

## SPRAWOZDANIE

z realizacji w 2022 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.802.11.2022 z dnia 21 czerwca 2022 r.

Zadanie nr 5

**Kierownik zadania:** prof. UPP dr hab. Michał Kwiatek

**Wykonawcy:**

Prof. UPP dr hab. Agnieszka Tomkowiak, Prof. UPP dr hab. Danuta Kurasiak-Popowska, Prof. UPP dr hab. Łukasz Wolko, dr inż. Roksana Bobrowska, dr inż. Sylwia Mikołajczyk, mgr inż. Aleksandra Noweiska, mgr inż. Julia Spychała, Anna Jagieniak

### Wstęp

Nowoczesne odmiany pszenicy zwyczajnej (*Triticum aestivum* L.) charakteryzują się dość wąskim zakresem zmienności genetycznej co może skutkować pogorszeniem zdolności adaptacji w przypadku zmian w środowisku, a także wzrostem wrażliwości na stresy biotyczne i abiotyczne. Choroby wywołane przez grzyby patogeniczne istotnie limitują wysokość i jakość plonu pszenicy uprawnej. Do najgroźniejszych chorób pszenicy wywołanych przez grzyby zaliczyć można rdzę brunatną, powodowaną przez *Puccinia recondita* f. sp. *tritici* (syn. *P. triticina*). W Polsce, w optymalnych warunkach rozwoju choroba ta może powodować znaczny spadek plonu, nawet do 30%. Piramidyżacja genów warunkujących odporność na konkretną rasę patogenu, bądź wprowadzenie genów odporności niespecyficzných 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 „załamania 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, żółtobłądą 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 1500 prób pobranych z 30 kombinacji krzyżowań pszenicy zwyczajnej, posiadających geny typu „slow rusting”, w celu identyfikacji markerów genów *Lr34*, *Lr46*, *Lr67* i *Lr68* a także genów głównych odporności.
2. Analizy 150 prób pobranych z pięciu genotypów kombinacji krzyżowań (fitotron) w celu określenia ekspresji genów typu „slow rusting”.

### **Materiał, metody i wyniki**

Na cele realizacji projektu uzyskano materiał roślinny w postaci mieszańców pszenicy zwyczajnej zawierających geny odporności poziomej na rdzę brunatną, które otrzymano w wyniku krzyżowań przeprowadzonych w ramach usługi badawczej wykonanej przez następujące firmy: Danko Hodowla Roślin Sp. z o.o., Hodowla Roślin Smolice Sp. z o. o. Grupa IHAR; Hodowla Roślin Strzelce Sp. z o.o. Grupa IHAR; firmę Małopolska Hodowla Roślin (MHR) Sp. z o.o. oraz Poznańska Hodowla Roślin (PHR) Sp. z o.o. Materiał do izolacji genomowego DNA stanowiła tkanka liściowa. Materiał do analiz molekularnych zbierano w fazie drugiego liścia (BBCH 12). Liście pobierane były do probówek typu eppendorf i przechowywane w temperaturze -80°C do momentu izolacji DNA. Genomowe DNA izolowane było za pomocą komercyjnie dostępnego zestawu GnenMATRIX Plant & Fungi DNA Purification Kit firmy EURX® sp. z o.o. Badania

w ramach zadania nr 1 polegały na identyfikacji *loci* genów *Lr34*, *Lr46*, *Lr67* i *Lr68* oraz genów odporności pionowej *Lr19* i *Lr24* za pomocą markerów molekularnych typu SSR (ang. Simple Sequence Repeats – proste sekwencje powtórzone) oraz CAPS (ang. Cleaved Amplified Polymorphic Sequence - polimorfizm sekwencji powielonej i pociętej). Do analizy markerów SSR (Short Simple Repeats) i CAPS (Cleaved Amplified Polymorphic Sequences) zastosowano startery zsyntetyzowane przez firmę MERCK (tab. 1.).

**Tabela 1.** Sekwencje starterów markerów genów warunkujących odporność typu *slow rusting*. T.a. – temperatura *annealingu*

Lp	Gen	Marker	Typ markera	Sekwencje starterów (5' – 3')		T.a. [°C]	Źródło
				Forward	Reverse		
Markery molekularne genów typu „ <i>slow rusting</i> ”							
1.	<i>Lr34</i>	<i>csLV34</i>	SSR	GTT GGT TAA GAC TGG TGA TGG	TGC TTG CTA TTG CTG AAT AGT	55	MAS Wheat
2.	<i>Lr46</i>	<i>csLV46G22</i>	CAPS	Sekwencje oraz warunki reakcji otrzymane dzięki współpracy z Prof. E. Lagudah'em Poufne do momentu publikacji wyników			
3.		<i>Xwmc44</i>	SSR	GGT CTT CTG GGC TTT GAT CCT G	GTT GCT AGG GAC CCG TAG TGG	61	MAS Wheat
4.	<i>Lr67</i>	<i>Xcfd71</i>	SSR	CAA TAA GTA GGC CGG GAC AA	TGT GCC AGT TGA GTT TGC TC	60	
5.		<i>Xcfd23</i>	SSR	TAG CAG TAG CAG CAG CAG GA	GCA AGG AAG AGT GTT CAG CC	60	
6.	<i>Lr68</i>	<i>csGS</i>	SSR	AAG ATT GTT CAC AGA TCC ATG TCA	GAG TAT TCC GGC TCA AAA AGG	60	
Markery molekularne genów typu „ <i>slow rusting</i> ”							
7.	<i>Lr19</i>	<i>Xwmc221</i>	SSR	ACG ATA ATG CAG CGG GGA AT	GCT GGG ATC AAG GGA TCA AT	55	MAS Wheat
8.	<i>Lr24</i>	<i>sr24#12</i>	SSR	CAC CCG TGA CAT GCT CGT A	AAC AGG AAA TGA GCA ACG ATG T	63	

Identyfikowano także cechę nekrozy końców liści flagowych (*Ltn* – leaf tip necrosis) jest charakterystyczna i sprzężona z wszystkimi analizowanymi genami typu *slow rusting*. Jest to cecha ujawniająca się po kwitnieniu. W celu analizy występowania tej cechy w analizowanej puli 73 genotypów pszenicy w warunkach polowych pobierano dziesięć liści z każdego genotypu i poddano analizie wizualnej oraz dokumentacji fotograficznej.

Badania w ramach tematu badawczego nr 1 polegały na identyfikacji *loci* **czterech genów typu „*slow rusting*”**: *Lr34*, *Lr46*, *Lr67* i *Lr68*, u roślin mieszańcowych pszenicy ozimej pokolenia F<sub>1</sub> za pomocą sześciu markerów molekularnych wyselekcjonowanych na bazie wyników w roku 2021. Ponadto genotypy pokolenia F<sub>1</sub> poddano analizom w celu identyfikacji **dwóch głównych genów *Lr19* i *Lr24*** warunkujących odporność na porażenie przez grzyby z rodzaju *Puccinia*.

Zgodnie z harmonogramem opracowano protokoły reakcji **multipleks PCR**, które pozwalają jednorazowo zidentyfikować różne kombinacje badanych genów odporności poziomej (*Lr34*, *Lr68*) i dwóch głównych genów odporności (*Lr19* i *Lr24*).

Analizy simplex PCR, tj. analizy PCR z użyciem pojedynczych markerów pozwoliły określić obecność badanych alleli genów odporności typu „*slow rusting*” w otrzymanych genotypach mieszańcowych. Co ciekawe, jeden z genotypów akceptorowych, w postaci odmiany Euforia, charakteryzował się obecnością genów *Lr46* oraz *Lr68*. Wyjaśnia to ponadprzeciętną trwałość odporności tej odmiany, obserwowanej w ostatnich latach.

Kluczowym, tegorocznym osiągnięciem jest opracowanie zestawu trzynastu multipleksowych kombinacji markerów PCR, które można zastosować w procesie selekcji wspomaganego markerami. Opracowaliśmy protokoły multipleksowego PCR dla najskuteczniejszych głównych genów (*Lr19*, *Lr24*, *Lr26* i *Lr38*) oraz genów typu „*slow rusting*”: *Lr34* i *Lr68*, które zapewniają trwałą odporność pszenicy. Multipleksowy PCR znajduje szerokie zastosowanie w branży hodowli roślin do: wysokowydajnego genotypowania i selekcji wspomaganego markerami (MAS – ang. *Marker Assisted Selection*) oraz identyfikacji organizmów zmodyfikowanych genetycznie. Jest to szybka metoda, która pozwala również obniżyć koszty badań i skrócić czas trwania eksperymentu.

**W drugim temacie badawczym** analizowano różnice w ekspresji genu *Lr34*, genów kandydujących *Lr46* oraz genu *Lr67* odpowiedzialnych za zróżnicowaną odporność na rdzę brunatną form mieszańcowych F<sub>1</sub> powstałych z przekrzyżowania odmiany Glenlea z genotypami

pochodzącymi z polskich spółek hodowlanych. Materiałem do badań były rośliny mieszańcowe F<sub>1</sub> poddano ocenie stopnia porażenia przez rdzę brunatną w doświadczeniu, w fitotronowych oraz sześciu lokalizacjach (5 mieszańców F<sub>1</sub> × 3 powtórzenia × 6 lokalizacji = 90 obiektów doświadczalnych.) na terenie kraju. W warunkach fitotronowych stres biotyczny u form mieszańcowych F<sub>1</sub> wywołany został w stadium rośliny dorosłej poprzez inokulację zarodnikami (sporami) grzyba. Materiałem infekcyjnym była mieszanina 5 izolatów *P. triticina*. Rośliny mieszańcowe F<sub>1</sub> pszenicy inokulowane były poprzez zastosowanie oprysku całych roślin zawiesiną zarodników o stężeniu ok. 5×10<sup>5</sup> zarodników/ml w stadium rośliny dorosłej. Do izolacji mikroRNA został wykorzystany kit mirVana™ miRNA Isolation Kit z firmy ThermoFisher Scientific. Fragmenty tkanki liściowej do analiz molekularnych zostały pobrane z każdej rośliny mieszańcowej przed inokulacją oraz po 6, 12, 24 i 48 godzinach po inokulacji. Łącznie do analizy ekspresji mRNA związanego z genem *Lr34* i genami kandydującymi *Lr46* pobrano **150 prób** {5 mieszańców x 3 powtórzenia biologiczne x 5 czasów (0h, 6h, 12h, 24h i 48h) x 2 warianty (inokulowane i nieinokulowane)}. Syntezę cDNA przeprowadzono dla 150 próbek wyizolowanego miRNA. W tym celu użyto kitu SuperScript™ IV Reverse Transcriptase 10 000 U z firmy ThermoFisher Scientific. Z kolei syntezę cDNA przeprowadzono przy użyciu zestawu iScript cDNA Synthesis Kit z firmy BIO-RAD na bazie mRNA. W celu przeprowadzenia reakcji odwrotnej transkrypcji cząsteczek miRNA, komplementarnych do sekwencji genów *Lr34* oraz *Lr46* zaprojektowano startery dla syntezy cDNA posłużyło do analizy ekspresji w wykorzystaniem reakcji ddPCR oraz qPCR. Analizując ekspresję różnych miRNA komplementarnych do sekwencji genu *Lr34* stwierdzono, że najwyższy poziom ekspresji wystąpił dla wszystkich mieszańców i punktów czasowych w przypadku miR9653 (tab.2). Podobne wyniki otrzymano w 2021 roku badań na liniach referencyjnych.

**Tabela 2.** Sekwencje zaprojektowanych starterów do reakcji ddPCR

Gen	Lp.	Nazwa startera	Sekwencja startera
<i>Lr34</i>	1.	miR9653b F	5'-ACG CAG TGG CCA AGG TCT CTT-3'
	2.	miR9773 F	5'- GGG ACG TTT GTT TTT ATG TTA TTT -3'
	3.	miR9677b F	5'- AGA TAT CAG GGC GGG GAA CAG -3'
<i>Lr46</i>	4.	miR164 F	5'-AGTCAGTGGAGAAGCAGGGCA -3'
	5.	miR9780 F	5'- ATT ATA CGG GTC GGC GCT GCA -3'
	6.	miR9775 F	5'- CAT GCA TGT GCG CAA TAA GAT T -3'
	7.	miR5384-3p F	5'- ATAGTATGAGCGCGCCCGCGT-3'
	8.	Universal R	5'-CCA GTG CAG GGT CCG AGG TA-3'

Najwyższą ekspresją spośród analizowanych miRNA komplementarnych do genu kandydata *Lr46* (*Rlk3*) odznaczał się miR164. W przypadku miR5384-3p komplementarnego do sekwencji genu kandydata *Lr46* (*Glu2*) również zaobserwowano istotną ekspresję tego miRNA po porażeniu przez *Puccinia Triticina*. W przypadku miR9780 i miR9775 odnotowano nieistotny poziom ich ekspresji.

Startery do reakcji qPCR zostały zaprojektowane w oparciu o sekwencje uzyskane w ramach usługi sekwencjonowania. W 2021 roku zostało wyselekcjonowanych 10 genów-kandydatów dla genu *Lr46*, których sekwencje znaleziono w bazie Ensembl Plants. Po sprawdzeniu ekspresji tych genów do analiz w roku 2022 wybrano te, które charakteryzowały się najwyższą ekspresją w odpowiedzi na porażenie przez *Puccinia triticina*, czyli geny *Glu2*, *Rlk2* i *Rlk3*. Spośród wszystkich analizowanych genów podobnie jak w roku 2021 najwyższym poziomem ekspresji po porażeniu roślin przez *P. triticina* charakteryzował się gen kandydat *Lr46* – *Glu2*. Wskazuje to na istotną jego rolę w procesach odpornościowych. Kolejnym genem, który charakteryzował się wysoką istotną ekspresją był kolejny gen kandydat *Lr46* – *Rlk3*. Rola pozostałych genów kandydujących *Lr46*: *Rlk1* i *Rlk2* była nieistotna.

## Najważniejsze wnioski:

1. Markery molekularne pozwoliły wyselekcjonować genotypy posiadające dwa lub więcej alleli genów odporności typu „slow rusting” wśród form mieszańcowych pokolenia F<sub>1</sub>.
2. Odmiana Euforia, charakteryzowała się obecnością genów *Lr46* oraz *Lr68* a w wyniku przeprowadzonych badań, jej pula genetyczna została poszerzona o gen *Lr34* oraz *Lr67*.
3. Optymalizacja metody PCR w celu zaprojektowania reakcji multipleksowego PCR wymaga następujących kroków:
  - a. selekcji efektywnych, dostępnych markerów molekularnych dla *Lr19*, *Lr24*, *Lr34* i *Lr68*, których rozmiary amplikonów pozwalają na rozróżnienie poszczególnych alleli w multipleksie;
  - b. dopasowanie wspólnych temperatur przyłączania za pomocą gradientowego PCR;
  - c. manipulowanie stężeniami starterów w celu uzyskania łatwego do interpretacji wzoru prążkowania na żelu.
4. Opracowane trzynaście wariantów multipleks PCR okazały się być skuteczne w identyfikacji genotypów charakteryzujących się piramidyzacją genów typu „slow rusting” w analizowanej puli genotypów.
5. Dwuletnie obserwacje morfologicznego markera *Ltn* (nekroza końcówek liści), który jest sprzężony z loci: *Lr34* (*Ltn1*), *Lr46* (*Ltn2*) *Lr67* (*Ltn3*) oraz *Lr68* (*Ltn4*) wykazały, iż obserwowana cecha jest stałym markerem obecność alleli warunkujących odporność.
6. Analizując ekspresję różnych miRNA komplementarnych do sekwencji genu *Lr34* stwierdzono, że najwyższy poziom ekspresji wystąpił dla wszystkich mieszańców i punktów czasowych w przypadku miR9653b. Podobne wyniki otrzymano w 2021 roku badań na liniach referencyjnych. Wobec powyższego można sądzić, że miR9653b jest istotnie zaangażowany w procesy związane z odpornością roślin na rdzę brunatną.
7. Najwyższą ekspresją spośród analizowanych miRNA komplementarnych do genów kandydatów *Lr46* odznaczał się miR164, który był komplementarny do genu kandydata *Rlk3*. W przypadku miR5384-3p komplementarnego do sekwencji genu kandydata *Glu2* również zaobserwowano istotną ekspresję tego miRNA po porażeniu przez *Puccinia triticina*.
8. Najwyższym poziomem ekspresji po porażeniu roślin przez *Puccinia triticina* charakteryzował się gen kandydat *Lr46* – *Glu2*. Wskazuje to na istotną jego rolę w procesach odpornościowych. Kolejnym genem, który charakteryzował się niższą ale istotną ekspresją był kolejny gen kandydat *Lr46* – *Rlk3*. Rola pozostałych genów kandydujących *Lr46*: *Rlk1* i *Rlk2* była nieistotna.
9. Gen kandydat *Lr46* – *Glu2* jest zaangażowany w reakcję odpornościową roślin 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.

Prof. UPP dr hab. Michał Kwiatek  
Katedra Genetyki i Hodowli Roślin  
Uniwersytet Przyrodniczy w Poznaniu

Michał Kwiatek