

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

W roku 2016 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) analizy 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, polioksydazy fenolowej, poligalakturonazy, dysmutazy ponadtlenkowej, katalazy, inhibitorów proteaz serynowych), (iii) oznaczenie poziomu substancji chroniących przed atakiem patogenów (lignin, fenoli, kalozy).

Dynamikę zmian ww. parametrów określano przed oraz w trakcie infekcji patogenami (0 - 5 dpi). Analizy przeprowadzono na 8 liniach pomidora (*S. lycopersicum*, *S. pimpinellifolium*, *S. habrochaites*, *S. pennelli*) oraz 5 liniach ogórka o znanych, określonych uprzednio poziomach odporności/podatności na przedmiotowe patogeny. Ze względu na odporność uzależnioną od wieku rośliny, linie pomidora inokulowano w trzech fazach rozwojowych: rośliny 4-, 6- i 8-tygodniowe. Ogórki inokulowano w fazie 2-3 liści.

Spośród analizowanych reaktywnych form tlenu, w ogórku stwierdzono niewielki istotny wzrost zawartości rodnika hydroksylowego od 0 do 5 dpi *P. cubensis*; przy czym dynamika zmian była wyższa dla linii odpornych w porównaniu z kontrolnymi liniami podatnymi. Porównanie aktywności polioksydazy fenolowej w porównaniu z zawartością wolnych fenoli, wskazuje na odkładanie polifenoli w ścianach komórkowych, jako ważny mechanizm obronny. Ta obserwacja dotyczyła szczególnie linii odpornych. Wzrastające aktywności poligalakturonazy oraz dysmutazy ponadtlenkowej w trakcie symulowanego ataku patogena wskazują na udział tych enzymów w odpowiedzi na infekcję, szczególnie u linii odpornych.

W pomidorze zaobserwowano zmiany w czasie dla większości badanych parametrów, przeważnie w roślinach 6-tygodniowych i 8-tygodniowych, co wydaje się potwierdzać makroskopowe obserwacje nabywania przez rośliny odporności na *P. infestans* z wiekiem. Niewielki istotny wzrost zawartości obu badanych aktywnych form tlenu w czasie, zaobserwowano w roślinach 6-tygodniowych i starszych, szczególnie w obu badanych formach *S. habrochaites*. Aktywności polioksydazy fenolowej, poligalakturonazy oraz dysmutazy ponadtlenkowej wykazały wzrostowe trendy w czasie, w roślinach 6-tygodniowych i starszych. Szczególnie wyraźnie widoczna była ta zależność dla poligalakturonazy, dla 6-tygodniowych linii odpornych. Rośliny 4-tygodniowe wykazały tendencje wzrostowe tylko dla zawartości lignin, wskazując na ten mechanizm obrony przed wnikaniem, jako jedyny dostępny w tej fazie. Formy 6- i 8-tygodniowe charakteryzowały się wzrastającą zawartością fenoli, co może wskazywać na możliwość odkładania polifenoli w ścianie komórkowej, jako mechanizm obrony chemicznej przed patogenem. Tegoroczne obserwacje wskazują na różnice z aktywowanej obrony pomidora przed *P. infestans* w zależności od fazy rozwojowej: młodsze rośliny głównie wzmacniają ścianę komórkową przed wnikaniem, a starsze aktywują obronę chemiczną (produkcja aktywnych form tlenu, odkładanie polifenoli, itp.).

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

Celem analiz było: (i) użycie barwienia DCF-DA do linii pomidora i ogórka przed oraz po inokulacji zawiesiną patogena, (ii) użycie zoptymalizowanego protokołu podwójnego barwienia (aktywna i kaloza) na roślinach przed oraz po inokulacji zawiesiną patogena.

Barwienie DCFDA potwierdziło udział aktywnych form tlenu w odpowiedzi na infekcje w obu badanych patosystemach. W ogórku stwierdzono wzrastający ich udział w czasie, z jedynie nieznacznym zwiększeniem ich zawartości w liniach odpornych w porównaniu z podatnymi. W pomidorze, z racji testowania roślin w 3 fazach rozwojowych, uzyskany obraz był bardziej złożony. Generalnie wzrastająca z wiekiem roślin zawartość aktywnych form tlenu wykazywała różnice specyficzne gatunkowo. Linie *S. pimpinellifolium* wykazały wyraźny wzrost z wiekiem, szczególnie widoczny dla roślin 8-tygodniowych. Intensywny wzrost aktywnych form tlenu zaobserwowano dla 6-tygodniowej odpornej linii *S. habrochaites*, podczas gdy trend dla linii podatnej był dużo łagodniejszy. *S. pennelli* wykazało wzrost zawartości w późniejszych fazach eksperymentu, szczególnie w starszych roślinach, a 'Rumba' zareagowała wyraźnym wzrostem jedynie w najstarszej badanej fazie. Analizy konfokalne wskazały uczestnictwo wiązek aktywności w odpowiedzi komórkowej (odkładanie papilli) w obu badanych patosystemach. Ten mechanizm nie podlegał intensyfikacji z wiekiem roślin pomidora, ani nie wykazał istotnych różnic między formami podatnymi a odpornymi obu badanych gatunków roślin warzywnych, wskazując na powszechność tej reakcji na infekcje patogenami.

### 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 niezainokulowanych roślinach pomidora i ogórka. Optymalizowano również transkrypty detekcyjne patogenów: *P. infestans* (5) oraz *P. cubensis* (3). Zsekwencjonowane amplikony wszystkich badanych linii ogórka, po identyfikacji (BLAST) zestawiono bio-informatycznie. Wyniki wskazały istnienie dwóch wewnątrznie spokrewnionych grup, w każdej jednak znalazła się jedna kontrolna forma podatna. Wskazuje to na poprawny dobór form do projektu. Planuje się podobne zestawienie dla amplikonów pomidora po ich kompletnym zsekwencjonowaniu.

### **Informacja o publikacji wyników w 2016 roku**

Wyniki uzyskane w roku 2015 i 2016 zaprezentowano podczas międzynarodowej konferencji XI<sup>th</sup> Eucarpia Meeting on Genetics and Breeding of Cucurbitaceae 2016, Warszawa, 24-28 lipca 2016:

1. Marcin Nowicki, Urszula Kłosińska, Wojciech Szczechura, Elżbieta U. Kozik. 2016. Transcriptome analyses of the cucumber - *Pseudoperonospora cubensis* pathosystem. In: Kozik E.U., Paris H.S. (eds) Program and Abstracts of Cucurbitaceae 2016. Warsaw: 27. (Poster + streszczenie w materiałach z konferencji – Załącznik 1).
2. Marcin Nowicki, Urszula Kłosińska, Wojciech Szczechura, Monika Markiewicz, Iwona Sowik, Lech Michalczuk, Elżbieta U. Kozik. 2016. Cellular and biochemical mechanisms of cucumber Resistance Against *Pseudoperonospora cubensis*. In: Kozik E.U., Paris H.S. (eds) Proceedings of Cucurbitaceae 2016. Warsaw: 128-131. (Prezentacja ustna + recenzowana publikacja w Proceedings z konferencji - Załącznik 2).



Marcin Nowicki<sup>®</sup>  
Urszula Kłosińska  
Wojciech Szczuchura  
Elżbieta U. Kozik

## Transcriptome analyses of the cucumber-*Pseudoperonospora cubensis* pathosystem

### ABSTRACT

Due to significant yearly losses of the Cucurbitaceae crops in Poland and worldwide generated by the downy mildew-causing oomycete *Pseudoperonospora cubensis*, we undertook molecular analyses of the cucumber transcriptome. We constructed a qRT-PCR panel of over 20 genes with likely role in response to *P. cubensis* infection based on the literature searches and EST/protein similarities with *Arabidopsis thaliana* and tomato. The panel included genes from several PR (Pathogenesis-Related) families, Me-JA and SA biosynthetic pathways, general defense genes (chitinase synthase; lipoglycanase; VPE, etc.), and several pathogen ESTs, normalized against *CsEF1a*. This qRT-PCR analytic panel was verified on five cucumber cultivars with varying responses to *P. cubensis*, after optimization for  $T_m$ , primer concentration, and number of cycles. Amplicons detecting pathogen sequences were optimized on RNA preparations at 4 dpi. Resultant sequences were aligned to estimate genetic distance between the cucumber lines in relation to their *P. cubensis* response. This work provides proof-of-concept for this analytic panel, to be used for concluding which pathways/genes play a role in *P. cubensis* reaction. This analytic panel may well be employed for other related studies.

### INTRODUCTION

Downy mildew caused by *Pseudoperonospora cubensis* is a major threat to cucumbers grown in Poland and worldwide. Although we succeeded in finding new sources of the pathogen resistance (1), and elucidating the inheritance of the trait (2,3), many other aspects of these materials remain to be explained (4,5). Then, plant breeders and growers alike may benefit from the detailed knowledge to faster deploy the resistance into the commercial pool of cucumber varieties.

Few studies so far addressed the transcriptome of the cucumber-*P. cubensis* pathosystem. In particular, the research of the Day lab with their RNA-Seq allowed for significant insights into the pathogen modes of infection (6,10,11). On the other hand, information is missing regarding important transcriptomic reactions of cucumber, using easy-to-access methods.

Continuing our research on the resistant cultivars, and aiming to complement our biochemical and microscopic studies (4,5), we undertook the transcriptome analyses of this pathosystem. Based on the resources developed for other important models (*Arabidopsis*, tomato), we constructed a panel for RT-PCR of over 20 genes potentially involved in response to *P. cubensis*. This panel covers the pathogenesis-related (PR) genes, Me-JA and SA synthesizing genes, common defence-related genes (chitinase synthase, VPE, etc.), and pathogen-specific sequences. We present here proof-of-concept data on this analytic panel.

### MATERIALS AND METHODS

We based our analyses on total RNA isolated from leaves of *P. cubensis*-resistant cucumber cultivars ('Ames 2354', PI 197088, PI 330628) and susceptible controls (PI 175695, 'Coolgreen'), inoculated with an aggressive local *P. cubensis* isolate. After ensuring RNA quality and concentration, it was reverse-transcribed onto cDNA, and used in the qPCR (LightCycler1 480). The cDNA from (un)inoculated leaves was used to optimize the cycling parameters of the analytic panel and as the baseline ( $T_m$ , primer concentration, number of cycles), while cDNA from the leaves at 4 dpi with *P. cubensis* served for pathogen-specific cDNA.

Genes for the analytic panel were chosen based on the general literature of plant pathology (fungi- and oomycete-derived diseases; 7,8,9,11). Respective genes sequences, unless reported previously, were recovered from the protein-blast of their *Arabidopsis* and tomato homologues (NCBI BLAST). Primers were constructed using Primer3 with default settings, except for  $T_m$  changed to be close to 60 °C.

We used *CsEF1a* (7) as respective cucumber house-keeping gene. We used 2 biological and 3 technical replicates, and present the means of the data; the SDs were negligible and were omitted here for the clarity of presentation.

### RESULTS AND DISCUSSION

Isolated totalRNA showed good quality for further downstream applications (measured spectrophotometrically and visualized on EtBr agarose gels). Pathogen-inoculated cucumber plants showed typical downy mildew reactions, as per their resistance levels, described previously (1-3) (Figure 1).



Figure 1. Leaves of *P. cubensis*-susceptible cucumber 'Coolgreen' with progress of the infection symptoms (before inoculation and 4 dpi), sampled for the study. The 4 dpi stage (right) showed symptoms typical for early downy mildew, later reaching sporulation on the bottom side of the leaves.

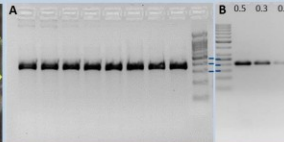


Figure 2. Optimization of  $T_m$  (A) and primer conc. (B) for *PcaCT* transcript. Annealing temperatures of 55 °C (left) to 65 °C (right) were used for 40 cycles, on cDNA from 4 dpi 'Coolgreen' leaves. Primers were used in denoted concentration [ $\mu$ M] for 35 cycles. Blue lines indicate ladder DNA for 500 bp, 400 bp, and 300 bp (from top to bottom).

We optimized three crucial parameters of each of the panel's amplicons: annealing temperature ( $T_m$ ), primer concentration, and number of cycles (Figure 2). Resultant specific qRT-PCR products (Figure 3) from each cucumber line undergoing the study, were sequenced to confirm the amplified genes' identities. The same procedure was used for pathogen-specific amplicons (*Actin-A*, *ITS*, *PscRLR1*). Sequences obtained from each cultivar and for each amplicon in the panel were then verified using NCBI BLAST (expressed sequences database) (Figure 4).

From the chosen analytic panel, we succeeded in confirming and verifying the sequences of all target genes on the cucumber cDNA (Figures 3 and 4). Overall, the genes in the panel represent 6 PR families (8 genes in total); pathways for Me-JA and SA synthesis (5 and 3 genes, respectively), 3 defence-related genes, and 3 pathogen-specific genes.

### Acknowledgements

This study was funded by the project PBR96 of the Biological Progress series (Polish Ministry of Agriculture and Rural Development) "Studies of cytological and biochemical mechanisms of plant resistance in the pathosystems tomato-*Phytophthora infestans* and cucumber-*Pseudoperonospora cubensis*". Authors thank Mrs. Ewa Matysiek for technical help and dr. Jan Sobolewski (InHort) for early access to local pathogen source.

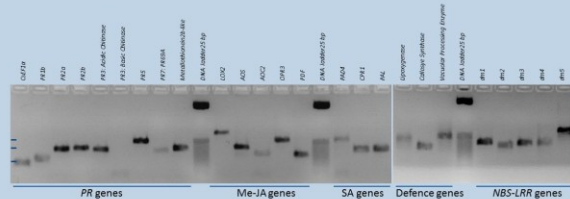


Figure 3. Gel picture of the PCR products of the analytic panel. Cucumber cDNA from the uninoculated leaves of 'Coolgreen' was used to cycling under optimized conditions ( $T_m$ , [MgCl<sub>2</sub>], cycle number). Genes are grouped according to the function. Lines on left-hand side denote (from the top) 300 bp, 200 bp, and 100 bp of the DNA ladder.

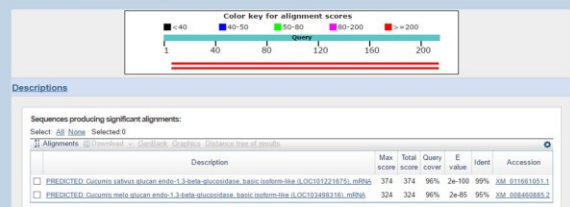


Figure 4. Typical result for sequencing data on qRT-PCR panel. Here, consensus sequence of 'Ames 2354' *P34:Bs3Cit* was analyzed by NCBI BLAST (RNA database), resulting bits only for cucumber.

Compiled cucumber sequences from the analytical qRT-PCR panel were aligned using ClustalW (default settings). Resulting neighbor-tree dendrogram from the analyzed transcripts indicates rather close relationship among lines of this study, clustered into two groups (Figure 5). Notably, each group contains a susceptible control line, which stresses that our cucumber cultivars panel was correctly assembled.

Taking into account only few extensive cucumber qRT-PCR studies (7-9, 12), our work could be used as an economically-feasible alternative to RNASeq transcriptome analyses (6,10,11). Moreover, this analytical panel may be used in numerous related studies of the species, focusing on molecular aspects of resistance against biotic and abiotic stresses alike, due to its covering genes from respectively important pathways. With its application and confirmation in our *P. cubensis* research, we hope to highlight important molecular events in resistant vs. susceptible cucumber cultivars.

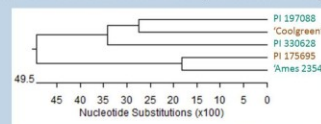


Figure 5. Neighbor-join tree for 5 cucumber cultivars' sequencing data on qRT-PCR panel. *P. cubensis*-susceptible cultivars are marked in brown, and resistant ones in green.

### CONCLUSIONS AND OUTLOOK

1. The chosen amplicons give insight into expression of several functionally diverse, important gene groups in cucumber.
2. Analyses of compiled sequence data from the qRT-PCR panel showed that cucumbers used in this study cluster into two related groups. Each of these groups contained one *P. cubensis*-susceptible cultivar, confirming proper choice of plant material for this study.
3. This analytic panel will broaden the hitherto modest qPCR resources of the species, and may be applied to broad range of studies, as an alternative or in addition to high-throughput sequencing.

### CITED LITERATURE

- [1] Call AD. *et al. Crop Science* 52.2 (2012):577-592.
- [2] Kłosińska U (2013) PhD thesis - Instytut Ogrodnictwa - InHort.pl.
- [3] Kozik EU *et al.* (2013) *Crop Science* 53.1:177-182. Harbor, MI:17-20.
- [4] Nowicki M *et al.* (2016) *Proc EUCARPIA*, oral pres.
- [5] Nowicki M *et al.* (2012) *Veg Crops Res Bull* 77:61-74.
- [6] Savory EA *et al.* (2012) *PLoS One* 7.4:e35796.
- [7] Wan H *et al.* (2010) *Anal Biochem* 399.2:257-261.
- [8] Wang H *et al.* (2010) *Eur J Pl Path* 127.1:125-135.
- [9] Wang Y *et al.* (2014) *Proc Cucurbitaceae, Bay Harbor, MI*:17-20.
- [10] Adhikari BN *et al.* (2012) *PLoS One* 7.4:e34954.
- [11] Burkhardt A & Day B (2016) *PLoS Genome* 9.1.
- [12] Cooper JG (2013) PhD thesis - Virginia Tech, USA.

## Załącznik 2

Nowicki M., Kłosińska U., Szczechura W., Markiewicz M., Sowik I., Michalczuk L., Kozik E.U. 2016. Cellular and biochemical mechanisms of cucumber resistance against *Pseudoperonospora cubensis*. In: Kozik E.U., Paris H.S. (eds) Proceedings of Cucurbitaceae 2016. Warsaw: 128-131.

Publikacja dostępna na stronie:

[www.inhort.pl/files/konferencje\\_2016/cucurbitaceae/Conference%20proceedings%20book.pdf](http://www.inhort.pl/files/konferencje_2016/cucurbitaceae/Conference%20proceedings%20book.pdf)