

SPRAWOZDANIE

z realizacji w 2024 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.803.3.2024.

Zadanie nr 5

Kierownik zadania: prof. dr hab. Michał Kwiatek

Wykonawcy:

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

Wstęp

Choroby pszenicy uprawnej (*Triticum aestivum* L.) wywołane przez grzyby patogeniczne stanowią poważne zagrożenie dla produkcji rolniczej. Wiele z tych chorób ma istotny wpływ na pogorszenie jakości ziarna, prowadząc do strat związanych z obniżeniem masy ziaren oraz zmniejszeniem ich liczby w kłosach. Grzyby z rodzaju *Puccinia* sp. stanowią istotny problem w Europie, Amerykach oraz Australii. Jedną z najbardziej szkodliwych chorób jest rdza brunatna, wywoływana przez *Puccinia triticina*, która w Polsce może spowodować znaczny spadek plonów, nawet o 30%, zwłaszcza w sprzyjających warunkach atmosferycznych. Aby zapobiec przełamaniu odporności, stosuje się strategie hodowlane, takie jak piramidyzacja genów odpowiedzialnych za odporność na konkretne rasy patogenów lub wprowadzenie genów odpowiadających za odporność o charakterze horyzontalnym, wielogenowym i poligenicznym. Obecnie zidentyfikowano ponad 100 alleli genów odpornych na rdzę brunatną, około 130 na rdzę żółtą oraz 140 odpowiadających za odporność na mączniaka prawdziwego.

Geny odporności dzielą się na dwie grupy. Pierwszą stanowią tzw. „główne geny odporności”, które odpowiadają za indukcję odporności pionowej („gen na gen”), znanej także jako odporność rasowo-specyficzna. Choć ta forma odporności jest efektywna wobec określonych ras patogenów, jej główną wadą jest podatność na zjawisko „załamywania się” z powodu adaptacji patogenów. Drugą grupę stanowią geny odpowiedzialne za odporność typu poziomego lub częściowego, które zapewniają ochronę przed wieloma rasami patogenów i są bardziej trwałe w warunkach polowych. Charakterystyczną cechą tej odporności jest spowolnienie procesu infekcji oraz zmniejszenie stopnia porażenia, a także opóźnienie rozwoju choroby (np. „*slow rusting*” w przypadku rdzy). W pszenicy wyróżnia się siedem genów typu „*slow rusting*”, takich jak *Lr34/Yr18*, *Lr46/Yr29*, *Lr67/Yr46*, *Lr68*, *Lr75*, *Lr77* oraz *Lr78*. Z najbardziej zbadanych genów wymienia się *Lr34/Yr18/Sr57/Pm38*, który zapewnia odporność na rdzę brunatną, żółtą, żółtą oraz mączniaka prawdziwego. Gen ten został sklonowany, a jego sekwencja poznana. Koduje on białko transporterowe związane z ATP, znane jako ABC transporter, które wykorzystuje energię ATP do transportu substancji przez błonę komórkową. Gen *Lr34* występuje w różnych wariantach allelicznych w pszenicy heksaploidalnej, a allel odporny (*Lr34res*) różni się od wersji wrażliwej (*Lr34sus*) trzema mutacjami SNP. Gen ten jest powszechnie obecny we wszystkich odmianach pszenicy i zapewnia odporniejsze działanie wobec różnych ras patogenów.

Obecnie wyzwaniem w hodowli pszenicy jest stworzenie tzw. piramid genowych, które łączą geny odporności zarówno pionowej, jak i poziomej. Geny typu APR są już wykorzystywane w programach hodowlanych, takich jak te prowadzone przez CIMMYT (Międzynarodowe Centrum Poprawy Kukurydzy i Pszenicy). Chociaż udowodniono, że geny typu „*slow rusting*” powodują spowolnienie infekcji i zmniejszenie porażenia, brakuje wiedzy na temat ich współdziałania oraz wpływu na wspólny poziom odporności w uprawach pszenicy.

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 rusting*”.

Materiał, metody i wyniki

W roku 2024 do analiz molekularnych przeznaczono materiał badawczy pobrany z roślin pokolenia BC₁F₁ uzyskanego z form jarych (wysiane wiosną bieżącego roku) oraz pokolenie BC₂F₁ 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*” *Lr34*, *Lr46*, *Lr67* oraz *Lr68* oraz genów głównych oraz genów głównych *Lr26*, *Lr28* w genotypach rodzicielskich i u roślin mieszańcowych pszenicy jarej pokolenia BC₁F₁ oraz u roślin mieszańcowych pszenicy ozimej pokolenia BC₂F₁ za pomocą markerów molekularnych wyselekcjonowanych na bazie wyników w roku 2021. Ponadto w każdej analizie genotypy wyjściowe (donorowe i akceptorowe) były wykorzystywane jako kontrole. Przeanalizowano 1000 genotypów i wyselekcjonowano rośliny charakteryzujące się kumulacją genów odporności pionowej i poziomej

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 tritricina*). Geny *Lr34* i *Lr67*, odpowiedzialne za odporność na różne patogeny, wykazują różnice w ekspresji między odmianami pszenicy, a ich kombinacje mogą poprawiać odporność. Gen *Lr34*, szczególnie interagujący z innymi genami, ma kluczowe znaczenie w hodowli pszenicy. Tegoroczne badania pokazują, że gen *Lr67* również współdziała z innymi genami, co może poprawić odporność. Istnieje potrzeba dalszych badań nad regulacją ekspresji genów i roli miRNA w odporności pszenicy, co może dostarczyć nowych informacji do przyszłych programów hodowlanych.

Wnioski:

1. W badanych genotypach pszenicy jarej i ozimej stwierdzono różnorodność alleli *Lr34*, *Lr46* i *Lr68*, co otwiera możliwość dalszej selekcji roślin o stabilnej odporności na rdzę brunatną.
2. Geny *Lr34*, *Lr46* i *Lr68*, odpowiedzialne za odporność typu „*slow rusting*”, wykazały jednoczesną obecność w dużej liczbie analizowanych genotypów, co czyni je wartościowymi w hodowli pszenicy odpornej na rdzę.
3. Najcenniejszymi genotypami są kombinacje pokolenia BC₂F₁ Symetria × Purdue z zestawem genów *Lr26+Lr28+Lr46+Lr67+Lr68*.
4. Najwyższym poziomem ekspresji po porażeniu roślin przez *Pt* charakteryzował się gen kandydujący *Lr46-Glu2*. Wskazuje to na jego potencjalną rolę w procesach odpornościowych pszenicy. Przedstawione wyniki ekspresji tego genu stanowią ważną podstawę do dalszych analiz funkcjonalnych tego genu.
5. W przypadku badanego genu kandydującego *Lr46-Glu2* najwyższe wartości ekspresji można zaobserwować głównie w 24 i 48 hpi. Podobnie jak w przypadku genu *Lr34*, ekspresja genu *Lr46-Glu2* u TX miarowo wzrastała w czasie.
6. Poziom ekspresji genu *Lr67* był zróżnicowany pomiędzy badanymi formami mieszańcowymi pszenicy, wykazując wysoki bazowy poziom ekspresji przed inokulacją *Pt* (0 hpi).
7. U uzyskanych form mieszańcowych gen *Lr67* charakteryzował się stosunkowo niską ekspresją, uzyskując najwyższe wartości w 6 hpi i 24 hpi.
8. Analiza reakcji miRNA na inokulację grzybem *Pt* wskazuje na aktywację ekspresji cząsteczki tae-miR5384-3p oraz udział tej cząsteczki w modulacji odpowiedzi immunologicznej pszenicy
9. Przeprowadzone w poprzednich latach doświadczenia wykazały, że tae-miR9653b może być zaangażowany w mechanizmy odporności roślin na rdzę liści powodowaną przez *Pt*. Zgodnie z wykorzystaną bazą danych, cząsteczka tae-miR9653b jest związana z odpornością na rdzę brunatną, nadawaną przez gen *Lr34*, a różnice w ekspresji indukowane przez inokulację *Pt* mogą potwierdzać tę informację.

Kierownik zadania