

## **Tytuł projektu:**

Identyfikacja mechanizmu molekularnego odporności żyta ozimego na rdzę brunatną.

## **Skład zespołu realizującego badania:**

Dr hab. Kamila Nowosad

Dr inż. Bartosz Kozak

Prof. dr hab. Henryk Bujak

Dr Kamil Kostyn

2 pracowników technicznych.

## **Opis problemu badawczego**

Rdza brunatna corocznie poraża, w większym lub mniejszym stopniu, wszystkie odmiany populacyjne oraz mieszańcowe żyta ozimego i jarego. Czynnikiem sprawczym tej choroby jest grzyb (*Puccinia recondita f. sp. secalis*). Jest ona, szczególnie niebezpieczna dla odmian o skróconym źdźble, u których udział liści w ogólnym bilansie asymilacji jest większy niż u odmian wysokich. Szkodliwy wpływ rdzy brunatnej na żyto zaczyna się po infekcji, gdy patogen zaczyna zarodnikować. Następuje wówczas obniżenie aktywności enzymu dehydrogenazy, natomiast znacznie wzrasta aktywność rybonukleazy, co powoduje zmniejszenie zawartości kwasów nukleinowych w liściach. Występują problemy z transkrypcją i następuje zatrzymanie syntezy RNA, czego konsekwencją jest zmniejszenie ilości produktów translacji i spadek poziomu białek. Postępujący proces degradacji białek powoduje osłabienie procesów życiowych w roślinach i dalszą przyspieszoną degradację białek. Dodatkowo pojawiające się na powierzchni liści ogniki rdzy redukują ich powierzchnię asymilacyjną, co w konsekwencji przyczynia się do zmniejszenia produktywności roślin.

U żyta mechanizm obronny na infekcję powodowaną przez rdzę brunatną polega na tworzeniu nekrotycznych plam otaczających skupiska zarodników w punktach jego przeniknięcia do komórek tkanek żywiciela. W komórkach i tkankach zainfekowanych roślin z takim typem odporności szybko następuje aktywizacja enzymów biosyntezy związków fenolowych. W okresie poprzedzającym zarodnikowanie patogena zmienia się także metabolizm kwasów nukleinowych żywiciela. Powstające związki fenolowe gromadzą się wokół miejsc wnikięcia patogena do komórek liści. W konsekwencji prowadzi to do śmierci pasożyta oraz do nekrozy porażonych tkanek. Jest to typowa obronna reakcja rośliny na infekcję patogena o obligatoryjnym typie pasożytnictwa, którą potocznie określa się jako nadwrażliwość. Żyto z takim typem reakcji na infekcję przez rdzę brunatną nie uzyskuje jednak pełnej odporności.

Podjęmowane próby hodowli i selekcji żyta w kierunku odporności na rdzę brunatną z wykorzystaniem genów odporności z wieloletniego żyta Dzierżawina, górskiego żyta Kruprianowi oraz populacji wyodrębnionej przez Kobyljanskiego, nie zakończyły się sukcesem (Solodukhina 1994; Kobylanski i Solodukhina 1996). Badania nad genetycznymi źródłami odporności na rdzę brunatną u żyta nie są tak zaawansowane jak u innych gatunków zbóż. Zlokalizowanie genów odporności i opracowanie systemów markerowych, które posłużą do wykrywania tych genów na wczesnych etapach hodowli wymaga zebrania odpowiedniej puli genotypów odpornych. Do form takich należą mi in. linie wyprowadzone z *Secale cereale* odmiana 'Rosen', która posłużyła jako źródło genów

odporności na rdzę Lr25 u pszenicy, odmiana 'Sanim' ('Sangaste x Immunaya1') czy odmiana „Immunaya 1” wyprowadzona z populacji *Secale montanum*.

Prowadzone dotychczas badania molekularne oraz próby mapowania genów odporności na rdzę brunatną u żyta pozwoliły na opracowanie markerów molekularnych RAPD i SSR sprzężonych z genem Pr1 zmapowanym na chromosomie 6RL i genem Pr2 na chromosomie 7RL (Korzun i in. 2001; Hackauf i Wehling 2002, Wehling i in. 2003). Obydwa dominujące geny Pr1 i Pr2 nadają oporność poprzez nadwrażliwość i uznano je za aktywne wobec miejscowej populacji *P. recondita*. Dodatkowo trzy inne geny Pr3, Pr4, Pr5, związane z rasową opornością na rdzę brunatną, zostały zidentyfikowane przez Roux i in. (2004). Stosowanie specyficznej oporności jest skuteczną strategią, często stosowaną w hodowli, przeciwko *P. recondita* oraz innym patogenom biotroficznym, ale niestety jego trwałość nie jest zadowalająca (Miedaner i in., 2012). Alternatywne podejście skupia się na niespecyficznej odporności, która jest również znana jako odporność niepowtarzalna lub częściowa, ponieważ rozwój choroby jest zmniejszony, ale nie całkowicie zatrzymany. Udało się zidentyfikować niespecyficzne geny oporności kodujące transporter ABC i białko zawierające prolinę u pszenicy (Krattinger i wsp. 2009) oraz u ryżu (Fukuoka i in., 2009), jednak koncepcja niespecyficznej oporności na rdzę brunatną u żyta nie została szczegółowo zbadana.

Wykorzystując mapowanie asocjacyjne genomu (GWAM) na podstawie sekwencji markerów DArTSeq i mapowanie asocjacyjne genów kandydujących (CGAM) na podstawie sekwencji genów ScBx udało się wykryć dwa markery SNP silnie powiązane z cechą odporności na rdzę brunatną u żyta (Rakoczy-Trojanowska i in. 2017).

**Proponowany sposób rozwiązania problemu badawczego** - jakie prace będą wykonywane w ramach projektu i jakimi metodami chcą się Państwo posłużyć,

Rok I:

- Ocena podatności genotypów żyta wybranych przez stacje hodowli na porażenie przez rdzę brunatną przeprowadzona poprzez sztuczna inokulację;
- Ocena wybranych z kolekcji KGHRiN linii wsobnych pod kątem przydatności do wytworzenia populacji mapującej pozwalającej na wykrycie genów odporności na rdzę;
- Przeprowadzenie krzyżowania wybranych linii rodzicielskich żyta w celu wytworzenia pokolenia F1;
- Identyfikacja genów o zmienionej ekspresji pod wpływem infekcji patogena na pomocą technik:
  - RNAseq
  - sRNA
  - degradom.

Rok II:

- Rozmnożenie pokolenia F1 do F2;
- Ocena podatności genotypów wybranych przez stacje hodowli na porażenie żyta przez rdzę brunatną przeprowadzona poprzez sztuczna inokulację;
- Sekwencjonowanie DNA linii rodzicielskich w celu identyfikacji markerów SNP użytecznych w genotypowaniu populacji mapującej;
- Analiza metylomu linii rodzicielskich;

- ❑ Ocena markerów SNP przewidzianych w *in-silico* do genotypowania populacji mapującej;
- ❑ Przeprowadzenie reakcji SSR w celu poznania polimorfizmu mikrosatelitarnego pomiędzy liniami rodzicielskimi;
- ❑ Przeprowadzanie reakcji qPCR w celu potwierdzenia wyników RNAseq z pierwszego roku
- ❑ Opracowanie starterów do sekwencjonowania wytypowanych genów o zmienionej ekspresji pod wpływem infekcji patogena.

#### Rok III:

- ❑ Ocena podatności genotypów wybranych przez stacje hodowli na porażenie zryta przez rdzę brunatną przeprowadzona poprzez sztuczną inokulację;
- ❑ Genotypowanie połowy obiektów populacji mapującej F2 wybranym zestawem markerów SNP techniką target GBS;
- ❑ opracowanie wstępnej mapy genetycznej dla połowy populacji mapującej;
- ❑ Sekwencjonowanie wybranych genów o zmienionym poziomie ekspresji pod wpływem patogena u obiektów wyselekcjonowanych w trakcie 3 letniej oceny materiałów hodowlanych w celu identyfikacji polimorfizmów w tych genach;
- ❑ qPCR potwierdzający uzyskane dane z metylomu.

#### Rok IV:

- ❑ Genotypowanie drugiej połowy obiektów populacji mapującej F2 wybranym zestawem markerów SNP techniką target GBS;
- ❑ Opracowanie mapy genetycznej całej populacji mapującej;
- ❑ Testowanie wytypowanych markerów na liniach hodowlanych po ocenie porażenia.

#### Rok V :

- ❑ Konwersja opracowanych markerów SNP oraz polimorfizmu wykrytego poprzez sekwencjonowanie wytypowanych w RNAseq genów do markerów MAS.
- ❑ Ocena użyteczności uzyskanych markerów we wskazanych przez hodowców materiałach.