

Łubin w skolistny jest roliną uprawianą, cenioną jako bogate źródło białka roślinnego w żywieniu zwierząt i ludzi. Dzięki symbiozie z bakteriami brodawkowatymi łubiny posiadają możliwość wiązania azotu atmosferycznego i wzbogacania gleby w związki azotowe. Do najważniejszych biologicznych zagrożeń łubinu w skolistnego należą choroby grzybowe, w tym antraknoza i brunatna plamistość łądź. Antraknoza łubinów wywoływana jest przez grzyb patogeniczny *Colletotrichum lupini*. Choroba ta została po raz pierwszy zaobserwowana w 1912 roku na łubinie białym w Brazylii, a w 1939 roku dotarła do południowo-wschodnich stanów USA, przyczyniając się do znacznych strat w uprawach łubinu w skolistnego. W 1982 r. wykryto antraknozę łubinu białego we Francji, w 1983 r. na Ukrainie, w 1988 r. w Rosji, a w latach 1995-1997 także na łubinie w skolistnym w Polsce, Niemczech, Austrii, Portugalii, Białorusi i Wielkiej Brytanii. Wkrótce choroba ta objęła wszystkie kraje, w których uprawia się łubiny. Antraknoza jest aktualnie uważana za najpoważniejszy chorób łubinów w wielu krajach Europy, Ameryki Północnej i Ameryki Południowej. Wśród odmian uprawnych i linii jest bardzo podatna na antraknozę. Jako bardzo odporne sklasyfikowano: australijskie Wonga, Tanjil, 83A:476, niemieckie Bo7212, białoruskie BGB-6 i Myrtan, za mało odporne Kalya, Coromup i Mandelup. Wonga, Tanjil i 83A:476 zawierają ten sam dominujący gen odporności, nazwany Lanr1, Kalya ma inny gen dominujący, Lanr2, a Coromup i Mandelup ten mają inny gen, AnMan. Dla tych 3 genów opracowano blisko 300 markerów genetycznych, których użycie w pracach hodowlanych potwierdziło istnienie różel odporności. Odporność w liniach z Danii i Białorusi jest warunkowana obecnością co najmniej 3 z 4 genów, zwanych Rcl1, Rcl2, Rcl3, i Rcl4.

Brunatna plamistość łądź wywoływana jest przez grzyb patogeniczny *Diaporthe toxica*. Ta choroba została po raz pierwszy zaobserwowana na łubinie w Niemczech w roku 1880. Pierwsze wystąpienie brunatnej plamistości łądź w Polsce zostało zanotowane we wczesnych latach pięćdziesiątych XX wieku na łubinie różym. W kolejnych latach objawy choroby obserwowano od czasu do czasu na łubinach uprawianych na terenie Europy, Afryki, Australii i USA. Obecnie *D. toxica* stwierdzono także na nasionach łubinu w skolistnego pozyskanych na terenie Polski. Jako odporne uznano odmiany Merrit, Gungurru, Yorrel, Warrah, Belara, Moonah, Quilnock, Myallie, Kalya, Tallerack, Tanjil i Wonga, za bardzo odporne - linię 75A:258. Odmiana Merrit pochodzi z krzyżówki odmiany Illyarrie z linii z Hiszpanii, niesie gen odporności Phr2, za linię 75A:258 z krzyżówki odmiany Marri z linii z Maroka, niesie gen Phr1. Odmiany Tanjil i Wonga zawierają gen PhtJR.

Celem projektu jest identyfikacja genów łubinu w skolistnego *Lupinus angustifolius* L. biorących udział w rozpoznaniu infekcji i uruchomieniu odpowiedzi obronnej przeciwko dwóm grzybom atakującym roślinę: *C. lupini* i *D. toxica*. Założeniem jest także, że podstawą odpowiedzi odpornościowej przeciwko *C. lupini* jest wczesne rozpoznanie aktywności grzyba i efektywne przekazanie informacji do dalszych ogniw szlaku sygnalizacyjnego. W związku z tym geny odporności na antraknozę, Lanr1, Lanr2, AnMan, Rcl1, Rcl2, Rcl3 i Rcl4, uczestniczą w rozpoznaniu specyficznych cząstek pochodzących od grzyba i w uruchomieniu odpowiedzi indukowanej przez nie odpowiedzi odpornościowej. Z kolei odpowiedź obronna rośliny przeciwko *D. toxica* pojawia się późno, w utajonej fazie infekcji, po przełamaniu pierwszej linii obrony w postaci ochronnej warstwy na powierzchni rośliny i skutkuje spowolnieniem rozwoju objawów chorobowych. Zatem geny odporności na brunatną plamistość łądź, Phr1, Phr2 i PhtJR, uczestniczą w rozpoznaniu cząstek powstających w wyniku uszkodzenia organizmu rośliny i dopiero na tej podstawie uruchamiają tzw. odporność podstawową.

W projekcie będzie wykonana ocena dostarczonych izolatów grzybów *D. toxica* i *C. lupini* przy użyciu metod z pogranicza mikrobiologii i genetyki molekularnej. Następnie przeprowadzona zostanie ocena odporności/podatności linii *L. angustifolius* na antraknozę i brunatną plamistość łądź w warunkach temperatury i wilgotności optymalnych dla rozwoju grzybów. Linie do badań odpornościowych będą wybrane na podstawie danych literaturowych, wcześniejszych doświadczeń i wyników testów przewidzianych w projekcie. W celu uzupełnienia tych wstępnych analiz, będzie oceniona zmienność sekwencji markerów DNA sprzyjających z domniemanymi genami odporności na antraknozę i brunatną plamistość łądź w kolekcji łubinu w skolistnego. Aby sprawdzić, jakie geny uczestniczą w rozpoznaniu grzyba i uruchomieniu odpowiedzi odpornościowej, zostanie założone doświadczenie, w którym rośliny będą porażone grzybami *D. toxica* i *C. lupini*. Liczne pobrane z tego eksperymentu będą następnie analizowane pod kątem ekspresji genów, w porównaniu do linii kontrolnych, które nie będą porażone. Będzie wykorzystana nowoczesna technologia, sekwencjonowanie nowej generacji RNA, czyli tzw. RNA-seq, co pozwoli na identyfikację wielu - nawet kilkudziesięciu tysięcy - genów aktywnych w trakcie doświadczenia. Procedura składania tego typu sekwencji jest skomplikowana i wymaga stosowania specjalistycznych programów. Pracownicy Instytutu Genetyki Roślin Polskiej Akademii Nauk mają już doświadczenie w planowaniu tego typu eksperymentów, oczekiwanej liczbie odczytów jak również dostarczonych metodach bioinformatycznych, a także są w posiadaniu na bieżąco aktualizowanego zintegrowanego systemu komputerowego do analiz dużej liczby sekwencji. Do przewidywania położenia i sekwencji genów zostaną wykorzystane programy umożliwiający odgadnięcie pozycji genów na podstawie charakterystycznych cech sekwencji oraz na podstawie podobieństwa do innych opisanych już genów. Do tego celu będą użyte sekwencje z modelowej rośliny strączkowej, soi, *Glycine max*. Poznane zostaną procesy biologiczne i funkcje, jakie w organizmie rośliny pełni nowo zidentyfikowane geny. Będzie analizowana także struktura samych genów, a więc obecność typowych domen białkowych. W liniach różniących się poziomem odporności będzie analizowany również stopień zmienności sekwencji - czy mutacje w sekwencji mogą wpływać na przyłączenie się białek regulujących aktywność genu lub na samą funkcjonalność genu poprzez ewentualne zmiany sekwencji kodowanego przez białka. Genom łubinu w skolistnego jest zsekwencjonowany, ale tylko częściowo - do postaci tysięcy krótkich fragmentów, z których większość nie jest jeszcze przypisana do mapy genetycznej tego gatunku. Geny kandydujące, które zostaną znalezione w takich niezapomnianych odcinkach, będą nanoszone na mapę przy użyciu metod genetyki molekularnej, poprzez tworzenie markerów na podstawie sekwencji DNA i analizy zmienności sekwencji w populacji mapującej, czyli w liniach uzyskanych z krzyżówki między skrajnie różniącymi się liniami rodzicielskimi. Udział wybranych genów w interakcjach między roślinami a grzybami będzie badany bardziej szczegółowo, poprzez analizę aktywności genu w różnych terminach, reprezentujących różne etapy rozwoju porażenia. Dla genów o istotnym znaczeniu w rozwoju odpowiedzi odpornościowej zostanie przeprowadzona analiza pokrewieństwa ewolucyjnego, przy użyciu dwóch metod o różnym wnioskowaniu - bayesowskim i maksymalnego podobieństwa / maksymalnej parsymonii. Metoda maksymalnej parsymonii zakłada istnienie minimalnej liczby zmian ewolucyjnych, za wnioskowanie bayesowskie opiera się na twierdzeniu teorii prawdopodobieństwa, w którym prawdopodobieństwo warunkowe poszczególnych zdarzeń. Do tych analiz będą użyte sekwencje genomów łubinu w skolistnego i pozostałych zsekwencjonowanych dziesięciu gatunków roślin strączkowych. Zostanie również wykonana analiza porównawcza sekwencji, mająca na celu sprawdzenie, czy regiony kodujące te geny u dziesięciu gatunków strączkowych

zachowały, pomimo skomplikowanego przebiegu zmian ewolucyjnych, podobn struktur , wyra on identyczn kolejno ci i orientacj szeregu genów. Wyniki b d przedstawione w postaci wykresów liniowych i kołowych przy u yciu dedykowanego oprogramowania.

Podsumowuj c, w projekcie b d u yte najnowsze zasoby i narz dzia z dziedziny genetyki molekularnej do wszechstronnej analizy oddziaływania ro lina-patogen, przy u yciu łubinu w skolistnego jako modelu. Pionierskim podej ciem b dzie wykorzystanie technologii wysokoprzepustowego sekwencjonowania nowej generacji, co pozwoli na poznanie genów aktywowanych w niewielkiej liczbie kopii, a tak e modyfikacji struktury i sekwencji. Wyniki analiz rzuc wiatło na mechanizmy molekularne kontroluj ce odporno ro lin. Realizacja projektu pozwoli zrozumie zwi zki pomi dzy dwoma głównymi szlakami odpowiadaj cymi za odporno ro lin na grzyby, a tak e wyja ni rol poszczególnych ogniw tych szlaków w rozwoju reakcji odporno ciowej. Wnioski wynikaj ce z realizacji projektu b d opublikowane w wiod cych czasopismach mi dzynarodowych z danej dziedziny, o wysokim współczynniku cytowa . B d tak e prezentowane na konferencjach mi dzynarodowych i krajowych. Projekt dostarczy unikatowe zasoby sekwencyjne, b d ce w kr gu zainteresowania naukowców zajmuj cych si genetyk molekularn i fizjologi ro lin. Dane te b d udost pnione w specjalistycznych archiwach na publicznie dost pnych serwerach internetowych. Co prawda wyniki projektu nie b d miały bezpo redniego zastosowania w hodowli łubinu w skolistnego, ale dostarcz wiedzy o genetycznych ródlach odporno ci, co umo liwi w przyszło ci efektywne dobieranie komponentów do krzy owa przy produkcji nowych odmian.