

Instytut Hodowli i Aklimatyzacji Roślin
– Państwowy Instytut Badawczy

mgr Marta Dmochowska-Boguta

Autoreferat rozprawy doktorskiej

Analiza wybranych czynników genetycznych
i biochemiczno-fizjologicznych
odporności pszenicy (*Triticum aestivum* L.)
na rdzę brunatną (*Puccinia triticina*)

Praca wykonana pod kierunkiem
Prof. dr hab. Wacława Orczyka
Zakład Inżynierii Genetycznej
Instytut Hodowli i Aklimatyzacji Roślin –
Państwowy Instytut Badawczy w Radzikowie

Recenzenci:
Prof. dr hab. Andrzej Kononowicz
Katedra Genetyki Ogólnej,
Biologii Molekularnej i Biotechnologii Roślin
Wydział Biologii i Ochrony Środowiska
Uniwersytet Łódzki

Dr hab. Marcin Filipecki
Katedra Genetyki, Hodowli i Biotechnologii Roślin
Wydział Ogrodnictwa, Biotechnologii i Architektury Krajobrazu
Szkola Główna Gospodarstwa Wiejskiego w Warszawie

Radzików, 2016r.

Streszczenie

Pszenica (*Triticum aestivum* L.) jest uprawiana na całym świecie, a jej globalna produkcja zajmuje trzecie miejsce po kukurydzy i ryżu. Najważniejszymi celami hodowli pszenicy jest wysoki plon oraz odporność na stresy abiotyczne i biotyczne. Jedną z najważniejszych chorób jest rdza brunatna pszenicy powodowana przez grzyba *Puccinia triticina*. Straty powodowane przez tą chorobę mogą stanowić nawet 50% wielkości plonu. Najważniejszą metodą ochrony jest wykorzystanie odmian odpornych, dlatego poznanie mechanizmów odporności jest tak bardzo istotne.

Celem tej pracy było poznanie interakcji pszenica – *Puccinia triticina*. Badano takie elementy tej interakcji jak: rozwój patogena, reakcja mikronekrotyczna rośliny, wzór akumulacji nadtlenu wodoru i jego pochodzenie, odkładanie kalozy, lignifikacja oraz analiza ekspresji wybranych genów i klonów SSH.

Obserwowane objawy choroby były podstawą podziału badanych linii pszenicy na trzy grupy: linie podatne (Thatcher i TcLr34), średnio odporne (TcLr24, TcLr25 i TcLr29) oraz odporne (TcLr9, TcLr19 i TcLr26). Wybrane elementy interakcji roślina – patogen były oceniane na podstawie obserwacji mikroskopowych. W tym celu wykonano szereg analiz histochemicznych: barwienie calcofluorem white umożliwiło wizualizację struktur patogena, błękitem Evansa umożliwiło obserwację mikronekroz, DAB wybarwiający komórki z nadtlakiem wodoru pozwolił badać akumulację tej reaktywnej formy tlenu, błękitu aniliny użyto do barwienia kalozy oraz floroglucynolu do barwienia lignin. Na podstawie tych obserwacji stwierdzono, że mała liczba komórek macierzystych haustorium patogena, szybka akumulacja nadtlenu wodoru w mezofilu oraz szybkie pojawienie się reakcji nekrotycznej są charakterystyczne dla roślin wysoce odpornych i mogą być wyznacznikami wysokiej odporności pszenicy na rdzę brunatną. Lignifikacja była obserwowana w miejscach infekcji u roślin średnio odpornych oraz odpornych. Proces ten, będący składnikiem mechanizmów odporności, jest skorelowany z akumulacją nadtlenu wodoru w mezofilu i reakcją mikronekrotyczną. Odkładanie kalozy było obserwowane u wszystkich roślin (podatnych i odpornych), dlatego prawdopodobnie nie ma ono kluczowego znaczenia dla badanego typu odporności.

Ekspresja genów kodujących peroksydazy i oksydazy NADPH oraz zastosowanie specyficznych inhibitorów tych enzymów dowiodła ich udziału w wytwarzaniu nadtlenu wodoru u badanych linii po inokulacji *Puccinia triticina*. Użycie azydki sodu jako inhibitora peroksydaz wskazuje na udział tej grupy enzymów w akumulacji H₂O₂ u siedmiu z ośmiu testowanych linii (TcLr9, TcLr19, TcLr24, TcLr25, TcLr29, TcLr34

oraz Thatcher). Infiltracja liści difenylem jodoniowym – inhibitorem oksydaz NADPH potwierdza rolę tego enzymu u linii *TcLr26*. Użycie 2-bromoetyloaminy inhibitora oksydazy diaminowej wskazuje, że ten enzym był aktywny u linii średnio odpornych (*TcLr25* i *TcLr29*) oraz u linii odpornych (*TcLr9*, *TcLr19* i *TcLr26*). Użycie 1,12-diaminododekanu będącego inhibitorem oksydazy poliaminowej wykazało, że ten enzym jest aktywny w procesie akumulacji nadtlenku wodoru w linii *TcLr9*. Analiza ekspresji peroksydaz i oksydaz NADPH wykazała ich udział w akumulacji nadtlenku wodoru, a wzory ekspresji tych enzymów były spójne z obserwacjami mikroskopowymi. Wzory ekspresji sześciu z ośmiu badanych genów reprezentowanych przez klony SSH wskazały na ich potencjalny udział w reakcji odporności. Analiza bioinformatyczna pełnej sekwencji kodującej klonu JG968933 wykazała, że kodowanym białkiem jest kinaza związana ze ścianą komórkową TaWAK (wall association kinase). Wzór ekspresji genu *TaWAK*, z bardzo silną indukcją w czasie infekcji, sygnalizuje jego istotną rolę w reakcji odporności.

1. Wstęp i cel pracy

Pszenica jest zbożem uprawianym powszechnie. Ziarno wykorzystywane jest do wytwarzania mąki przeznaczonej do wypieku chleba i ciast oraz do produkcji makaronu, a także pasz dla zwierząt, alkoholu i biopaliw. Główne cele hodowli to wielkość i jakość plonu, odporność na choroby i szkodniki oraz tolerancja na stresy abiotyczne takie jak susza i wysokie temperatury. Wśród głównych chorób pszenicy można wymienić: rdzę brunatną, rdzę żdźbłową, rdzę żółtą, mączniaka prawdziwego, łamliwość żdźbła, septoriozę plew pszenicy, septoriozę paskowaną liści, fuzariozę kłosów czy brunatną plamistość liści.

Rdza brunatna pszenicy powodowana przez *Puccinia triticina* jest jedną z głównych chorób pszenicy, która może powodować bardzo poważne straty plonu. *Puccinia triticina* jest biotrofem, który w sprzyjających warunkach wytwarza uredinia z urediniosporami tak długo jak zainfekowana roślina pozostaje przy życiu. Urediniospory są zarodnikami przenoszonymi przez wiatr, dlatego mogą zakażać setki kilometrów od ich źródła, powodując epidemie rdzy brunatnej o zasięgu kontynentalnym (Bolton i in. 2008).

Genetyczna odporność jest ważnym sposobem zwalczania rdzy brunatnej, o wiele bardziej pożądanym niż użycie fungicydów, których stosowanie jest coraz mniej akceptowane przez konsumentów. Wykorzystanie odmian odpornych jest najlepszym pod względem ekonomicznym i najbardziej pożądanym ekologicznie sposobem ograniczenia epidemii chorób (Duveiller i in. 2007). Geny odporności *R* umożliwiają roślinie detekcję i rozpoznanie rozwijającego się patogena, a następnie indukowanie odpowiedzi rośliny. Znanych jest ponad 70 genów *Lr* warunkujących odporność pszenicy na rdzę brunatną (Park i in. 2014). Znaczna ich część jest wykorzystywana w hodowli odpornościowej. Odporność warunkowana przez pojedynczy gen *R* jest często nietrwała, dlatego do odmian często wprowadza się kilka różnych genów odporności (jest to tzw. piramidyzacja genów) (Niks i Rubiales 2002). Dla identyfikowania nowych genów i pozyskiwania różnorodnych źródeł odporności ważne jest poznanie patogena oraz mechanizmów odporności warunkowanych przez te geny.

Nadrzędnym celem pracy było poznanie wybranych komponentów interakcji pszenica – rdza brunatna, w tym były następujące cele szczegółowe:

1. Poznanie roli wybuchu oksydacyjnego w interakcji pszenica – rdza brunatna oraz identyfikacja najważniejszych komponentów genetyczno-biochemicznych tego procesu.
2. Zbadanie czy u linii odpornych występuje reakcja mikronekrotyczna, czy jest odkładana kaloza i ligniny w interakcji z *Puccinia triticina*.
3. Poznanie sekwencji kodującej klonu JG968933, analiza bioinformatyczna otrzymanej sekwencji w celu przypisania funkcji biologicznej oraz analiza ekspresji w czasie po inokulacji *Puccinia triticina*.
4. Analiza ekspresji wybranych genów reprezentowanych przez klony SSH.

2. Materiały i metody

2.1. Materiał biologiczny

Materiałem użytym do badań była pszenica zwyczajna (*Triticum aestivum* L.) odmiana Thatcher (Tc) i izogeniczne linie odmiany Thatcher z określonymi genami odporności na rdzę brunatną: *TcLr9*, *TcLr19*, *TcLr24*, *TcLr25*, *TcLr26*, *TcLr29* i *TcLr34* oraz jednozarodnikowy izolat *Puccinia triticina*.

2.2. Analizy mikroskopowe

Siewki inokulowano zarodnikami *P. triticina* i barwiono calcofluor white w celu lokalizacji struktur patogena (Bender i in. 2000). Obserwowano strzępki kiełkowe, appresoria, strzępki infekcyjne oraz komórki macierzyste haustorium (KMH). Autofluorescencja widoczna na tych preparatach wskazywała na obecność nekroz, które dodatkowo identyfikowano barwiąc błękitem Evansa (Wang i in. 2007). Odkładanie kalozy lokalizowano barwieniem z wykorzystaniem błękitu aniliny (Borden i Higgins 2002). Ligniny barwiono floroglucynolem (Sherwood i Vance 1976). Dla lokalizacji nadtlenu wodoru wykorzystano barwienie DAB (3'3-diaminobenzidine-tetrahydrochloride) (Orczyk i in. 2010).

W czasie barwienia nekroz, kalozy i akumulacji nadtlenu wodoru opracowano nowe procedury umożliwiające jednoczesną obserwację struktur patogena i reakcje rośliny na infekcję.

W celu wskazania enzymów zaangażowanych w wytwarzanie nadtlenu wodoru w miejscach infekcji zastosowano inhibitory dla wybranych enzymów. Wykorzystano

difenylen jodoniowy (DPI) jako inhibitor oksydazy NADPH (NOX) (Grant i in. 2000), azydek sodu – inhibitor peroksydaz (POX) (Grant i in. 2000), 2-bromoetylamine – inhibitor oksydazy diaminowej (DAO, CuAO) (Rea i in. 2002) oraz 1,12-diaminododekan – inhibitor oksydazy poliaminowej (PAO) (Bianchi i in. 2006). Następnie liście barwiono DAB dla lokalizacji nadtlenu wodoru.

Przy opracowywaniu wyników wprowadzono współczynnik inhibicji, umożliwiający ocenę wpływu określonego inhibitora na akumulację nadtlenu wodoru.

2.3. Analiza ekspresji genów peroksydaz, oksydaz NADPH oraz wybranych klonów SSH

Wzór ekspresji i wybranych genów oraz klonów SSH w roślinach inokulowanych zarodnikami *P. triticea* określano przy wykorzystaniu reakcji amplifikacji z pomiarem w czasie rzeczywistym (qRT-PCR). Reakcje ilościowego PCR na matrycy cDNA wykonywano z wykorzystaniem specyficznych starterów. Analizę wykonano dla wybranych peroksydaz i oksydaz NADPH przy wykorzystaniu sekwencji dostępnych w bazach danych oraz dla wybranych klonów SSH zidentyfikowanych wcześniej w Zakładzie Inżynierii Genetycznej IHAR-PIB. Referencyjnym transkryptem było cDNA 18S rRNA (M82356) (Scofield i in. 2005).

Zaproponowano użycie nowego parametru kumulatywnego współczynnika transkrypcji (CVTR - cumulative value of transcript rate). Współczynnik ten pozwolił ocenić oddziaływanie badanego genu na analizowany proces.

2.4. Poznanie sekwencji kodującej klonu JG968933 oraz analiza bioinformatyczna poznanej sekwencji nukleotydowej i aminokwasowej

Klon JG968933 (RI-77) o znanej częściowej sekwencji kodującej 291 pz został zidentyfikowany w bibliotece subtrakcyjnej cDNA pszenicy zawierającej transkrypty regulowane w linii *TcLr9* po inokulacji zarodnikami *P. triticea*.

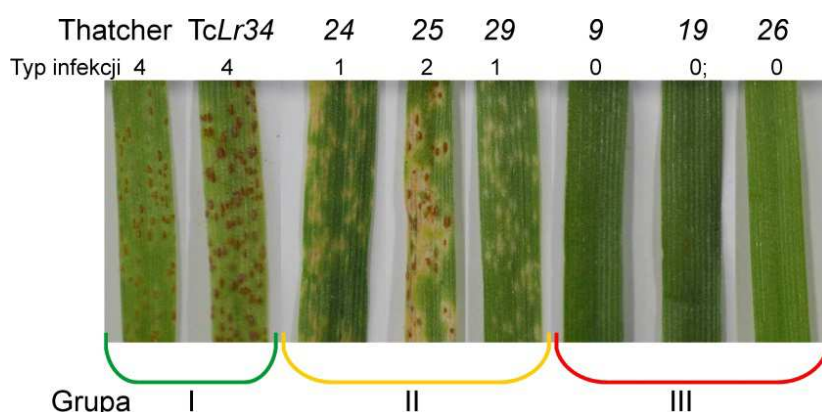
Krótką sekwencją nukleotydową tego klonu została użyta do przeszukiwania bazy NCBI, a uzyskane sekwencje DNA umożliwiły złożenie kontigu, którego sekwencja była eksperymentalnie weryfikowana w kolejnych etapach pracy: amplifikacje, klonowania i sekwencjonowania określonych fragmentów. Wykonano reakcję 5' RACE oraz 3' RACE. Analizy bioinformatyczne wykonano przy wykorzystaniu sekwencji dostępnych w bazie genomu pszenicy, a otrzymaną sekwencję nukleotydową weryfikowano poprzez szereg amplifikacji z wykorzystaniem cDNA jako matrycy. Otrzymaną sekwencję porównano

z sekwencjami nukleotydowymi i aminokwasowymi czterech kinaz WAK pszenicznych i siedmioma kinazami *Arabidopsis*.

3. Wyniki i dyskusja

3.1. Podział wybranych linii pszenicy po inokulacji *Puccinia triticina* na trzy grupy

Zbadano typ infekcji u wybranych izogenicznych linii pszenicy w celu określenia ich odporności/podatności na używany izolat *P. triticina*. Uzyskane wyniki pozwoliły podzielić badane linie na trzy grupy ze względu na typ infekcji: grupa I linie podatne (typ infekcji 4) Thatcher i TcLr34, grupa II linie średnio odporne (typ infekcji 1 i 2) TcLr24, TcLr25 i TcLr29 oraz grupa III linie odporne (typ infekcji 0 oraz 0;) TcLr9, TcLr19 i TcLr26 (ryc. 1).



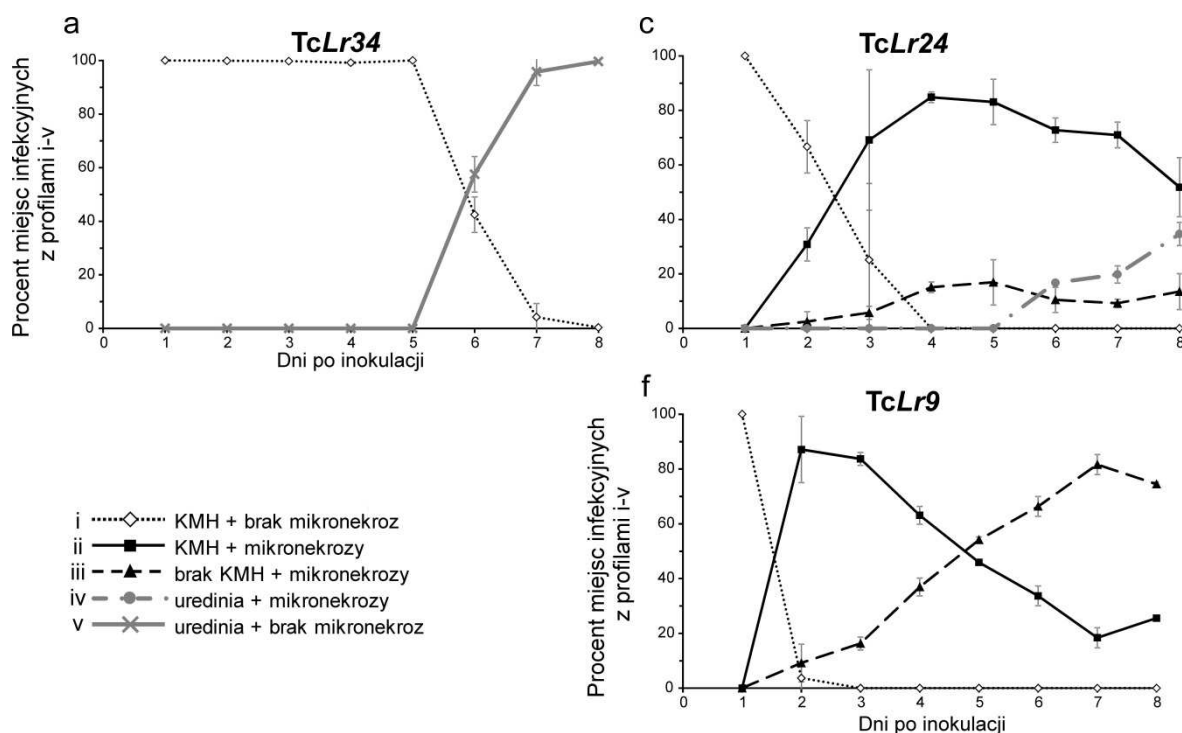
Ryc. 1. Objawy infekcji wybranych linii izogenicznych i odmiany Thatcher po inokulacji zarodnikami rdzy brunatnej.

3.2. Przebieg interakcji pszenicy – *Puccinia triticina*

3.2.1. Profile interakcji pszenica – *P. triticina*

Zbadano przebieg interakcji roślina – patogen w celu znalezienia różnic pomiędzy roślinami podatnymi, średnio odpornymi i odpornymi w rozwoju patogena i reakcji rośliny. Trzy wyróżnione wcześniej grupy cechowały różne profile interakcji patogen – gospodarz. U badanych grup występowały różnice w ilości komórek macierzystych haustorium (KMH) i obecności mikronekroz wokół miejsca infekcyjnego. Rodzaje interakcji roślina – patogen opisano za pomocą pięciu profili: (i) KMH bez mikronekroz, (ii) KMH i mikronekrozy, (iii) mikronekrozy bez KMH, (iv) uredinia z mikronekrozami

oraz (v) uredinia bez mikronekroz. U podatnych linii grupy I Thatcher i *TcLr34* (ryc. 2a) obserwowano liczne KMH w miejscu infekcji (profil i) oraz uredinia (profil v). W tej grupie nie obserwowano mikronekroz. Mikronekrozy występowały u roślin z grupy II i III. Jedną z reakcji roślin, umożliwiającą efektywną odporność na patogena, jest reakcja nadwrażliwości. Jest to indukowana śmierć komórek rośliny leżących w bliskim sąsiedztwie patogena (Bolton i in. 2008). Blokowanie rozwoju rdzy w efekcie reakcji nadwrażliwości opisano w odmianach pszenicy zawierających różne geny oporności *Lr* (Bender i in. 2000, Wang i in. 2013). W roślinach grupy II *TcLr24*, *TcLr25* i *TcLr29* (ryc. 2c) obserwowano mikronekrozy w miejscach infekcji (profil ii, iii, iv). U linii najbardziej odpornych *TcLr9*, *TcLr19* i *TcLr26* (grupa III) (ryc. 2f) mikronekrozy występowały zawsze w miejscach infekcji (profil ii, iii), jednak w kolejnych dniach po inokulacji struktury patogena (KMH) przestały być widoczne (profil iii). Ten profil interakcji świadczy o wysokiej skuteczności procesów powodujących zahamowanie rozwoju patogena. Opisane profile interakcji patogen – gospodarz, graficznie przedstawione na rycinie 2, charakteryzują trzy wcześniej opisane grupy odporności (ryc. 1).



Ryc. 2. Udział miejsc infekcyjnych pięciu profili interakcji pszenicy i rdzy brunatnej po barwieniu calcofluor white. Wykresy zawierają odchylenia standardowe z trzech powtórzeń biologicznych. Rycina zawiera po jednym wykresie linii z każdej grupy, pełna rycina znajduje się w pracy doktorskiej na stronie 69.

3.2.2. Odkładanie kalozy i lignin w miejscu infekcji

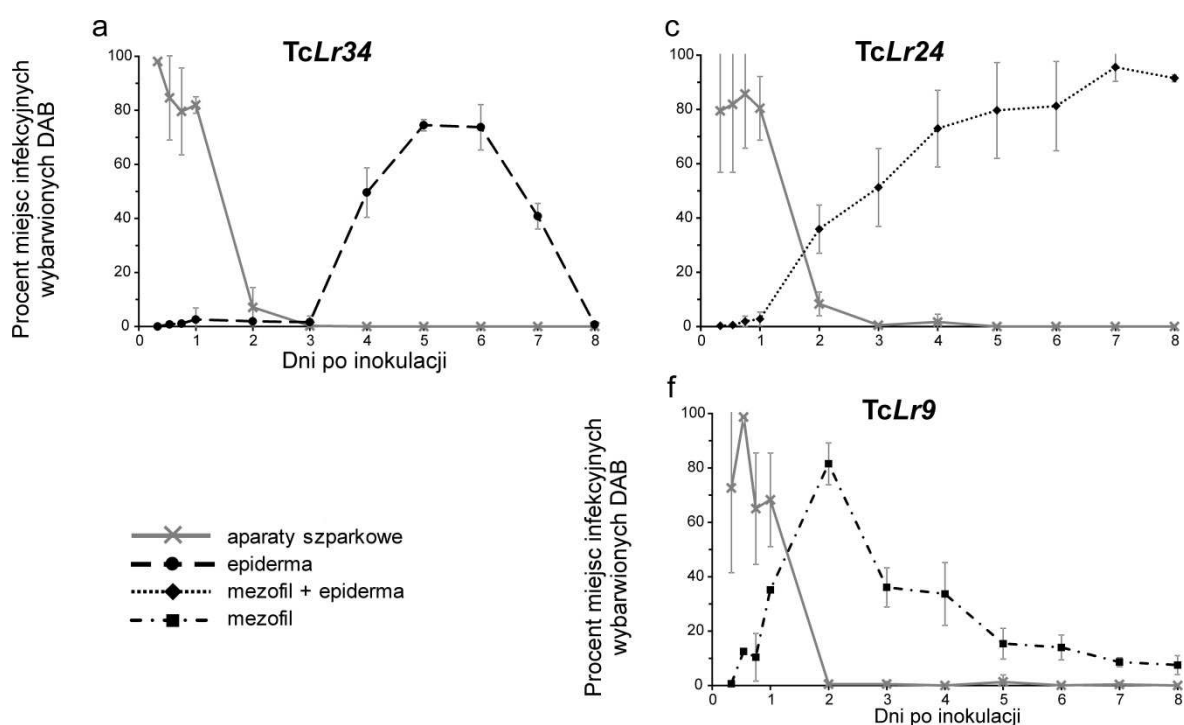
Wytwarzanie kalozy w roślinach jest jednym z mechanizmów odporności podstawowej, dlatego sprawdzono czy kaloza jest odkładana w badanych układach roślina – patogen. Zaobserwowano odkładanie kalozy w aparatach szparkowych i mezofilu u wszystkich linii, także podatnych, co było skorelowane z akumulacją nadtlenu wodoru. Wskazuje to na udział reaktywnej formy tlenu w odkładaniu kalozy i jest zgodne z wynikami Cheng i współpracowników (2014). U roślin średnio odpornych (grupa II) kalozy było więcej jak u roślin podatnych (grupa I). U roślin najbardziej odpornych (grupa III) kalozy było stosunkowo najmniej, co mogło wynikać ze względnie szybkiego blokowania rozwoju patogena.

Lignifikacja, obok reakcji nadwrażliwości, jest uznana za ważny mechanizm odporności na rdze (Bhuiyan i in. 2009). Odkładanie lignin zachodziło u roślin średnio odpornych (grupa II) i odpornych (grupa III) i było skorelowane z występowaniem mikronekroz u tych linii. Korelacja ta jest zrozumiała, ponieważ w obydwu procesach (tj. mikronekrotycznym i lignifikacji) niezbędny jest udział nadtlenu wodoru (Almagro i in. 2009).

3.2.3. Akumulacja nadtlenu wodoru w miejscu infekcji

Akumulacja nadtlenu wodoru jest jedną z pierwszych reakcji roślin na infekcję. Nadtlenek wodoru pełni szereg funkcji w roślinnej odporności, ma właściwości antymikrobiologiczne, jest cząsteczką sygnałową, pośrednikiem w formowaniu roślinnych barier ściany komórkowej oraz induktorem śmierci komórkowej (Borden i Higgins 2002). Podczas interakcji pszenica – *P. triticina* nadtlenek wodoru najpierw był akumulowany w aparatach szparkowych, a następnie w komórkach mezofilu i epidermy. Akumulacja H₂O₂ w aparatach szparkowych, na których rozwijały się appresoria, była obserwowana zarówno w roślinach podanych jak i odpornych. Wytwarzanie reaktywnych form tlenu w tym miejscu może być spowodowane przez ciśnienie wytwarzane przez appresoria na powierzchnię komórek aparatu szparkowego podobnie jak opisane przez Gus-Mayer i współpracowników (1998) indukowanie wytwarzania nadtlenu wodoru pod wpływem bodźca mechanicznego.

W kolejnych dniach H_2O_2 był akumulowany w komórkach mezofilu i epidermy sąsiadujących ze strukturami patogena. Czas i dynamika tej fazy akumulacji H_2O_2 były skorelowane ze skutecznością odporności. Rośliny reagujące szybką akumulacją H_2O_2 w mezofilu najczęściej wykazywały również silną odporność na patogena (rośliny odporne grupa III, ryc. 3f), natomiast późniejsza akumulacja nadtlenu wodoru była obserwowana u roślin średnio odpornych (grupa II, ryc. 3c). U linii podatnych z I grupy (ryc. 3a) H_2O_2 był obserwowany jedynie wokół tworzących się uredyniów. Wzór akumulacji H_2O_2 jest skorelowany ze wzorem reakcji nadwrażliwości. Jest to zgodne z wiedzą, że nadtlenek wodoru jest cząsteczką regulatorową aktywującą określone reakcje oporności, w tym reakcję nadwrażliwości (Shetty i in. 2008).



Ryc. 3. Udział miejsc infekcyjnych z wybarwionym, za pomocą DAB, nadtleniem wodoru u roślin po inokulacji zarodnikami rdzy brunatnej. Rycina zawiera po jednym wykresie linii z każdej grupy, pełna rycina znajduje się w pracy doktorskiej strona 78.

3.3. Badania udziału wybranych enzymów w akumulacji nadtlenu wodoru

Nadtlenek wodoru jest wytwarzany w reakcjach katalizowanych przez różne enzymy. W pracy badano udział oksydaz NADPH, peroksydaz, oksydazy diaminowej i oksydazy poliaminowej, wykorzystano do tego celu specyficzne inhibitory.

Uzyskane wyniki pokazują, że akumulacja nadtlenu wodoru w miejscu infekcji jest warunkowana u większości linii przez więcej niż jeden enzym. W liniach podatnych

i jednej linii średnio odpornej (grupa I oraz linia grupy II - TcLr24) proces ten zależał od aktywności peroksydaz, u linii TcLr19, TcLr25 i TcLr29 zależał od peroksydaz i oksydazy diaminowej. U TcLr9 akumulacja H₂O₂ była warunkowana przez peroksydazy, oksydazę diaminową i oksydazę poliaminową, natomiast u TcLr26 zależała od aktywności oksydazy NADPH oraz oksydazy diaminowej.

Wyniki te są zgodne z danymi literaturowymi wskazującymi na zaangażowanie wszystkich czterech badanych enzymów na wytwarzanie nadtlenu wodoru i odporność (Borden i Higgins 2002, Cowley i Walters 2002, Asthir i in. 2004, Bindschedler i in. 2006). Nowym elementem jest wykazanie, że w różnych kombinacjach patogen - linia izogeniczna dominują różne enzymy wybuchu oksydacyjnego. Wyniki te świadczą o potencjalnie różnych mechanizmach obronnych aktywowanych przez różne geny *Lr*.

3.4. Analiza ekspresji peroksydaz oraz oksydaz NADPH

Przedstawione powyżej wyniki wskazują, że skuteczność odporności zależy od reakcji nadwrażliwości (obserwowanej jako mikronekrozy) a induktorem i ważnym regulatorem tego procesu jest H₂O₂. Z kolei procesy wytwarzania nadtlenu wodoru są katalizowane przez peroksydazy, oksydazy NADPH, oksydazę diaminową i oksydazę poliaminową. Z tego względu zdecydowano sprawdzić, czy ekspresja genów kodujących te enzymy jest indukowana po inokulacji. Do analizy ekspresji wybrano cztery geny pszenicy kodujące peroksydazy klasy III i dwa geny kodujące oksydazy NADPH.

Uzyskane wzory ekspresji tych genów wykazują charakterystyczną dwufazowość bardzo podobną do dwufazowego profilu akumulacji H₂O₂. Pierwszy wzrost ekspresji genów wszystkich czterech badanych peroksydaz (*TaPrx103*, *TaPrx107*, *TaPrx108* i *TaPrx112*) i oksydazy NADPH – *RbohD* był obserwowany u wszystkich badanych roślin oraz był silnie skorelowany z akumulacją nadtlenu wodoru w aparatach szparkowych u wszystkich roślin oraz w mezofilu roślin odpornych grupy III (ryc. 3). Drugi wzrost ekspresji został zaobserwowany u podatnej Thatcher (grupa I) dla peroksydazy *TaPrx107* oraz oksydaz *TaRbohD* i *TaRbohF*, u roślin średnio odpornych (grupa II) dla peroksydazy *TaPrx107* oraz obu badanych oksydaz NADPH, a także peroksydazy *TaPrx103* tylko dla linii TcLr24 i był skorelowany z akumulacją nadtlenu wodoru wokół tworzących się uredyniów (ryc. 3a,c). U roślin odpornych (grupa III) drugi wzrost ekspresji został zaobserwowany tylko dla peroksydaz *TaPrx103*, *TaPrx108* i *TaPrx112* i był skorelowany z akumulacją nadtlenu wodoru w mezofilu (ryc. 3f).

Ponadto dla oceny wpływu ekspresji genów na procesy reakcji na infekcję wprowadzono nowy parametr – kumulatywny współczynnik transkrypcji (CVTR), który pozwalał uwzględnić zarówno względną ilość transkryptu jak i okres indukcji. Najwyższe wartości CVTR uzyskano dla genów dwóch peroksydaz *TaPrx108* i *TaPrx112*, co jest zgodne z wynikami opisanymi dla ortologów tych genów u *Triticum monococcum*, ryżu i owsa indukowanych różnymi patogenami (Simonetti i in. 2009). Oznaczono całkowite CVTR dla poszczególnych linii, będące sumą CVTR wszystkich badanych peroksydaz i oksydaz NADPH. Uzyskane wartości były najwyższe dla linii odpornych (6897 dla *TcLr9* i 8371 dla *TcLr26*), niższe dla linii średnio odpornych (3577 dla *TcLr24* i 3435 dla *TcLr25*) oraz najniższe dla podatnej Thatcher (2060). Uzyskane wyniki potwierdzają rolę peroksydaz i oksydaz NADPH w generowaniu nadtlenu wodoru. Jednocześnie wartości współczynnika CVTR mogą być potencjalnym wyznacznikiem efektywności odporności.

3.5. Analiza ekspresji klonów SSH

W celu identyfikowania genów biorących udział w odporności skonstruowano bibliotekę SSH pszenicy. Biblioteka ta jest zbiorem klonów cDNA reprezentujących transkrypty, które są silnie regulowane pod wpływem infekcji. W naszych badaniach identyfikowano transkrypty różniące podatną odmianę Thatcher od odpornej linii *TcLr9* po inokulacji zarodnikami *Puccinia triticina*. 247 klonów cDNA (z otrzymanych 793) było potencjalnie zaangażowanych w reakcję pszenicy na infekcję. Szczegółowo zbadano wzór ekspresji 8 klonów, a dla 6 z nich różnice w ekspresji pomiędzy liniami okazały się statystycznie istotne. We wszystkich analizowanych klonach wartość CVTR była wyższa u linii odpornej w porównaniu do podatnej Thatcher.

Klon JG968955, reprezentował gen kodujący receptor z domeną typu LRR typową dla większości białek odporności R. Białko to może pełnić funkcje zarówno w odporności rasowo-specyficznej, jak również w odporności podstawowej (Belkhadir i in. 2004, Dodds i Rathjen 2010). Wzrost ekspresji tego klonu był większy u linii odpornej, co potwierdzają wartości CVTR. Indukcja we wczesnych godzinach po inokulacji wskazuje na potencjalną rolę w rozpoznawaniu patogena.

W pracy badano ekspresję czterech przypuszczalnych kinaz. Pierwszą reprezentuje klon JG968944 (kinaza serynowo-treoninowa), który u *TcLr9* ulegał indukcji w porównaniu do Thatcher. Pozostałe trzy klony (JG968933, JG969003 i JG968951) reprezentują kinazy związane ze ścianą komórkową WAK. Znane są dowody wskazujące

na bezpośredni udział WAK w odporności (Zuo i in. 2015). Wszystkie trzy klony WAK były indukowane pod wpływem patogena.

Ekspresję klonu JG968933 badano w podatnej Thatcher i czterech liniach *Lr* (średnio odpornych i odpornych). U Thatcher ekspresja tego klonu charakteryzowała się najniższym poziomem (ryc. 4a). U linii średnio odpornych został zaobserwowany wzrost ekspresji z maksimum 3 dpi (ryc. 4b, c). Najwyższy wzrost ekspresji zaobserwowano u linii silnie odpornych (ryc. 4d, e). Profile ekspresji dla klonu JG968933 są skorelowane z poziomem odporności. Tendencję tą potwierdza wartość CVTR, która jest najniższa dla podatnej a najwyższa dla odpornych roślin. Uzyskano sekwencję kodującą o długości 2473 pz, którą zdeponowano w bazie NCBI pod numerem KR815340. Przeprowadzona analiza bioinformatyczna uzyskanej sekwencji kodującej klonu KR815340 (JG968933) jednoznacznie wskazuje, że jest to kinaza WAK, która zawiera domenę wiążącą wapń, co może świadczyć o funkcji w transdukcji sygnału podczas kontaktu z patogenem, a to z kolei może powodować aktywację reakcji obronnych takich jak reakcja nadwrażliwości (Yin i in. 2015). Jony wapnia mogą także odgrywać rolę w regulacji enzymów generujących reaktywne formy tlenu takich jak RbohD i RbohF (Kimura i in. 2012), których ekspresję wcześniej badano.

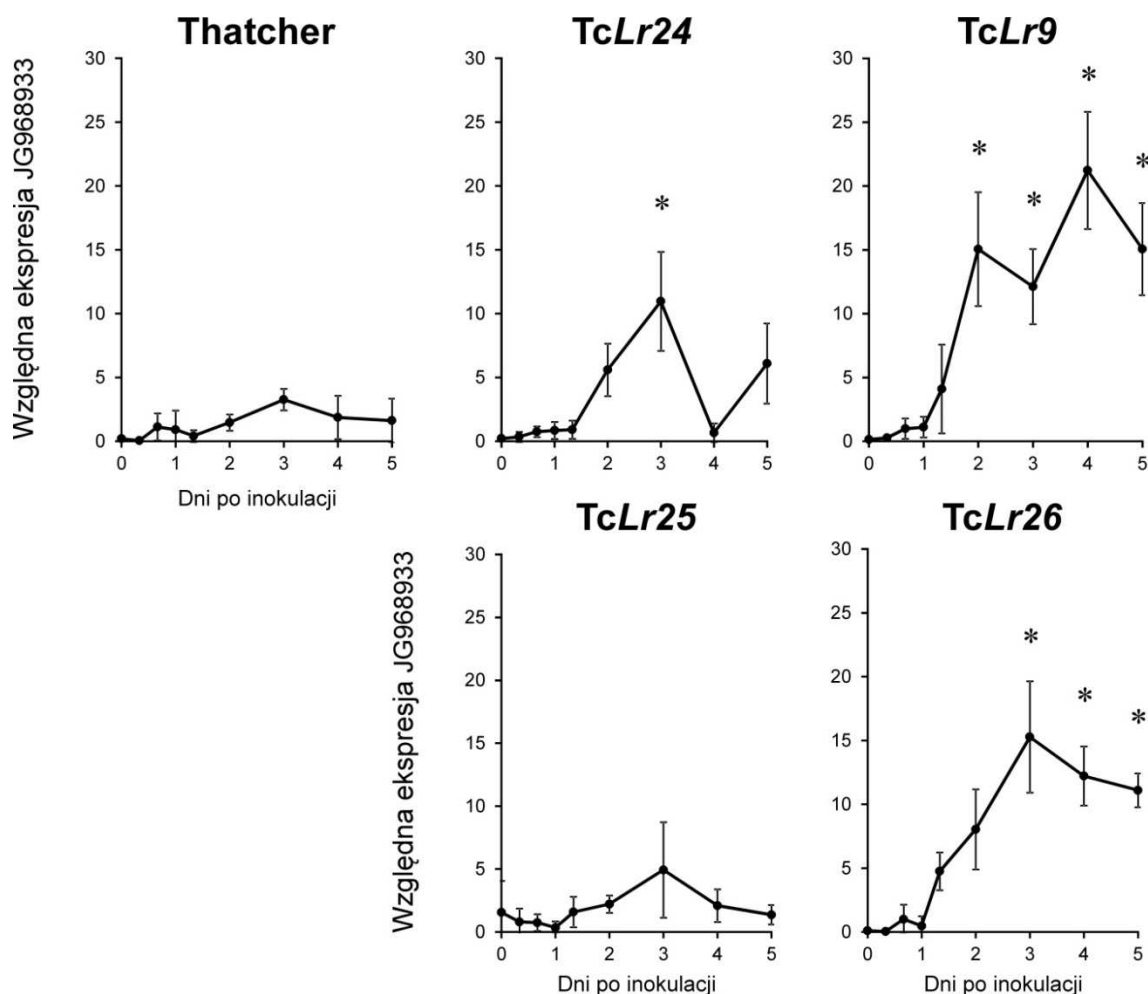
Jeden z analizowanych klonów JG968925 przypuszczalnie kodujący białko wiążące wapń ulegał silniejszej indukcji we wczesnych godzinach po inokulacji u linii odpornej *TcLr9*, w porównaniu do rośliny podatnej Thatcher, co wskazuje na jego prawdopodobną funkcję w reakcji na patogena.

Kolejny klon JG968969 reprezentuje transkrypt genu kodującego przypuszczalnie białko 14-3-3. Białka te działają jako wewnątrzkomórkowe cząsteczki sygnałowe i biorą udział w regulacji wytwarzania reaktywnych form tlenu poprzez bezpośrednie oddziaływanie z Rboh (oksydazy NADPH) (Elmayan i in. 2007). Profil ekspresji badanego klonu 14-3-3 (JG968969) charakteryzuje się silną indukcją w *TcLr9*, w porównaniu do Thatcher, co potwierdza jego potencjalne zaangażowanie w odporność na rdzę.

Ekspresja klonu JG968934, reprezentującego cDNA oksydazy wybuchu tlenowego (Rboh), jest silnie indukowana we wczesnych godzinach po inokulacji patogenem, a u linii odpornej pozostaje wyższa. Oksydazy NADPH (Rboh) są jednymi z szeregu enzymów generujących nadtlenek wodoru, który jest niezbędny w reakcjach odporności, co zostało już wcześniej dokładnie omówione.

Wyniki te wskazują, że następujące geny: receptor z domeną LRR (JG968955), kinaza białkowa (JG968944), dwie kinazy WAK (KR815340/JG968933, JG969003),

białko sygnałne wiążące wapń (JG968925) i białko 14-3-3 (JG968969) uczestniczą w odporności pszenicy warunkowanej przez gen *Lr9*.



Ryc. 4. Względny poziom ekspresji klonu JG968933 (KR815340) (kinazy związanej ze ścianą komórkową) w czasie u pszenicy po inokulacji zarodnikami rdzy brunatnej. Ekspresję klonów obliczano względem genu 18SrRNA [$\times 10^{-6}$]. Wykresy zawierają średnie z trzech powtórzeń biologicznych z odchyleniem standardowym. Oznaczenie * $p < 0.05$ dla testu analiza wariancji (ANOVA) i $p < 0,05$ dla testu post-hoc Tukeya każdej badanej linii w porównaniu do Thatcher. Wynik testu ANOVA $p = 1,11 \times 10^{-16}$

4. Wnioski

1. Następująca charakterystyka interakcji: mała liczba komórek macierzystych haustorium, szybka akumulacja nadtlenu wodoru w mezofilu oraz szybkie pojawienie się reakcji nekrotycznej jest wyznacznikiem wysokiej odporności pszenicy na rdzę brunatną.

2. Autofluorescencja obserwowana w liściu w bliskim sąsiedztwie struktur patogena jest indykatorem obecności mikronekroz.
3. Akumulacja nadtlenu wodoru w aparatach szparkowych oraz odkładanie kalozy w aparatach szparkowych i mezofilu, obserwowane u roślin podatnych i odpornych, są reakcją pszenicy na infekcję rdzą brunatną jednak te procesy nie są istotnymi elementami odporności.
4. W badanym systemie patogen – gospodarz trzy następujące procesy: odkładanie lignin, akumulacja nadtlenu wodoru w mezofilu oraz reakcja mikronekrotyczna są ważnymi komponentami mechanizmu odporności.
5. Wzory ekspresji peroksydaz i oksydaz NADPH, skorelowane z przebiegiem akumulacji nadtlenu wodoru, wskazują na udział tych enzymów w akumulacji nadtlenu wodoru i odporności.
6. Użycie specyficznych inhibitorów jest odpowiednią metodą ustalenia roli określonych enzymów w procesie akumulacji nadtlenu wodoru w czasie infekcji.
7. Akumulacja nadtlenu wodoru w pszenicy w czasie infekcji jest zależna od peroksydaz, oksydaz NADPH (Rboh), oksydazy diaminowej i oksydazy poliaminowej. Jednak względny udział tych enzymów jest różny w zależności od obecności określonego genu *Lr*.
8. Wzór ekspresji klonu JG968933 (*TaWAK*) wskazuje, że gen ten jest silnie zaangażowany w odpowiedź pszenicy na infekcję rdzą brunatną.
9. Wzór ekspresji sześciu z ośmiu badanych genów reprezentowanych przez klony SSH (JG968933, JG969003, JG968955, JG968944, JG968925 i JG968969) u rośliny odpornej w porównaniu do rośliny podatnej wskazuje na ich potencjalny udział w reakcji odporności.
10. Analiza ekspresji i analiza bioinformatyczna klonów SSH wskazuje na ich udział w odpowiedzi na infekcję oraz funkcję w transdukcji sygnałów (kinazy związane ze ścianą komórkową i białko sygnałowe wiążące wapń), wybuchu oksydacyjnym i reakcjach mikronekrotycznych (oksydaza Rboh) oraz sygnalingu (białko 14-3-3 i receptor LRR).
11. Wartość kumulatywnego współczynnika transkrypcji (CVTR) może być miarą udziału określonego genu lub grupy genów w badanym procesie w tym udziału tych genów w reakcji odporności.

Spis literatury

- Almagro L, Gomez Ros LV, Belchi-Navarro S, Bru R, Ros Barcelo A, Pedreno MA (2009). Class III peroxidases in plant defence reactions. *J Exp Bot* 60: 377-390.
- Asthir B, Spoor W, Duffus CM (2004). Involvement of polyamines, diamine oxidase and polyamine oxidase in resistance of barley to *Blumeria graminis* f. sp. hordei. *Euphytica* 136: 307-312.
- Belkhadir Y, Subramaniam R, Dangl JL (2004). Plant disease resistance protein signaling: NBS-LRR proteins and their partners. *Curr Opin Plant Biol* 7: 391-399.
- Bender CM, Pretorius ZA, Kloppers FJ, Spies JJ (2000). Histopathology of leaf rust infection and development in wheat genotypes containing Lr12 and Lr13. *Journal of Phytopathology-Phytopathologische Zeitschrift* 148: 65-76.
- Bhuiyan NH, Selvaraj G, Wei YD, King J (2009). Gene expression profiling and silencing reveal that monolignol biosynthesis plays a critical role in penetration defence in wheat against powdery mildew invasion. *J Exp Bot* 60: 509-521.
- Bianchi M, Polticelli F, Ascenzi P, Botta M, Federico R, Mariottini P, Cona A (2006). Inhibition of polyamine and spermine oxidases by polyamine analogues. *FEBS J* 273: 1115-1123.
- Bindschedler LV, Dewdney J, Blee KA, Stone JM, Asai T, Plotnikov J, Denoux C, Hayes T, Gerrish C, Davies DR, Ausubel FM, Bolwell GP (2006). Peroxidase-dependent apoplastic oxidative burst in *Arabidopsis* required for pathogen resistance. *Plant J* 47: 851-863.
- Bolton MD, Kolmer JA, Garvin DF (2008). Wheat leaf rust caused by *Puccinia triticina*. *Mol Plant Pathol* 9: 563-575.
- Borden S, Higgins VJ (2002). Hydrogen peroxide plays a critical role in the defence response of tomato to *Cladosporium fulvum*. *Physiological and Molecular Plant Pathology* 61: 227-236.
- Cheng Y, Yao J, Zhang H, Huang L, Kang Z (2014). Cytological and molecular analysis of nonhost resistance in rice to wheat powdery mildew and leaf rust pathogens. *Protoplasma*.
- Cowley T, Walters DR (2002). Polyamine metabolism in barley reacting hypersensitively to the powdery mildew fungus *Blumeria graminis* f. sp. hordei. *Plant Cell and Environment* 25: 461-468.
- Dodds PN, Rathjen JP (2010). Plant immunity: towards an integrated view of plant-pathogen interactions. *Nature Reviews Genetics* 11: 539-548.
- Duveiller E, Singh RP, Nicol JM (2007). The challenges of maintaining wheat productivity: pests, diseases, and potential epidemics. *Euphytica* 157: 417-430.
- Elmayan T, Fromentin J, Riondet C, Alcaraz G, Blein JP, Simon-Plas F (2007). Regulation of reactive oxygen species production by a 14-3-3 protein in elicited tobacco cells. *Plant Cell Environ* 30: 722-732.
- Grant JJ, Yun BW, Loake GJ (2000). Oxidative burst and cognate redox signalling reported by luciferase imaging: identification of a signal network that functions independently of ethylene, SA and Me-JA but is dependent on MAPKK activity. *Plant Journal* 24: 569-582.
- Gus-Mayer S, Naton B, Hahlbrock K, Schmelzer E (1998). Local mechanical stimulation induces components of the pathogen defense response in parsley. *Proc Natl Acad Sci U S A* 95: 8398-8403.
- Kimura S, Kaya H, Kawarazaki T, Hiraoka G, Senzaki E, Michikawa M, Kuchitsu K (2012). Protein phosphorylation is a prerequisite for the Ca²⁺-dependent activation of *Arabidopsis* NADPH oxidases and may function as a trigger for the positive feedback regulation of Ca²⁺ and reactive oxygen species. *Biochimica Et Biophysica Acta-Molecular Cell Research* 1823: 398-405.
- Niks RE, Rubiales D (2002). Potentially durable resistance mechanisms in plants to specialised fungal pathogens. *Euphytica* 124: 201-216.

- Orczyk W, Dmochowska-Boguta M, Czembor HJ, Nadolska-Orczyk A (2010). Spatiotemporal patterns of oxidative burst and micronecrosis in resistance of wheat to brown rust infection. *Plant Pathology* 59: 567-575.
- Park RF, Mohler V, Nazari K, Singh D (2014). Characterisation and mapping of gene Lr73 conferring seedling resistance to *Puccinia triticina* in common wheat. *Theoretical and Applied Genetics* 127: 2041-2049.
- Rea G, Metoui O, Infantino A, Federico R, Angelini R (2002). Copper amine oxidase expression in defense responses to wounding and *Ascochyta rabiei* invasion. *Plant Physiol* 128: 865-875.
- Scofield SR, Huang L, Brandt AS, Gill BS (2005). Development of a virus-induced gene-silencing system for hexaploid wheat and its use in functional analysis of the Lr21-mediated leaf rust resistance pathway. *Plant Physiol* 138: 2165-2173.
- Sherwood RT, Vance CP (1976). Histochemistry of Papillae Formed in Reed Canarygrass Leaves in Response to Noninfecting Pathogenic Fungi. *Phytopathology* 66: 503-510.
- Shetty NP, Jørgensen HJL, Jensen JD, Collinge DB, Shetty HS (2008). Roles of reactive oxygen species in interactions between plants and pathogens. *European Journal of Plant Pathology* 121: 267-280.
- Simonetti E, Veronico P, Melillo MT, Delibes A, Andres MF, Lopez-Brana I (2009). Analysis of Class III Peroxidase Genes Expressed in Roots of Resistant and Susceptible Wheat Lines Infected by *Heterodera avenae*. *Molecular Plant-Microbe Interactions* 22: 1081-1092.
- Wang C-F, Huang L-L, Buchenauer H, Han Q-M, Zhang H-C, Kang Z-S (2007). Histochemical studies on the accumulation of reactive oxygen species (O₂⁻ and H₂O₂) in the incompatible and compatible interaction of wheat—*Puccinia striiformis* f. sp. *tritici*. *Physiological and Molecular Plant Pathology* 71: 230-239.
- Wang X, McCallum BD, Fetch T, Bakkeren G, Marais GF, Saville BJ (2013). Comparative microscopic and molecular analysis of Thatcher near-isogenic lines with wheat leaf rust resistance genes Lr2a, Lr3, LrB or Lr9 upon challenge with different *Puccinia triticina* races. *Plant Pathology* 62: 698-707.
- Yin SN, Wang CF, Jiao M, Li F, Han QM, Huang LL, Zhang HC, Kang ZS (2015). Subcellular localization of calcium in the incompatible and compatible interactions of wheat and *Puccinia striiformis* f. sp. *tritici*. *Protoplasma* 252: 103-116.
- Zuo W, Chao Q, Zhang N, Ye J, Tan G, Li B, Xing Y, Zhang B, Liu H, Fengler KA, Zhao J, Zhao X, Chen Y, Lai J, Yan J, Xu M (2015). A maize wall-associated kinase confers quantitative resistance to head smut. *Nat Genet* 47: 151-157.