowane *B. graminis* liście odmiany 'Kasztan' wrażliwej na porażenie mączniakiem prawdziwym. Jako metodę identyfikacji polimorfizmu zastosowano ISSR. Aby zidentyfikować amplikony pochodzące z owsa, dokonano izolacji DNA z liści odmiany 'Kasztan' niepoddanej infekcji *B. graminis*. Amplifikację przeprowadzono wstępnie z wykorzystaniem metody ISSR. Na podstawie przeprowadzonych rozdzielów elektroforetycznych wykonano analizę porównawczą wzorów produktów ISSR. W celu oceny możliwości wykorzystania metody ISSR do analizy polimorfizmu DNA *B. graminis* f. sp. *avenae* przeprowadzono wstępne reakcje z DNA 2 losowo wybranych izolatów, aby zidentyfikować spośród 12 testowanych starterów ISSR te, które inicjowały amplifikację największej liczby łatwo rozróżnialnych produktów. Wytypowano startery: ISSR1, ISSR14, ISSR16 i ISSR31 (tab. 2), które wykorzystano do reakcji ISSR, stosując jako matryce DNA sześć izolatów *B. graminis*.

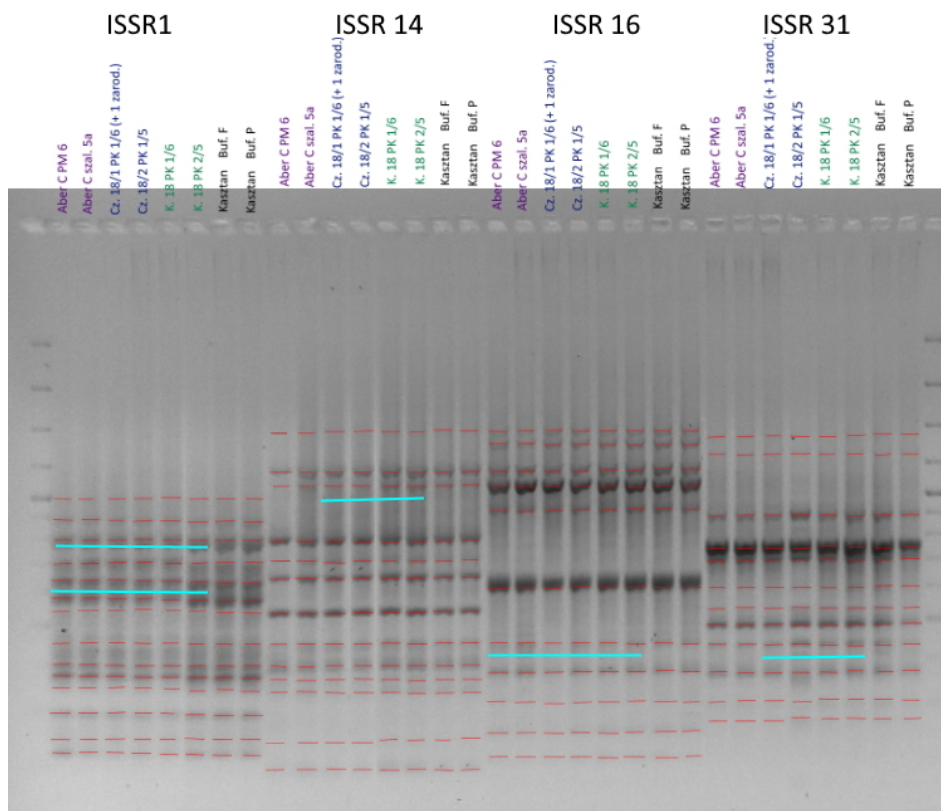
Tabela 2. Charakterystyka polimorfizmu ISSR izolatów *Blumeria graminis* f. sp. *avenae* izolowanych z liści odmiany 'Kasztan'

Lp.	Starter	Sekwencja 5'-3'	Liczba fragmentów				
			całkowita	polimorficznych dla <i>B. graminis</i>	monomorficznych dla <i>B. graminis</i>	specyficznych dla <i>B. graminis</i>	specyficznych dla odmiany 'Kasztan'
1.	ISSR1	(AG) ₈ G	16	0	2	0	14
2.	ISSR14	(GA) ₇ YG	14	1	0	0	13
3.	ISSR16	(GA) ₈ C	12	0	1	0	11
4.	ISSR31	(TG)10C	13	1	0	0	12
Suma			55	2	3	0	50
Średnia			13,75	0,5	0,75	0	12,75
%			100	3,65	5,45	0	90,9

Cztery startery ISSR zainicjowały amplifikację łącznie 55 typów amplikonów DNA, z których tylko 5 (9,1%) było polimorficznych (tab. 2, ryc. 1). Średnio na starter przypadało 14 amplikonów o wielkości od 220 do 1500 par zasad. Największą liczbę amplikonów (16) obserwowano w przypadku startera ISSR1, najmniej amplikonów (12) generował starter ISSR16. Liczba produktów specyficznych dla odmiany 'Kasztan', niezależnie od wykorzystanej metody izolacji, była wysoka – stwierdzono 50 takich produktów (90,9%). Z kolei dla *B. graminis* zaobserwowano pięć amplikonów, przy czym trzy były monomorficzne, a dwa wykazały polimorfizm pomiędzy badanymi izolatami mączniaka. Wykorzystane startery nie inicjowały amplifikacji żadnych produktów specyficznych dla pojedynczych izolatów *B. graminis*.

W oparciu o przeprowadzone analizy molekularne można stwierdzić, że sześć badanych izolatów *B. graminis* o zróżnicowanym pochodzeniu geograficznym wykazywało niski polimorfizm na poziomie ok. 3,6%. Uzyskane wyniki pokazały, że możliwa jest

identyfikacja fragmentów DNA pochodzących z *B. graminis*, jednak większość amplikonów ma pochodzenie roślinne. Trzy z pięciu wymienionych wyżej produktów polimorficznych w całej reakcji było monomorficznych dla badanego gatunku grzyba. Produkty te mogą zostać wykorzystane do opracowania markerów specyficznych, umożliwiających identyfikację obecności grzyba *B. graminis* w tkance żywiciela jeszcze przed wystąpieniem objawów choroby. Umożliwiłoby to zastosowanie odpowiednich środków ochrony roślin przed pojawieniem się symptomów infekcji. W oparciu o uzyskane wyniki można stwierdzić, że zaproponowana metoda izolacji nie powinna być stosowana do oceny polimorfizmu w obrębie *B. graminis*, ale jest przydatna do identyfikacji produktów DNA charakterystycznych dla badanego gatunku grzyba.



Ryc. 1. Zdjęcie rozdziálu elektroforetycznego ISSR dla DNA badanych izolatów *Blumeria graminis* f. sp. *avenae* oraz liści odmiany ‘Kasztan’ z wykorzystaniem czterech starterów (ISSR 1, ISSR 14, ISSR 16, ISSR 31). Niebieskim kolorem zaznaczono amplikony polimorficzne, czerwonym – amplikony monomorficzne

Zarówno wielkość, jak i jakość plonu stale są narażone na ryzyko niekorzystnego oddziaływania różnych czynników abiotycznych i biotycznych. Grzyb *B. graminis*, czynnik sprawczy mączniaka prawdziwego, znajduje się obecnie w pierwszej dziesiątce naj-

ważniejszych grzybowych patogenów roślin [Dean i in. 2012]. *Blumeria graminis* odpowiada za wysoki odsetek epidemii chorób liści występujących na pszenicy, jęczmieniu czy owsie. Aby zapobiec stratom plonów, stosuje się odmiany odporne, co stanowi skuteczną strategię ochrony upraw bez konieczności stosowania fungicydów. Jednak interakcja między gospodarzem a patogenem jest bardzo skomplikowanym i dynamicznym procesem. W ostatnich latach, ze względu na dużą presję selekcyjną wynikającą z braku kontroli nad zastosowaniem genów odporności i rozmieszczeniem upraw odmian odpornych, struktura populacji *B. graminis* uległa szybkim zmianom. Spowodowało to zmiany w genach awirulencji izolatów i doprowadziło do utraty efektywności genów *Pm* odpowiedzialnych za odporność na zakażenie mączniakiem prawdziwym zbóż i traw. Dotychczas niewiele badań przeprowadzono nad zróżnicowaniem genetycznym populacji *B. graminis*. Wiedza ta byłaby użyteczna w opracowywaniu strategii ochrony. Brak dokładnej wiedzy na ten temat utrudnia kontrolę chorób i wysiłki hodowli roślin na rzecz tworzenia odmian odpornych na choroby. Wykazano, że metoda ISSR jest przydatna do analizy różnorodności genetycznej wielu gatunków grzybów, w tym *Lentinula edodes*, *Agaricus*, *Fusarium poae* i *Blumeria graminis* f. sp. *tritici* [Guan i in. 2008, Jia i in. 2008, Dinolfo i in. 2010]. Zidentyfikowany polimorfizm umożliwia nie tylko ocenę zróżnicowania genetycznego czy struktury populacji patogenu, ale również identyfikację produktów specyficznych dla grzybów z rodzaju *Blumeria*, co w przyszłości pozwoli opracować markery specyficzne, umożliwiające identyfikację patogenu w zakażonych tkankach bez widocznych symptomów choroby.

Bibliografia

- Danilewicz J., Korbas M., Mrówczyński M., 2016. Metodyka integrowanej ochrony i produkcji owsa. Instytut Ochrony Roślin PIB, Poznań.
- Dean R., van Kan J.A.L., Pretorius Z.A., Hammond-Kosack K.E., di Pietro A., Spanu P.D., Rudd J.J., 2012. The top 10 fungal pathogens in molecular plant pathology. *Mol. Plant Pathol.* 2012, 13, 414–430.
- Dinolfo M.I., Stenglein S.A., Moreno M.V., Nicholson P., Jennings P., Salerno G.L., 2010. ISSR markers detect high genetic variation among *Fusarium poae* isolates from Argentina and England. *Eur. J. Plant Pathol.* 127, 483–491.
- FAO, 2020. Food and Agriculture Organization of the United Nations Statistics division, www.fao.org [dostęp: 5.03.2022].
- Fredricks D.N., Smith C., Meier A., 2005. Comparison of six DNA extraction methods for recovery of fungal DNA as assessed by quantitative PCR. *J. Clin. Microbiol.* 43, 5122–5128.
- Gąsiorowski H., 1995. Charakterystyka ogólna. W: Owies: chemia i technologia. Państwowe Wydawnictwo Rolnicze i Leśne, Poznań, 47–102.
- Gibiński M., Gumul D., Korus J., 2005. Prozdrowotne właściwości owsa i produktów owsianych. *Żywn. Nauk. Technol. Jakość* 4(45), 49–60.
- Główny Urząd Statystyczny (GUS), 2021. Wynikowy szacunek głównych ziemiopłodów rolnych i ogrodniczych w 2021 r.
- Guan X.J., Xu L., Shao Y.C., Wang Z.R., Chen F.S., Luo X.C., 2008. Differentiation of commercial strains of *Agaricus* species in China with inter-simple sequence repeat marker. *World J. Microbiol. Biotechnol.* 24, 1617–1622.
- Harder D.E., Haber S., 1992. Oat diseases and pathological techniques. W: Oat science and technology – Agronomy Monograph no. 33, H.G. Marshall, M.E. Sorrells (red.). Madison, 307–425.

- Jia S.F., Duan X.Y., Zhou Y.L., Lu G.D., Wang Z.H., 2008. Establishment of ISSR-PCR reaction system for *Blumeria graminis* f. sp. *tritici* and its application in diversity analysis of this pathogen. *Acta Phytopathyl. Sin.* 34, 493–499.
- Kryczyński S., Weber Z., 2010. *Fitopatologia t. 1, podstawy fitopatologii*. PWRiL, Poznań.
- Lee S.B., Milgroom, M.G., Taylor J.W., 1988. A rapid, high yield mini-prep method for isolation of total genomic DNA from fungi. *Fungal Genet. Rep.* 35, 11.
- Nazareno E.S., Li F., Smith M., Park R.F., Kianian S.F., Figueroa M., 2018. *Puccinia coronata* f. sp. *avenae*: a threat to global oat production. *Mol. Plant Pathol.* 19(5), 1047–1060.
- Paczos-Grzęda E., Sowa S., Koroluk A., Langdon T., 2018. Characteristics of resistance to *Puccinia coronata* f. sp. *avenae* in *Avena fatua*. *Plant Dis.* 102, 1–9.
- Takamatsu S., 2004. Phylogeny and evolution of the powdery mildew fungi (*Erysiphales*, *Ascomycota*) inferred from nuclear ribosomal DNA sequences. *Mycoscience* 45, 147–157.
- Ziętkiewicz E., Rafalski A., Labuda D., 1994. Genome fingerprinting by simple sequence repeat (SSR) – anchored polymerase chain reaction amplification. *Genomics* 20(2), 176–183.

Adrianna Koper¹, Martyna Bocek¹, Emilia Dunia¹, Iga Figura¹, Joanna Toporowska²,
Edyta Paczos-Grzęda^{1b2}, Sylwia Sowa^{1b2}

Wpływ sposobu pozyskiwania materiału genetycznego na ocenę zróżnicowania izolatów *Puccinia coronata* f. sp. *avenae* metodą ISSR

The influence of the method of obtaining genetic material on the evaluation
of the diversity of *Puccinia coronata* f. sp. *avenae* isolates by the ISSR

Patogen, jakim jest grzyb *Puccinia coronata* f. sp. *avenae* (*Pca*), należy do rodziny rdzowatych (*Pucciniaceae*) [Liu i Hambleton 2013]. Jest on obligatoryjnym biotroficznym podstawczakiem o naturze makrocyklicznej i heterogennej, wywołującym rdzę koronową owsa. Jego cykl rozwojowy składa się z pięciu stadiów zakaźnych podzielonych na fazy bezpłciową – występującą w owsie (*Avena* L.), oraz płciową – ujawniającą się w roślinach szakłaka (*Rhannus* ssp.) [Staples i Macko 1984]. Przejście fazy płciowej dotyczy zarówno owsa, jak i żywiciela alternatywnego, czyli roślin szakłaka. Pod koniec sezonu wegetacyjnego, gdy roślina zaczyna się starzeć, w miejscach infekcji *Pca* pojawiają się dikariotyczne, grubościenne, przetrwalnikowe teliospory, które wiosną kiełkują i ulegają mejozie, wytwarzając haploidalne podstawki, które następnie infekują rosnące liście szakłaka [Mendgen 1984]. Przejście fazy płciowej jest podstawą zmienności genetycznej w populacji grzyba. Fazę bezpłciową charakteryzuje powstawanie i kiełkowanie urediniospor na powierzchni liści owsa, co wywołuje szereg zmian w morfologii i fizjologii rośliny. W jamie przyszparkowej liścia produkowane są strzępki infekcyjne, których końce wydłużają się, tworząc haustoria konieczne do pobierania składników odżywczych. W wyniku dalszej kolonizacji i penetracji grzyba na liściu po około tygodniu powstają kolonie – sporulujące uredinia w postaci charakterystycznych jaskrawych, pomarańczowo-żółtych podłużnych skupisk zarodników. Uredinia mają różną wielkość i mogą osiągać długość ponad 5 mm. Infekcja występuje przede wszystkim na powierzchni liści, chociaż sporadycznie objawy rozwijają się na pochwach liściowych owsa lub na strukturach kwiatowych, takich jak kłoski. U odpornych odmian owsa objawy są zróżnicowane – od plamek po małe skupienia urediniospor, którym zwykle towarzyszą chlorotyczne aureole i/lub nekrozy [Nazarino i in. 2018]. Urediniospory z łatwością są przenoszone przez wiatr na odległe obszary, zakażając kolejne uprawy owsa [Paczos-Grzęda i Sowa 2019]. Zakażenie rdzą koronową oddziałuje na roślinę w wielu aspektach, m.in. negatywnie wpływa na proces fotosyntezy, zmniejsza plon oraz masę ziarna [Scholes i Rolfe 1996].

¹ Uniwersytet Przyrodniczy w Lublinie, Wydział Agrobiotechnologii, Studenckie Koło Naukowe Bioinżynierów i Biotechnologów BioGen, adriannakoper02@gmail.com

² Uniwersytet Przyrodniczy w Lublinie, Wydział Agrobiotechnologii, Instytut Genetyki, Hodowli i Biotechnologii Roślin

Na rozwój *P. coronata* f. sp. *avenae* znacząco wpływają stan fizjologiczny rośliny oraz kondycja jej układu odpornościowego. Osłabienie tego układu wiąże się z brakiem aktywacji odpowiedzi immunologicznej względem patogenów grzybowych, w tym *Pca*. Pierwszą linią obrony roślin jest rozpoznanie charakterystycznych składników grzyba, mimo to patogeny są zdolne do wydzielania białek efektorowych inaktywujących podstawowe mechanizmy obrony roślin. W odpowiedzi rośliny wytworzyły drugą linię obrony, czyli mechanizmy wykrywania danych efektorów [Dangl i in. 2013].

W związku z tym, że owies jest uprawiany na szeroką skalę, zakażenie rdzą koronową generuje poważne straty ekonomiczne, które są szacowane na ok. 10–40% [Paczos-Grzęda i Sowa 2019]. Według Głównego Urzędu Statystycznego w Polsce w roku 2021 uprawy owsa zajmowały ok. 0,5 mln ha, co dało plony rzędu 1,7 mln ton [GUS 2021] i uplasowało Polskę na piątym miejscu światowego rankingu produkcji tego zboża. Owies jako roślina uprawna jest przeznaczony głównie na paszę dla zwierząt, a pod względem spożycia przez ludzi *A. sativa* zajmuje czwarte miejsce wśród zbóż, zaraz po pszenicy, ryżu i kukurydzy. Pełnoziarniste produkty owsiane są zazwyczaj atrakcyjne dla konsumentów ze względu na ich pozytywny wpływ na poziom cholesterolu we krwi z uwagi na obecność β -glukanów, brak konserwantów oraz wysoką zawartość składników odżywczych i błonnika [van den Broeck i in. 2016]. Redukują ryzyko chorób cywilizacyjnych, takich jak: cukrzyca typu 2, otyłość oraz choroby układu krążenia, a w związku z wysoką zawartością błonnika pokarmowego znacznie poprawiają perystaltykę jelit [Gibiński i in. 2005]. Dodatkowo owies stanowi atrakcyjną alternatywę dla osób chorujących na celiakię, gdyż nie zawiera glutenu i może być z powodzeniem stosowany w produktach bezglutenowych. W związku z powyższym prowadzenie badań nad biologią patogenu, jakim jest *P. coronata* f. sp. *avenae*, jest istotne z punktu widzenia rynku i przemysłu zbożowego.

Ocenę polimorfizmu umożliwiają liczne metody molekularne, w tym technika ISSR (ang. *inter simple sequence repeat*). Wykorzystywana jest ona w badaniach nad różnorodnością genetyczną i mapowaniem genów roślin i grzybów, równocześnie charakteryzuje się prostotą i nie generuje wysokich kosztów [Ziętkiewicz i in. 1994]. Technika ISSR polega na amplifikacji fragmentów DNA, które znajdują się między dwoma identycznymi regionami powtórzeń mikrosatelitarnych. W reakcji łańcuchowej polimerazy (PCR, ang. *polymerase chain reaction*) wykorzystuje się jako startery krótkie odcinki – mikrosatelity, które są ukierunkowane na wiele loci genomowych w celu amplifikacji sekwencji pomiędzy SSR (ang. *simple sequence repeats*) o różnych rozmiarach [Wang i in. 2017]. Produkt PCR jest wizualizowany w żelu agarozowym lub poliakrylamidowym, co ułatwia analizę prowadzonych badań. Dużym ułatwieniem jest również brak konieczności znajomości sekwencji genów badanego gatunku, niezbędna jest tylko obecność odpowiednio zlokalizowanych sekwencji mikrosatelitarnych.

Ważną częścią badań, sprawiającą duże trudności, jest etap izolacji DNA niezbędny do dalszych analiz. Izolacja przeprowadzana z grubościennej, twardej urediniospor jest czasochłonna, a ilość uzyskanego materiału genetycznego nie jest satysfakcjonująca. Dodatkowo proces zbierania zarodników jest uciążliwy i mało wydajny. Istnieje również ryzyko wzajemnej kontaminacji poszczególnych próbek.

Badania podjęte w niniejszej pracy miały wykazać, czy do oceny zróżnicowania genetycznego za pomocą techniki ISSR izolatów *P. coronata* można wykorzystać dwie odmienne metody izolacji DNA – bezpośrednio z urediniospor bądź z zakażonych liści, na których znajdują się dojrzałe uredinia z urediniosporami.

Materiały i metody

Materiał do badań stanowiły trzy izolaty *P. coronata* f. sp. *avenae* (*Pca*) zebrane w Kanadzie: 230, 241 i 257, a udostępnione przez Morden Research and Development Centre, AAFC w Kanadzie.

Fragmenty 10-dniowych siewek odmiany 'Kasztan' wyłożono na szalki Petriego z 0,6% agarem i dodatkiem benzimidazolu (3,4 mM) i poddano je inokulacji zarodnikami izolatów 230, 241 i 257. Siewki umieszczono na 10 dni w fitotronie w temp. 17°C przy kontrolowanym natężeniu światła (4 kLx) i wilgotności powietrza (70%). Po zakończonej inkubacji powstałe urediniospory zebrano z powierzchni zakażonych liści w ilości 0,1 mg i poddano homogenizacji za pomocą tłuczka i moździerza w ciekłym azocie, aby zniszczyć grubą i twardą ścianę zarodników oraz ułatwić izolację materiału genetycznego. Uzyskany materiał przeniesiono do próbówki 2 ml typu Eppendorf i przeprowadzono właściwą izolację całkowitego DNA zarodników za pomocą komercyjnego zestawu Plant & Fungi DNA Purification Kit (EURx, Polska), stosując się do instrukcji producenta. Po zakończonej procedurze uzyskany roztwór DNA z buforem elucyjnym zamrożono w temp. -20°C. Dodatkowo oprócz izolacji DNA z samych urediniospor pozyskano materiał genetyczny z porażonych siewek owsa zwyczajnego odmiany 'Kasztan' poprzez identyczną procedurę jak dla samych urediniospor, z zastosowaniem komercyjnego zestawu Plant & Fungi DNA Purification Kit zgodnie z zaleceniami producenta. W ramach próby kontrolnej wyizolowano również DNA z nieporażonych siewek odmiany 'Kasztan', stosując bufor Lyse F dla grzybów oraz Lyse P dla roślin.

Jakość wyizolowanego DNA sprawdzono poprzez rozdział elektroforetyczny w 1% żelu agarozowym z wykorzystaniem zestawu Agagel Maxi (Biometra) w buforze 1 × TBE przez 30 min przy napięciu 120 V. Stężenie oceniono spektrofotometrycznie za pomocą Nanodrop dla próby o objętości 1 µL i na podstawie wyników wykonano rozcieńczenia wszystkich próbek DNA do stężenia 10 ng/µL.

Tak przygotowany materiał genetyczny poddano reakcji PCR z wykorzystaniem techniki ISSR przez zastosowanie 80 starterów ISSR, a produkty reakcji rozdzielono w żelu agarozowym. Na podstawie analizy wyników rozdziału elektroforetycznego wyselekcjonowano sześć starterów, które wykorzystano do dalszych badań (tab.1).

Reakcje PCR prowadzono w objętości 10 µl. W skład mieszaniny reakcyjnej wchodziły: 1 × bufor do PCR (75 mM Tris-HCl, pH 8,8; 20 mM (NH₄)₂SO₄, 0,01% Tween 20) – Thermo Fischer Scientific; 200 µM każdego dNTP; 5 pM startera; 1,5 mM MgCl₂; 20 ng genomowego DNA; 1 U Dream Taq Polymerase (Thermo Fischer Scientific). Profil termiczny reakcji obejmował wstępną denaturację przez 5 min w temp. 94°C, 36 cykli: denaturacji 94°C przez 30 s, przyłączanie starterów: 3 pierwsze cykle 54°C – 45 s, 3 kolejne cykle 53°C – 45 s i 30 cykli 52°C – 45 s, wydłużanie starterów 72°C – 1 min, z końcową inkubacją 7 min w 72°C. Uzyskane produkty reakcji PCR zostały rozdzielone w 2,5% żelu agarozowym z 0,01% EtBr w buforze TBE (89 mM Tris-boran, 2,5 mM EDTA). W celu analizy wyników elektroforezy wykonano fotografię żelu z wykorzystaniem systemu dokumentacji żeli, a uzyskane wyniki przekształcono na matrycę binarną, w której obecność produktu ISSR oznaczano jako jeden, zaś jego brak jako zero. Używaną matrycę analizowano statystycznie za pomocą programu XLSTAT [2019] (Addin-

soft Inc., Brooklyn, NY, USA) oraz PAST 3.19 [Hammer i in. 2001]. Oceniono podobieństwo genetyczne obiektów badawczych, stosując współczynnik Jaccarda [Jaccard 1908]. Na tej podstawie skonstruowano dendrogram podobieństwa metodą UPGMA (ang. *Unweighted Pair-Group Method with Arithmetic mean*).

Wyniki i dyskusja

Na podstawie otrzymanych elektroforegramów przeprowadzono analizę porównawczą wzorów amplifikacji. Wytypowane startery ISSR 1, ISSR 14, ISSR 16, ISSR 31, ISSR 34 i ISSR 35 (tab. 1) wykorzystano do reakcji ISSR-PCR, stosując matrycę DNA trzech różnych izolatów, gdzie izolowany materiał genetyczny pochodził z samych zarodników oraz z zainfekowanych liści odmiany 'Kasztan'. Dodatkowo przeprowadzono dwie próby kontrolne stanowiące DNA odmiany 'Kasztan' wyizolowane za pomocą dwóch różnych buforów – dla roślin lub grzybów.

Najbardziej wartościowe wyniki uzyskano, stosując starter ISSR 14; przy jego udziale powstawało najwięcej rodzajów produktów – 34, przy czym aż 22 pochodziły z *P. coronata*, a tylko 12 z odmiany 'Kasztan' (tab. 2). Podobnie dobre wyniki amplifikacji obserwowano dla startera SR 16, w którego przypadku 18 spośród 29 produktów powstawało na matrycy DNA grzyba. W przypadku ISSR 14 uzyskano największy udział prążków polimorficznych dla badanego patogenu – 44%, zaś dla startera ISSR 16 prążki polimorficzne dla *P. coronata* stanowiły 31%. Dla pozostałych starterów ilość prążków monomorficznych i polimorficznych pochodzących z patogenu wahała się od 13% do 52%.

Tabela 1. Charakterystyka polimorfizmu zidentyfikowanego metodą ISSR w obrębie badanego materiału

Lp.	Starter	Sekwencja 5'–3'	Liczba fragmentów				
			całkowita	polimorficznych dla <i>P. coronata</i>	monomorficznych dla <i>P. coronata</i>	specyficznych dla <i>P. coronata</i>	pochodzących z odmiany 'Kasztan'
1.	ISSR1	(AG) ₈ G	27	3	10	1	13
2.	ISSR14	(GA) ₇ YG	34	15	5	2	12
3.	ISSR16	(GA) ₈ C	29	9	5	4	11
4.	ISSR31	(AG) ₈ YC	31	5	11	0	15
5.	ISSR34	(TC) ₈ CC	24	4	5	0	15
6.	ISSR35	(TC) ₈ CG	8	1	0	0	7
Suma			153	37	36	7	73
Średnia			25,5	6,17	6,00	1,17	12,17
%			100	24,18	23,53	4,57	47,71

Należy także zwrócić uwagę na prążki pojawiające się w dwóch sytuacjach: 1) jedynie w przypadku DNA badanych izolatów izolowanych z zarodników oraz 2) specyficznie dla wszystkich izolatów bez obecności prążka w próbie kontrolnej, którą stano-

wiła odmiana ‘Kasztan’. Ten drugi rodzaj produktów PCR świadczy o możliwości wykorzystania izolacji zarodników z liści bez konieczności izolacji bezpośrednio z uredniospor. Produktów tych było niewiele, ale są one szczególnie interesujące z uwagi na możliwość ich uzyskania na matrycy DNA grzyba wyizolowanego z zakażonej rdzą koronową tkanki roślinnej. Takie amplikony w ilości 1, 2 i 4 pojawiały się w obecności starterów odpowiednio: ISSR 1, ISSR 14 oraz ISSR 16.

Biorąc pod uwagę każdy izolat osobno (tab. 2), można zauważyć, że największą liczbę amplikonów uzyskano dla izolatu 257, którego DNA ekstrahowano z zarodników. Odnaczał się on również największym udziałem polimorficznych i monomorficznych fragmentów dla grzyba. Ten sam izolat – 257, pochodzący z grzybni i zarodników, wyekstrahowany z liści zainfekowanej odmiany owsa ‘Kasztan’, także wyróżniał się największą liczbą fragmentów monomorficznych. Co ciekawe, dla każdej z 8 zastosowanych matryc DNA uzyskano porównywalną liczbę amplikonów, od 73 do 86. Izolacja DNA próby kontrolnej z liści odmiany ‘Kasztan’ dwoma różnymi buforami nie wpłynęła znacząco na wynik końcowy.

Tabela 2. Analiza polimorfizmu fragmentów ISSR z uwzględnieniem pojedynczych izolatów

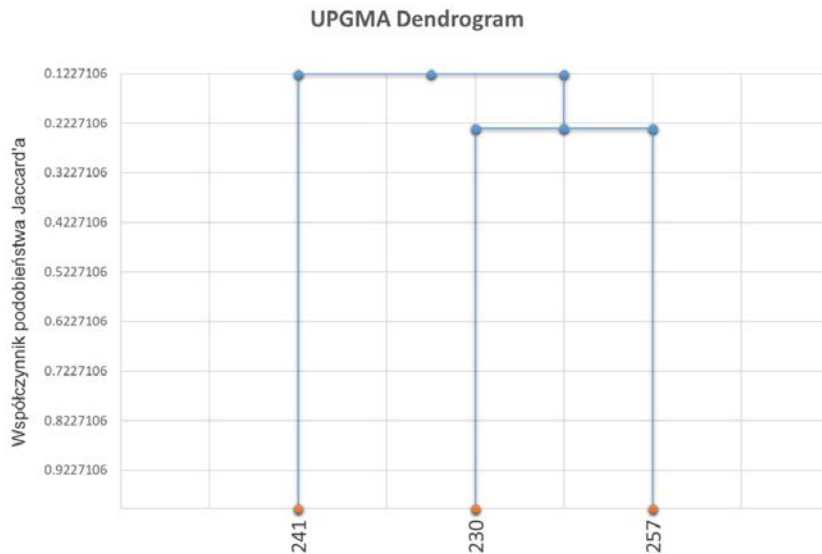
Liczba fragmentów	Nazwa izolatu							
	230 z liści	230 z zarodników	241 z liści	241 z zarodników	257 z liści	257 z zarodników	‘Kasztan’ z buforem F	‘Kasztan’ z buforem P
Pochodzących z odmiany ‘Kasztan’	68	22	68	19	69	24	73	74
Pochodzących z grzyba	8	59	7	59	11	62	0	0
Polimorficznych dla grzyba	1	17	0	16	0	19	0	0
Monomorficznych dla grzyba	0	35	0	36	4	36	0	0
Specyficznych	7	7	7	7	7	7	0	0
Całkowita	76	81	75	78	80	86	73	74

Na podstawie polimorfizmu zidentyfikowanego dla trzech genotypów *P. coronata* izolowanych bezpośrednio z zarodników określono podobieństwo genetyczne, stosując współczynnik Jaccarda [Jaccard 1908]. Średnia wartość podobieństwa wynosiła 0,160 (tab. 3). Posługując się powyższymi danymi, skonstruowano dendrogram z wykorzystaniem metody średnich połączeń (PGMA, ang. *unweighted pair group method with arithmetic mean*) – rycina 1. Izolaty 230 i 257, z uwagi na najwyższą wartość

podobieństwa genetycznego wynoszącą 0,233, utworzyły na dendrogramie klaster. Niskie wartości współczynników podobieństwa genetycznego wskazują na wysokie zróżnicowanie izolatów.

Tabela 3. Matryca indeksów podobieństwa genetycznego Jaccarda pomiędzy analizowanymi izolatami *Puccinia coronata* f. sp. *avenae* określonych na podstawie polimorfizmu identyfikowanego metodą ISSR-PCR

Izolat	230	241
241	0,103	
257	0,233	0,143



Ryc. 1. Dendrogram badanych izolatów *P. coronata* uzyskany metodą UPGMA w oparciu o polimorfizm identyfikowany za pomocą metody ISSR-PCR

Sposób izolacji DNA wywiera istotny wpływ na ocenę zróżnicowania genetycznego grzyba *P. coronata* f. sp. *avenae*. Analiza polimorfizmu metodą ISSR-PCR wykazała istnienie znaczących różnic, jak również wyraźnych podobieństw pomiędzy dwoma różnymi sposobami pozyskiwania materiału. Można wywnioskować, że DNA owsa zwyczajnego – w tym przypadku odmiany ‘Kasztan’ – jest w większości przypadków konkurencyjne dla DNA grzyba i hamuje amplifikację pochodzących z niego fragmentów. Mimo to dla starterów ISSR 14 i ISSR 16 udało się uzyskać kilka fragmentów, które wskazują, że ocena polimorfizmu jest możliwa, niemniej jednak procentowy udział fragmentów polimorficznych dla grzyba amplifikowanych w obecności DNA roślinnego nie wystarcza. DNA pochodzące z zarodników jest więc lepszą matrycą w reakcji PCR, co skutkuje znacznie większą liczbą fragmentów polimorficznych. Przeprowadzone w ramach niniejszej pracy badanie wykazało, że metoda izolacji DNA grzyba z porażonej

tkanki rośliny nie jest alternatywą w stosunku do izolacji prowadzonej bezpośrednio z zarodników. Niemniej jednak zidentyfikowane w niniejszej pracy produkty pochodzenia grzybowego, ulegające amplifikacji w przypadku zastosowania jako matrycy DNA izolowanego zarówno z zarodników, jak i z porażonej tkanki roślinnej, mogą po sklonowaniu i zsekwencjonowaniu zostać wykorzystane do opracowania starterów pozwalających na amplifikację specyficznych regionów genomu *P. coronata*. Uzyskane w ten sposób markery dla *P. coronata* mogłyby być wykorzystywane do stwierdzania infekcji grzybem tuż po zakażeniu, kiedy symptomy choroby nie są jeszcze widoczne.

Do wczesnego wykrywania patogenicznych grzybów w zakażonych tkankach gospodarza z powodzeniem stosowano metody molekularne, zwłaszcza PCR [McCartney i in. 2003, Menzies i in. 2003]. W diagnostyce patogenów opartej na PCR startery są zaprojektowane tak, aby łączyć się komplementarnie z unikalnymi regionami DNA z organizmów patogennych w celu amplifikacji i wykrywania specyficznych gatunkowo lub rodzajowo DNA różnych mikroorganizmów. Specyficzna amplifikacja docelowych sekwencji kwasu nukleinowego jest stosowana do wykrywania i identyfikacji patogenów roślinnych. W porównaniu z tradycyjnymi metodami diagnostycznymi metody oparte na PCR mają wiele zalet, ponieważ są szybsze, niezawodne i specyficzne [Martinelli i in. 2015]. Opisano m.in. metodę szybkiego diagnozowania i wykrywania infekcji *Puccinia striiformis* f. sp. *tritici* u pszenicy opartą na PCR [Barnes i Szabo 2007]. Wszystkie metody wykorzystujące PCR do wykrywania patogenów są oparte na precyzyjnym określeniu obecności specyficznych sekwencji docelowych i zaprojektowaniu wysoce wybiórczych starterów do reakcji amplifikacji. Do selekcji docelowych sekwencji DNA stosuje się dwa ogólne podejścia. Jedno to opracowanie metody wykorzystującej znane konserwatywne geny, wspólne dla wszystkich grzybów. Konserwowane regiony, takie jak sekwencja β -tubuliny i sekwencje wewnętrznych regionów niekodujących (ITS, ang. *internal transcribed spacer*), zostały wybrane w celu opracowania testów opartych na PCR przeznaczonych do specyficznej diagnostyki molekularnej i wykrywania patogenów [Zhao i in. 2008]. Alternatywnym podejściem jest zaproponowane w niniejszej pracy badanie przesiewowe losowych elementów genomu grzyba w celu znalezienia regionów wykazujących wymaganą specyficzność [McCartney i in. 2003]. Podobne podejście zastosowali Wang i in. [2017], opracowując markery specyficzne do identyfikacji *Puccinia striiformis* f. sp. *tritici*. Wang i in. [2008] opracowali oparte na PCR metody do bezpośredniej identyfikacji *P. striiformis* w porażonych liściach pszenicy w oparciu o sekwencję specyficzną dla genomu.

Bibliografia

- Barnes C.W., Szabo L.J., 2007. Detection and identification of four common rust pathogens of cereals and grasses using real-time polymerase chain reaction. *Phytopathology* 97, 717–727.
- van den Broeck H.C., Londono D.M., Timmer R., Smulders M.J., Gilissen L.J., van der Meer I.M., 2015. Profiling of nutritional and health-related compounds in oat varieties. *Foods* 5(1), 2.
- Dangl J.L., Horvath D.M. Staskawicz B.J., 2013. Pivoting the plant immune system from dissection to deployment. *Science* 341(6147), 746–751.
- Gibiński M., Gumul D., Korus J., 2005. Prozdrowotne właściwości owsa i produktów owsianych. *Żywn. Nauka Technol. Jakość* 4(45), 49–60.
- Główny Urząd Statystyczny (GUS), 2021. Wynikowy szacunek głównych ziemiopłodów rolnych i ogrodniczych w 2021 r. Informacje Sygnalne.

- Hammer Ø., Harper D.A.T., Rya, P.D., 2001. PAST: Paleontological Statistics Software Package for education and data analysis. *Palaeontol. Electron.* 4(4), 1–9.
- Jaccard P., 1908. Nouvelles recherches, sur la distribution florale. *Bull. Soc. Sci. Natur.* 44, 223–270.
- Liu M., Hambleton S., 2013. Laying the foundation for a taxonomic review of *Puccinia coronata* s.l. in a phylogenetic context. *Mycol. Progress* 12, 63–89.
- Martinelli F., Scalenghe R., Davino S., Panno S., Panno S., Scuderi G., Dandekar A.M., 2015. Advanced methods of plant disease detection. a review. *Agron. Sust. Dev.* 35, 1–25.
- McCartney H.A., Foster S.J., Fraaije B.A., Ward E., 2003. Molecular diagnostics for fungal plant pathogens. *Pest Manag. Sci.* 59, 129–142.
- Mendgen K., 1984. Development and physiology of teliospores. W: *The cereal rust*, vol. 1, A. Roelfs, W. Bushnell (red.). Orlando, FL, Academic Press, Inc., 375–398.
- Menzies J.G., Bakkeren G., Matheson F., Procnier J.D., Woods S., 2003. Use of inter-simple sequence repeats and amplified fragment length polymorphisms to analyze genetic relationships among small grain-infecting species of *Ustilago*. *Phytopathology* 93, 167–175.
- Nazereno S.E., Li F., Smith M., Park R.F., Kinian S.F., Figureroa M., 2018. *Puccinia coronata* f. sp. *avenae*: a threat to global oat production. *Mol. Plant Pathol.* 19(5), 1047–1060.
- Paczos-Grzęda E., Sowa S., 2019. Virulence structure and diversity of *Puccinia coronata* f. sp. *avenae* P. Syd. & Syd in Poland during 2013–2015. *Plant Dis.* 103(7), 1559–1564.
- Scholes J.D., Rolfe S.A., 1996. Photosynthesis in localised regions of oat leaves infected with crown rust (*Puccinia coronata*): quantitative imaging of chlorophyll fluorescence. *Planta* 199, 573–582.
- Staples R., Macko V., 1984. Germination of urediospores and differentiation of infection structures. W: *The cereal rust*, vol. 1, A. Roelfs, W. Bushnell (red.). Orlando, FL, Academic Press, Inc., 255–289.
- Wang S., Chu B., Liu Q., Luo Y., Ma Z., 2017. Development of a sequence-characterized amplified region marker using inter-simple sequence repeats for detection of *Puccinia striiformis* f. sp. *tritici*. *J. Phytopathol.* 2017, 165, 442–447.
- Wang X.J., Zheng W.M., Buchenauer H., Zhao J., Han Q.M., Huang L.L., Kang Z.S., 2008. The development of a PCR-based method for detecting *Puccinia striiformis* latent infections in wheat leaves. *Eur. J. Plant. Pathol.* 120, 241–247.
- XLSTAT, 2019. XLSTAT 2019.4.1 statistical and data analysis solution, Addinsoft, Inc., Brooklyn, NY, USA.
- Zhao J., Wang X.J., Chen C.Q., Huang L.L., Kang Z.S., 2008. A PCR-based assay for detection of *Puccinia striiformis* f. sp. *tritici* in wheat. *Plant Dis.* 91, 1669–1674.
- Ziętkiewicz E., Rafalski A., Labuda D., 1994. Genome fingerprinting by simple sequence repeats (SSR) anchored polymerase chain reaction amplification. *Genomics* 20, 176–183.