

## **Zadanie 99 Badanie molekularnego mechanizmu odporności na kiłę kapusty (*Plasmodiophora brassicae*) u roślin z rodzaju *Brassica*.**

W roku 2015 badania prowadzono w ramach trzech tematów badawczych.

### **Temat badawczy 1.**

#### Założenie doświadczenia i inokulacja roślin.

Celem tematu było przygotowanie materiału roślinnego, który następnie wykorzystywany będzie w kolejnych tematach badawczych przewidzianych do realizacji w roku 2015. Zadanie obejmowało wybranie i przygotowanie nasion różnych genotypów z rodzaju *Brassica*, przygotowanie podłoża do uprawy roślin, przygotowanie inokulum *Plasmodiophora brassicae*, wysiew nasion oraz ich inokulację. Zgodnie z założeniami uzyskano materiał roślinny do badań, składający się z 7 różnych genotypów z rodziny *Brassicaceae*: 1. *B. rapa* var. *capitata* ECD03 (rzepa); 2. *B. oleracea* var. *capitata* cv. 'Binsachsner' (kapusta głowiasta); 3. *B. oleracea* var. *acephala* subvar. *lacinata* cv. 'Verheul' (jarmuż); 4. *B. oleracea* var. *capitata* cv. 'Kilaton F<sub>1</sub>' (kapusta głowiasta); 5. *B. napus* var. *rapifera* cv. 'Wilhelmsburger' (brukiew); 6. *B. rapa* L. subsp. *pekinensis* cv. 'Bilko F<sub>1</sub>' (kapusta pekińska); 7. *B. napus* L. var. *napus* cv. 'Mendel F<sub>1</sub>' (rzepak). Podczas wysiewu pod każde nasiono aplikowano inokulum patogena otrzymane z porażonych przez *P. brassicae* korzeni kapusty głowiastej odmiany 'Kamienna głowa'. Rośliny inokulowane oraz kontrolne były wykorzystane do przeprowadzenia analiz zaplanowanych w roku 2015.

### **Temat badawczy 2.**

#### Obserwacja mikroskopowa i makroskopowa symptomów choroby oraz testy molekularne na obecność plazmodiów *P. brassicae*.

Celem tematu była mikroskopowa oraz makroskopowa obserwacja symptomów choroby na roślinach, a także wykonanie testów molekularnych na obecność plazmodiów *P. brassicae* w badanym materiale roślinnym oraz w glebie. W roku 2015 przeprowadzono po 105 obserwacji mikro- oraz makroskopowych, a także wykonano 210 testów molekularnych na obecność plazmodiów *P. brassicae* dla materiału roślinnego oraz 42 testy molekularne dla próbek glebowych. Obserwacje mikroskopowe prowadzono po 3-6 dniach od pojawienia się pierwszych korzeni, przez okres 25 dni. Pomimo, że wszystkie badane genotypy są określone jako odporne na kiłę kapusty, w komórkach włóśnikowych korzeni każdego z nich stwierdzono występowanie patogenu. Wystąpiły natomiast znaczące różnice w terminie pojawienia się wykształconych zoosporangiów od momentu wysiania nasion. Najwcześniej obserwowano je u kapusty pekińskiej odmiany 'Bilko', rzepaku odmiany 'Mendel F<sub>1</sub>' i kapusty głowiastej odmiany 'Binsachsner'. Obserwację makroskopową korzeni roślin na obecność symptomów choroby wykonano po 35 dniach od momentu wysiania nasion do kuwet wypełnionych zainokulowanym podłożem. Pomimo, że wszystkie badane genotypy są opisane jako odporne na kiłę kapusty, u niektórych z nich pojawiły się wyraźne objawy choroby. Największe nasilenie objawów zaobserwowano u kapusty głowiastej odmiany 'Binsachsner' oraz jarmużu odmiany 'Verheul'. Testy molekularne na obecność plazmodiów *P. brassicae* miały na celu potwierdzenie tożsamości patogenu i określenie jego ilości w badanych roślinach i w glebie. Zostały one przeprowadzone z wykorzystaniem dwóch metod: zagnieżdżonej PCR (nested-PCR) i ilościowej PCR (real-time PCR). We wszystkich badanych roślinach oraz próbkach podłoża stwierdzono obecność materiału genetycznego *P. brassicae* metodą jakościową zagnieżdżonej PCR. Ilościowe analizy metodą real-time PCR wykazały wysokie stężenia patogenu zarówno w roślinach, jak i w glebie. Oznaczenia ilościowe metodą real-time PCR wykazały znaczne zróżnicowanie stopnia zasiedlenia roślin przez patogen. Najmniejsze zasiedlenie stwierdzono u brukwi odmiany

‘Wilhelmsburger’ (średnio  $4,26 \times 10^7$  zarodników w jednym gramie korzeni), a największe u jarmużu odmiany ‘Verheul’ (średnio  $1,37 \times 10^{10}$  zarodników). Jednakże wystąpienie objawów choroby nie było skorelowane ze stopniem zasiedlenia roślin przez patogen. Np. brukiew odmiany ‘Wilhelmsburger’ oraz kapusta głowiasta odmiany ‘Kilaton F<sub>1</sub>’ w ocenie makroskopowej nie wykazały objawów choroby, pomimo wysokiego stężenia patogenu w korzeniach w granicach:  $3,7 \times 10^7$  -  $3,98 \times 10^8$  zarodników/1g. Wskazuje to, że w roślinach tych nie dochodzi do infekcji wtórnej. Porażenie wszystkich badanych genotypów roślin *Brassica* przez *P. brassicae* wskazuje, że nie są one odporne na kiłę kapusty, lecz wykazują różny poziom tolerancji.

### **Temat badawczy 3.**

#### Przygotowanie materiału roślinnego oraz optymalizacja warunków do analiz molekularnych cDNA-AFLP.

Celem tematu było przygotowanie materiału roślinnego oraz optymalizacja metod wstępnych analiz molekularnych wykonywanych techniką cDNA-AFLP. Wyizolowano materiał genetyczny w postaci RNA z korzeni wysianych roślin kapustowatych. Zoptymalizowano warunki analiz molekularnych cDNA-AFLP wykonywanych na materiale genetycznym pochodzącym z roślin kapustowatych. Do analiz molekularnych pobrano korzenie roślin inokulowanych *P. brassicae* oraz roślin kontrolnych przygotowanych w Temacie badawczym 1. Próbkę z roślin porażonych przez *P. brassicae* pobrano trzykrotnie (po 5, 15 i 35 dniach od inokulacji), a z roślin kontrolnych (zdrowych) tylko w jednym terminie, w 35. dniu po inokulacji. Optymalizacja metod analiz molekularnych wykonywanych techniką cDNA-AFLP obejmowała: ekstrakcję całkowitego RNA, izolację mRNA i jego transkrypcję do cDNA, selektywne trawienie cDNA enzymami restrykcyjnymi oraz optymalizację preselekcyjnej reakcji PCR. Po optymalizacji wyżej wymienionych etapów cDNA-AFLP, analizie poddane zostały wszystkie pobrane próby. Przeprowadzono reakcje różnicującej PCR z użyciem wybranych 50 par starterów dla 7 badanych genotypów: kontroli nieinfekowanej oraz roślin infekowanych pobranych w 3 terminach. Produkty różnicujących reakcji PCR rozdzielano w 6% denaturujących żelach poliakrylamidowych. Następnie żele wybarwiano w azotanie srebra i poddano analizie. Podczas analizy elektroforetogramów produktów AFLP oceniano liczbę prążków (produktów AFLP), ich wielkość oraz zróżnicowanie pomiędzy roślinami kontrolnymi nieinfekowanymi, a infekowanymi *Plasmodiophora brassicae*. Z testowanych 50 par starterów AFLP, 42 pary pozwalały na amplifikowanie fragmentów cDNA u badanych genotypów i analizę markerów AFLP. Analizie poddano ponad 3400 produktów amplifikacji – fragmentów cDNA, które ulegały zróżnicowanej ekspresji u badanych genotypów – roślin zdrowych oraz infekowanych. Wstępna analiza wykazała, że u roślin infekowanych *Plasmodiophora brassicae* 40,8% produktów cDNA-AFLP ulegało nadekspresji, a 40,3% było wyciszonych, w porównaniu do roślin kontrolnych. Największą ogólną liczbę amplifikowanych fragmentów cDNA-AFLP otrzymano dla dwóch badanych genotypów: brukwi odmiany ‘Wilhelmsburger’ oraz dla kapusty pekińskiej odmiany ‘Bilko F<sub>1</sub>’. Największą liczbę produktów amplifikacji AFLP specyficznych jedynie dla roślin infekowanych *Plasmodiophora brassicae* otrzymano u odmiany kapusty głowiastej ‘Kilaton’ oraz u brukwi ‘Wilhelmsburger’ – u tych roślin nadekspresji ulegało odpowiednio 44,2% oraz 43,9% genów. Największą liczbę genów, które ulegały wyciszeniu pod wpływem infekcji patogenem wykazano dla roślin kapusty głowiastej ‘Binsachsner’ oraz dla jarmużu odmiany ‘Verheul’ – odpowiednio 48,9% oraz 47,3% analizowanych genów.

Podsumowując, wstępne analizy wykazały, że infekcja *Plasmodiophora brassicae* spowodowała znaczne zmiany w transkryptomie badanych roślin kapustowatych. W zależności od gatunku i odmiany, nadekspresji uległo od 34,8% do blisko 44,2% genów, a wyciszeniu od 36,3% do 48,9%, w porównaniu do roślin zdrowych. Zmiany w ekspresji mogą po części wynikać z indukcji

reakcji odpornościowych, lecz także ze stresu wywołanego infekcją i rozwojem choroby. Należy przy tym wziąć pod uwagę, że analizowany mRNA wyizolowany z zainfekowanych roślin składa się z transkryptomu rośliny, lecz także i patogenu. Rozróżnienie pochodzenia transkryptów podlegających zróżnicowanej ekspresji i określenie funkcji kodowanych przez nie białek będzie wymagało ich zsekwencjonowania i porównania z sekwencjami zgromadzonymi w bazach danych, co będzie przedmiotem kolejnych etapów badań.