

Mgr Marta Dmochowska-Boguta  
Doktorantka

Radzików, 2015-12-01

Instytut Hodowli i Aklimatyzacji Roślin – Państwowy Instytut Badawczy  
Zakład Inżynierii Genetycznej w Radzikowie

Plant Breeding and Acclimatizations Institute - National Research Institute  
Department of Genetic Engineering Radzików

### **Rozprawa doktorska**

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

dla uzyskania stopnia doktora nauk rolniczych w dziedzinie: nauki rolnicze, dyscyplinie: agronomia  
*Promotor: prof. dr hab. Waclaw Orczyk*

### **Streszczenie**

Pszenica (*Triticum aestivum* L.) jest zbożem uprawianym na całym świecie, którego 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 grzyb *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 była analiza 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 wybarwiając 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 azydku sodu jako inhibitora peroksydaz wskazuje na udział tej grupy enzymów w akumulacji H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> u siedmiu z ośmiu testowanych linii (TcLr9, TcLr19, TcLr24, TcLr25, TcLr29, TcLr34 oraz Thatcher). Infiltracja liści difenylem jodoniowym – inhibitora 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 nadtlenu wodoru w linii TcLr9. Analiza ekspresji peroksydaz i oksydaz NADPH wykazała ich udział w akumulacji nadtlenu 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.

#### **PhD thesis:**

**“Analysis of selected genetic and biochemical-physiological factors in wheat (*Triticum aestivum* L.) resistance to leaf rust (*Puccinia triticina*)”.**

to obtain the degree of PhD in agricultural sciences, field of knowledge: Agricultural Science,  
discipline: agronomy

*Doctoral supervisor: prof. dr hab. Wacław Orczyk*

#### **Summary**

Wheat (*Triticum aestivum* L.) is a cereal crop cultivated worldwide. Global production ranks wheat on the third place after maize and rice. Wheat breeding is focused on high yield, pathogen resistance and abiotic stress tolerance. One of the most important diseases of wheat is leaf rust or brown rust which is caused by the fungus *Puccinia triticina*. The leaf rust

epidemics may cause yield losses up to 50%. The most important method of prevention of this disease is to use resistant cultivars. Understanding the mechanisms involved in resistance is important for breeding strategies and crop improvement.

The aim of the study was to analyse the early stages of wheat – *Puccinia triticina* interaction. This included: pathogen development, micronecrotic reaction of host cells, hydrogen peroxide accumulation and the determination of its source, callose deposition and lignification, and analysis of expression of selected genes and SSH clones.

Observations of disease symptoms allowed for the separation of the tested lines into three groups: susceptible (Thatcher and *TcLr34*), intermediate resistant (*TcLr24*, *TcLr25* and *TcLr29*) and highly resistant (*TcLr9*, *TcLr19* and *TcLr26*). The following components of host – pathogen interaction were assessed by microscopic observations of stained leaf samples: pathogen structures were visualized by staining with calcofluor white, host cell necrosis was specifically stained with Evans blue, accumulated hydrogen peroxide was stained with DAB, callose depositions by aniline blue and cell wall lignification by phloroglucinol. The results showed that low number of pathogen structures i.e. haustorium mother cells, rapid hydrogen peroxide accumulation in mesophyll and rapid micronecrotic reaction characterized lines highly resistant to brown rust. Thus these features were considered as indicators of the efficient resistance. The lignification found in infection sites was observed in both intermediate resistant and highly resistant plants. This process, considered as a component of basic resistance is correlated with the accumulation of hydrogen peroxide in mesophyll and with micronecrotic reaction. Callose deposition was observed in resistant as well as susceptible plants, so presumably it was not crucial for this type of resistance. The expression of genes encoding peroxidases and NADPH oxidases combined with the results obtained with the use of enzyme-specific inhibitors revealed which enzymes were responsible for the production of hydrogen peroxide. The use of sodium azide, which is an inhibitor of peroxidases, indicated that this enzyme was involved in the hydrogen peroxide accumulation in seven lines (*TcLr9*, *TcLr19*, *TcLr24*, *TcLr25*, *TcLr29*, *TcLr34* and Thatcher). The use of diphenylene iodonium, an inhibitor of NADPH oxidase, indicated the role of this enzyme *TcLr9*. The use of 2-bromoethylamine, an inhibitor of diamine oxidase, proved the role of this enzyme in intermediate resistant (*TcLr25* and *TcLr29*) and highly resistant (*TcLr9*, *TcLr19* and *TcLr26*) lines. The use of 1,12-diaminododecane, an inhibitor of polyamine oxidases, showed that the enzymes were active in *TcLr9*. The analysis of expression of peroxidases and NADPH oxidases indicated that these genes were involved in production of hydrogen peroxide and their expression patterns are correlated with microscopic observation. The expression patterns of the six from the eight tested SSH clones indicated their participation in

the resistance of wheat to brown rust. The bioinformatics analysis of the full coding sequence of JG968933 clone has shown that the gene encodes wall associated kinase (*TaWAK*). Expression pattern of the *TaWAK* gene as well as the strong induction during rust infection strongly indicates its role in wheat resistance.

*Marta Dmochowska-Boguta*

