

Zadanie 96 Badania cytologicznych i biochemicznych mechanizmów odporności roślin w patosystemach pomidor-*Phytophthora infestans* oraz ogórek-*Pseudoperonospora cubensis*.

W roku 2015 badania prowadzono w ramach trzech tematów badawczych.

1. Oznaczenia wybranych parametrów fizjologiczno – biochemicznych w reakcji roślin na porażenie patogenami w patosystemach: pomidor-*P. infestans* oraz ogórek-*P. cubensis*

Celem badań były: (i) analiza intensywności generowania reaktywnych form tlenu w roślinach na podstawie pomiaru poziomu rodników nadtlenkowego i hydroksylowego, (ii) ocena zmian aktywności enzymów roślinnego układu antyoksydacyjnego oraz obronnego (dysmutazy ponadtlenkowej, oksydazy polifenolowej) metodami spektrofotometrycznymi, (iii) oznaczenie poziomu substancji chroniących przed atakiem patogenów (lignin, fenoli). Dynamikę zmian ww. parametrów określano przed (0 dpi) oraz w po inokulacji patogenami (1 - 4 dpi). Analizy przeprowadzono na 8 populacjach pomidora i 5 liniach ogórka o określonym uprzednio poziomie odporności/podatności na przedmiotowe patogeny. Uwzględniając zależność pomiędzy poziomem odporności a wiekiem rośliny, populacje pomidora analizowano w trzech fazach rozwojowych (4-, 6- i 8-tygodniowa rozsada), rośliny ogórka natomiast inokulowano w fazie 2-3 liści.

U ogórka twierdzono niewielki istotny wzrost zawartości rodnika hydroksylowego pomiędzy 0 a 4dpi *P. cubensis*. Dodatkowo, zaobserwowano wzrost aktywności oksydazy polifenolowej oraz spadek zawartości wolnych fenoli i lignin, co sugeruje ich odkładanie w strukturach obronnych (papille). W pomidorze największe zmiany zaobserwowano u 8-tygodniowych roślin, wykazujących w pełni rozwiniętą odporność na *P. infestans*. Największą dynamikę zmian w odpowiedzi na *P. infestans* odnotowano dla zawartości wolnych fenoli oraz lignin. Zawartość wolnych fenoli spadała, a lignin – wzrastała wraz z wydłużaniem okresu inkubacji. Zaobserwowane zmiany podkreślają różnice pomiędzy patosystemami (*P. infestans* po początkowej fazie biotroficznej przechodzi w nekrotroficzną; infekcja *P. cubensis* ma charakter wyłącznie biotroficzny). Wskazują one również na aktywizację obrony przed wnikaniem, jako jeden z ważnych mechanizmów obronnych, niezależnie od obserwowanego makroskopowo poziomu odporności danej populacji.

2. Mikroskopowe analizy patosystemów pomidor-*P. infestans* oraz ogórek-*P. cubensis*

Celem analiz było: (i) testowanie i optymalizacja dostępnych protokołów barwienia mikrotubul (aktyn) w preparatach liści, (ii) weryfikacja zoptymalizowanego protokołu podwójnego barwienia (aktyny i kaloza) na roślinach przed oraz po inokulacji zawiesiną patogena, (iii) ocena przydatności dostępnych protokołów barwienia DCF-DA do linii pomidora i ogórka: przed oraz po inokulacji zawiesiną patogena.

Po przetestowaniu 8 protokołów utrwalania i barwienia próbek liści pomidora i ogórka (rośliny nieinokulowane, 0 dpi), stwierdzono, że pomidor w przeciwieństwie do ogórka, jest dobrym obiektem do analiz aktywności aktywny znakowanej falloidyną z rodaminą. Ogórek wymaga dalszej optymalizacji lub zastosowania dodatkowych etapów, np. trawienia celulazami. Z kolei wstępne wyniki podwójnego barwienia w fazie 4 dpi wskazują na potrzebę systematycznych analiz obu patosystemów w czasie pomiędzy 0 a 5 dpi, przy użyciu najefektywniejszego protokołu. Znakowanie fluorescencyjną sondą DCFDA okazało się wydajnym narzędziem do określania intensywności generowania reaktywnych form tlenu w tkankach badanych populacji ogórka i pomidora. Wstępna analiza porównawcza reakcji roślin na patogeny w obu patosystemach wskazuje, że optymalny czas inkubacji przygotowanej do analiz tkanki wynosi 30 minut. Po tym czasie poziom fluorescencji znakowanego preparatu jest odpowiedni do właściwej interpretacji obrazu. W dużo krótszym czasie po inokulacji ROS były generowane w tkankach ogórka, wolniej natomiast proces ten zachodził w tkankach pomidora. Stwierdzono różnice w intensywności generowania ROS pomiędzy badanymi liniami. W przypadku ogórka, szczególnie u linii podatnych ('Coolgreen', PI 175695) silny poziom fluorescencji w tkankach infekowanych zaobserwowano już po 1 h od inokulacji. Najniższy poziom fluorescencji, a co za tym idzie – nagromadzenia ROS odnotowano u odpornej linii ogórka PI 197088. U pomidora najslabszą fluorescencję znakowanych ROS zaobserwowano u linii LA 716, silniejsze reakcje obserwowano u odmian 'WV700' oraz 'Rumba'.

3. Analiza porównawcza ekspresji (qRT-PCR) wybranych genów w komórkach liści obu gatunków przed inokulacją patogenami.

Celem analiz był dobór starterów oraz optymalizacja profili termicznych qRT-PCR dla transkryptów 20 genów uczestniczących w obronie przed infekcją w roślinach pomidora i ogórka w niezainokulowanych roślinach. Zoptymalizowano i potwierdzono sekwencje w sumie 26 amplikonów (kilka genów o tej samej funkcji w pomidorze) dla 3 populacji pomidora oraz 1 linii ogórka. Przydatność tak zoptymalizowanego zestawu do analiz transkryptomów pomidora i ogórka należy potwierdzić na cDNA z pozostałych linii objętych projektem. Jako komplementarne narzędzie do równoczesnego ilościowego oznaczania namnażania biomasy patogena w tkankach roślinnych, ważna będzie identyfikacja i optymalizacja kilku sekwencji obu agrofagów.