

SPRAWOZDANIE

z realizacji w 2023 r. zadania nr 5 pt.

„Analiza molekularna genów warunkujących odporność poziomą u pszenicy (*Triticum aestivum* L.) na porażenie przez grzyby patogeniczne z rodzaju *Puccinia* sp.”

Prace zostały wykonane w ramach badań podstawowych na rzecz postępu biologicznego w produkcji roślinnej na podstawie decyzji nr DHR.hn.802.11.2023 z dnia 16 września 2023 r.

Zadanie nr 5

Kierownik zadania: prof. dr hab. Michał Kwiatek

Wykonawcy:

Prof. UPP dr hab. Agnieszka Tomkowiak, Prof. UPP dr hab. Łukasz Wolko, dr inż. Roksana Bobrowska, dr inż. Sylwia Mikołajczyk, mgr inż. Aleksandra Noweiska, mgr inż. Julia Spychała, Anna Jagieniak, Paweł Poślednik

Wstęp

Choroby pszenicy uprawnej (*Triticum aestivum* L.) wywołane przez grzyby patogeniczne stanowią duży problem gospodarczy. Wiele z tych chorób wpływa znacząco na pogorszenie jakości ziarna. Straty wywołane są głównie obniżeniem masy ziaren oraz zmniejszeniem ich liczby w kłosie. Grzyby z rodzaju *Puccinia* stanowią poważny problem w Europie oraz Ameryce Północnej i Południowej oraz Australii. Do najgroźniejszych chorób pszenicy wywołanych przez grzyby zaliczyć można rdzę brunatną, powodowaną przez *Puccinia recondita* f. sp. *tritici*. O nasileniu choroby decydują również warunki klimatyczne w danym kraju. W Polsce, w optymalnych warunkach rozwoju choroba ta może powodować znaczny spadek plonu, nawet do 30%. Piramidyacja genów warunkujących odporność na konkretną rasę patogenu, bądź wprowadzenie genów odporności niespecyficznych rasowo (odporność horyzontalna, pozioma, wielogenowa, poligeniczna) to dwie, niewykluczające się strategie hodowlane, których celem jest zapobieganie przełamaniu odporności warunkowanej genetycznie. Obecnie zidentyfikowano ponad 100 alleli genów warunkujących odporność na rdzę brunatną, ok. 130 alleli genów warunkujących odporność na rdzę żółtą oraz ponad 140 alleli genów odpowiadających za odporność na mączniaka prawdziwego.

Geny odporności podzielono na dwie grupy. Do pierwszej z nich należą tzw. „główne geny odporności” odpowiedzialne za indukcję odporności typu pionowej („gen na gen”), zwanej inaczej „odpornością rasowo-specyficzną”. Pionowa odporność jest efektywna jedynie w przypadku określonych ras fizjologicznych grzybów patogenicznych. Niestety podstawową wadą tej odporności jest to, że podlega zjawisku „załamywania się” wynikającemu z procesów przystosowawczych w populacjach patogenów. Do drugiej grupy genów odporności zaliczamy geny warunkujące odporność w stadium rośliny dorosłej zwanej także „odpornością rasowo-niespecyficzną” lub „częściową”. Zabezpiecza ona roślinę jednocześnie przed wieloma rasami patogenów, stąd charakteryzuje się ona większą trwałością w warunkach produkcyjnych a cechą charakterystyczną

dla ich działania jest spowolnienie procesu infekcji patogenu (ang. *slow rusting* - w przypadku rdzy) i obniżenie poziomu porażenia. Jak dotychczas w pszenicy scharakteryzowano siedem genów warunkujących obniżony poziom infekcji na choroby wywołane przez grzyby z rodzaju *Puccinia* sp. (tzw. geny typu „slow rusting”): *Lr34/Yr18*, *Lr46/Yr29*, *Lr67/Yr46*, *Lr68*, *Lr75*, *Lr77* oraz *Lr78*. Do tej pory najlepiej poznanym genem warunkującym odporność typu poziomego jest gen *Lr34/Yr18/Sr57/Pm38* (dalej opisany jako *Lr34*). Dotychczas, gen *Lr34* został uznany za źródło trwałej i rasowo niespecyficznego odporności na rdzę brunatną, żółtą, żółtobłądową oraz mączniaka prawdziwego. Gen ten został sklonowany a sekwencja poznana. Koduje on transporter wiążący ATP (tzw. *ABC transporter – ATP Binding Cassette transporter*). Jest to wielodomenowe białko błonowe, wykorzystujące energię z hydrolizy ATP do translokacji substancji przez błonę komórek wszystkich organizmów żywych. Dlatego też gen *Lr34* jest powszechny we wszystkich odmianach pszenicy heksaploidalnej, w kilku wariantach allelicznych. Allel zapewniający odporność (*Lr34res*) różni się od powszechnie obecnego w pszenicy allelu *Lr34sus* trzema mutacjami typu SNP (polimorfizm pojedynczego nukleotydu – ang. *single nucleotide polymorphism*) w intronie 4 oraz egzonach 11 i 12 sekwencji genu *Lr34*. Cechą charakterystyczną działania tego allelu jest podwyższenie odporności na infekcję niezależnie od rasy i rodzaju patogenu. Udowodniono, że każdy z wyżej opisanych genów powoduje spowolnienie infekcji patogenu i w konsekwencji obniżenie stopnia porażenia. Nowym wyzwaniem w hodowli jest stworzenie kombinacji (piramid genowych) zawierających zarówno geny odporności typu pionowego i poziomego.

Geny typu APR są z powodzeniem używane w programach hodowlanych CIMMYT (The International Maize and Wheat Improvement Center). Udowodniono, że każdy z wyżej opisanych genów powoduje spowolnienie infekcji patogenu i w konsekwencji obniżenie stopnia porażenia. Nie ma natomiast danych, jak te geny ze sobą współdziałają i jaki byłby ich wspólny wpływ na kształtowanie poziomu odporności na choroby wywołane przez grzyby patogeniczne. Co więcej, nowym wyzwaniem w hodowli jest stworzenie kombinacji (piramid genowych) zawierających zarówno geny odporności typu pionowego i poziomego.

Cele zadania – tematy badawcze

1. Analiza molekularna 2000 prób pszenicy ozimej powstałej w wyniku krzyżowań, w celu identyfikacji markerów genów typu odporności poziomej („slow rusting”) oraz pionowej.
2. Analizy 150 prób pobranych z pięciu genotypów kombinacji krzyżowań (fitotron) w celu określenia ekspresji genów typu „slow rust”.

Materiał, metody i wyniki

W roku 2023 do analiz molekularnych przeznaczono materiał badawczy pobrany z roślin pokolenia F₁ uzyskanego z form jarych (wysiane wiosną bieżącego roku) oraz pokolenie BC₁F₁ uzyskane z form ozimych (wysiane jesienią tego roku). Materiał do analiz molekularnych zbierano w fazie drugiego liścia (BBCH 12).

Badania w ramach **tematu badawczego nr 1** polegały na identyfikacji alleli **genów typu „slow rusting”** oraz genów głównych u roślin mieszańcowych pszenicy jarej pokolenia F₁ oraz u roślin mieszańcowych pszenicy ozimej pokolenia BC₁F₁ za pomocą markerów molekularnych wyselekcjonowanych na bazie wyników w roku 2021.

Ponadto w każdej analizie genotypy wyjściowe (donorowe i akceptorowe) były

wykorzystywane jako kontrole. Wybór puli genów do analiz danego materiału roślinnego był uzależniony od obecności genów w genotypach rodzicielskich. W tabeli nr 4 zestawiono wyniki analiz molekularnych dotyczące obecności genów typu „slow rusting” *Lr34*, *Lr46*, *Lr67* oraz *Lr68* oraz genów głównych *Lr10*, *Lr13* w genotypach rodzicielskich.

W ramach **tematu badawczego nr 2** analizowano ekspresję różnych miRNA komplementarnych do sekwencji genu *Lr34* oraz ekspresję genów kandydujących *Lr46 – Glu2* i *Lr67* w kontekście odporności roślin na rdzę brunatną (*Puccinia triticina*). Wykazano najwyższy poziom ekspresji miRNA miR9653b we wszystkich formach mieszańcowych i punktach czasowych. Wnioski z badań przeprowadzonych w 2021 i 2022 roku potwierdziły te wyniki. Sugeruje się, że miR9653b jest istotnie zaangażowany w procesy związane z odpornością roślin na rdzę brunatną. Wykazano także, że ekspresja genu *Lr46 – Glu2* intensywnie rośnie po 24 godzinach od inokulacji u wszystkich kombinacji mieszańcowych. Badania sugerują, że gen kandydujący *Lr46 – Glu2* może być właściwym genem *Lr46*, zaangażowanym w reakcję odpornościową roślin. Ekspresja tego genu nie jest blokowana przez komplementarne do jego sekwencji miR5384-3p. Reakcja roślin mieszańcowych na stres wywołany inokulacją jest podobna w przypadku genu *Lr67*. Bezpośrednio po inokulacji (6 godzin) poziom ekspresji tego genu spada, a rośnie po 24 godzinach. Po 48 godzinach ekspresja genu *Lr67* osiąga wartości wyższe niż przed inokulacją, co sugeruje reakcję odpornościową organizmu.

Przeprowadzono także ocenę polową odporności przeprowadzono wg 9-stopniowej skali COBORU dla 73 genotypów pszenicy ozimej w warunkach naturalnego występowania patogenu (Rolnicze Gospodarstwo Doświadczalne Dłoń). Porównano również objawy porażenia patogenem na genotypach podatnych oraz posiadających geny odporności typu „slow rusting” (*Lr34+Lr46+Lr68*).

Wnioski:

1. Wykorzystano analizy PCR z użyciem pojedynczych markerów (*Lr34*, *Lr46*, *Lr67*, *Lr68*, *Lr10* i *Lr13*) do określenia obecności alleli genów odporności typu "slow rusting" w pszenicy.
2. Potwierdzono obecność badanych alleli zarówno w ozimych genotypach mieszańcowych pszenicy pokolenia BC₁F₁, powtórzonych kombinacjach ozimych Symetria x donory pokolenia F₁, jak i w jarych mieszańcach pokolenia F₁.
3. Opracowano trzy protokoły multipleksowego PCR dla głównych genów (*Lr10* i *Lr13*) oraz genów typu "slow rusting" (*Lr68*) w celu selekcji wspomaganą markerami.
4. Przeprowadzono analizy dotyczące układu allelicznego *Lr34+Lr48+Lr68+Lr13*, identyfikując korzystne układy alleliczne w roślinach ozimych.
5. W jarych kombinacjach krzyżowanych osiągnięto nadrzędny cel piramidyzacji genów odporności poziomej typu "slow rusting" z genami odporności pionowej.
6. Zidentyfikowano wartościowe kombinacje genów, szczególnie homozygotyczne względem allelu *Lr46res*, *Lr68res*, *Lr13res*, co może zwiększyć trwałość odporności na patogeny.

7. Gen *Lr34* jest uznawany za źródło trwałej i rasowo niespecyficznej odporności na różne patogeny.
8. W związku z powyższymi wnioskami, zaproponowano badania z wykorzystaniem technologii CRISPR-Cas9 do dokładnej edycji trzech SNP w genie *Lr34* w celu modyfikacji allelu *Lr34sus* na *Lr34res*.
9. Analizując ekspresję różnych miRNA komplementarnych do sekwencji genu *Lr34* stwierdzono, że najwyższy poziom ekspresji wystąpił dla wszystkich form mieszańcowych i punktów czasowych w przypadku miR9653b. Podobne wyniki otrzymano w 2021 oraz 2022 roku badań. Wobec powyższego można sądzić, że miR9653b jest istotnie zaangażowany w procesy związane z odpornością roślin na rdzę brunatną.
10. W przypadku mieszańców Itaka x Glenlea oraz Merkawa x Glenlea liczba kopii miR9653b zdecydowanie rośnie po 6 godzinach od inokulacji a następnie maleje po 12h. Odwrotną sytuację zaobserwowano w przypadku mieszańca (Aura x Glenlea) x Aura, gdzie po 6h od inokulacji zaobserwowano spadek liczby kopii miR9653b a następnie jego wzrost po 12h.
11. Wyniki analizy ekspresji wskazują, że gen kandydat *Lr46 – Glu2* jest zaangażowany w reakcję odpornościową roślin badanych, ponieważ po porażeniu ich przez grzyb *Puccinia triticina* w przypadku wszystkich kombinacji mieszańcowych po 24h od inokulacji intensywnie rośnie poziom jego ekspresji osiągając wyższe wartości niż przed inokulacją. Nasze dotychczasowe badania wyraźnie wskazują, że gen kandydujący *Lr46 – Glu2* może być właściwym genem *Lr46*. Ekspresja tego genu nie była również blokowana przez komplementarne do jego sekwencji miR5384-3p.
12. W przypadku genu *Lr67* reakcja roślin mieszańcowych na stres wywołany inokulacją jest bardzo podobna, to znaczy, że bezpośrednio po inokulacji (6h) poziom ekspresji tego genu wyraźnie spada i rośnie dopiero po 24h. Ekspresja genu *Lr67* u większości mieszańców po 48h osiąga wartości wyższe niż przed inokulacją, co sugeruje na reakcję odpornościową organizmu.

Kierownik zadania