

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

Celem zadania w roku 2017 była makro- i mikroskopowa analiza rozwoju infekcji u kapusty głowiastej, kapusty pekińskiej, jarmużu, brukwi, rzepy i rzepaku różniących się poziomem i typem odporności na kiłę kapusty; testy molekularne na obecność zarodników *P. brassicae* w korzeniach tych roślin i w glebie; analiza transkryptomów porażonych i zdrowych roślin wybranych genotypów polegająca na re-amplifikacji wybranych różnicujących produktów cDNA-AFLP, ich sekwencjonowaniu i wstępnej analizie homologii oraz analiza ekspresji genów zaangażowanych w reakcje odpornościowe roślin podczas infekcji.

W roku 2017 badania prowadzono w ramach trzech tematów badawczych.

**Temat badawczy 1. Analizy makro- i mikroskopowe rozwoju choroby u badanych genotypów podczas infekcji różnymi patotypami patogena; testy molekularne na obecność zarodników *P. brassicae* w korzeniach roślin i w glebie podczas infekcji.**

Zgodnie planem w roku 2017 wykonano mikroskopową i makroskopową ocenę nasilenia infekcji i symptomów choroby oraz określenie ilości patogena w badanych roślinach i w podłożu przy pomocy testów molekularnych (real-time PCR). Temat został zrealizowany w 100%.

Materiał roślinny do badań stanowiło siedem genotypów roślin 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 F1' (kapusta głowiasta); 5) *B. napus* var. *rapifera* cv. 'Wilhelmsburger' (brukiew); 6) *B. rapa* subsp. *pekinensis* cv. 'Bilko F1' (kapusta pekińska); 7) *B. napus* var. *napus* cv. 'Mendel F1' (rzepak). Inokulum zawierające  $10^8$ /ml zarodników patogena uzyskano poprzez homogenizację korzeni kapusty głowiastej porażonej przez *P. brassicae*. Pasażowanie na wybranych roślinach według metody Williamsa (1966) pozwoliło wyizolować i określić 2 patotypy: Pb9 i Pb3. Inokulum Pb9 wykorzystane zostało do analiz wykonanych w 2017 roku, natomiast inokulum Pb3 będzie wykorzystane do analiz zaplanowanych do realizacji w roku 2018.

Obserwacje makroskopowe rozwoju choroby przeprowadzono na losowo wybranych roślinach. Podczas obserwacji makroskopowych roślin infekowanych *P. brassicae* Pb9 w 10. dniu od wysiania nasion nie obserwowano symptomów choroby na korzeniach. W 20. dniu od wysiania nasion obserwowano pierwsze symptomy choroby – najsilniejsze u brukwi odmiany 'Wilhelmsburger' (średnie porażenie (ŚP) wyniosło 0,3) oraz na pojedynczych korzeniach u kapusty pekińskiej 'Bilko F1' i jarmużu 'Verheul'. W 35 dniu od wysiania nasion obserwowano symptomy choroby u wszystkich badanych genotypów. Największe nasilenie objawów chorobowych w postaci wyrosła zaobserwowano na korzeniach brukwi 'Wilhelmsburger' (ŚP 3,0), rzepaku 'Mendel F1' (ŚP 3,0), kapusty głowiastej 'Kilaton F1' (ŚP 2,1) oraz kapusty pekińskiej 'Bilko F1' (ŚP 2,0), a najmniejsze u rzepy ECD03 (ŚP 0,13).

Ilościowe analizy metodą real-time PCR z zastosowaniem wyznakowanej fluorescencyjnie sondy molekularnej wykazały wysokie stężenie patogena zarówno w korzeniach roślin, jak i w inokulowanym podłożu. W przeliczeniu na liczbę spor, średnia ilość patogena w podłożu inokulowanym przed siewem roślin wynosiła około  $10^7$  w 1 g podłoża we wszystkich kuwetach. W podłożach, w których rosły rzepa ECD03, brukiew 'Wilhelmsburger', jarmuż 'Verheul', kapusta głowiasta 'Kilaton F1', kapusta pekińska 'Bilko F1' oraz rzepak 'Mendel F1' nastąpił wzrost zawartości zarodników *P. brassicae*, natomiast w kuwetach, w których rosły rośliny kapusty głowiastej 'Binsachsner' ilość spor zmalała w porównaniu do ilości początkowej.

Wyniki analizy real-time PCR w korzeniach roślin, wykonanych po upływie 10, 20 i 35 dniach od wysiania nasion wykazały podobne zależności dla wszystkich badanych genotypów. Ilość spor w korzeniach zbieranych po 10 dniach wynosiła od  $1,2 \times 10^5$  do  $2,0 \times 10^7$ . Po 20 dniach od wysiania nasion ilość spor w korzeniach zmalała znacznie u wszystkich badanych genotypów, a po 35 dniach nasion nastąpił znaczny wzrost ilości spor w korzeniach brukwi 'Wilhelmsburger' oraz rzepaku 'Mendel F1', natomiast u rzepy ECD03, jarmużu 'Verheul' oraz kapusty głowiastej 'Kilaton F1', ilość spor uległa zmniejszeniu w stosunku do początkowej ilości.

Obserwacje mikroskopowe rozpoczynano w 4 dniu od wysiewu nasion, a dla odmiany 'Wilhelmsburger' w 10 dniu od wysiania nasion. Największą maksymalną liczbę plazmodiów we włośnikach zaobserwowano u roślin rzepaku 'Mendel F1' (maksymalnie 63 plazmodia na korzeń, średnio 25). Podobnie wysoką, maksymalną i średnią liczbę plazmodiów na korzeń obserwowano u roślin rzepy ECD03. Najmniejszą liczbę plazmodiów obserwowano u jarmużu 'Verheul' (średnio 1,3 plazmodiów na korzeń, a maksymalnie jedynie 5). Najwcześniej, bo już w 4 dniu od wysiania nasion, plazmodia we włośnikach obserwowano u roślin kapusty pekińskiej 'Bilko F1' oraz rzepy ECD03. Najpóźniej – w 10 dniu od wysiania nasion – obserwowano plazmodia we włośnikach kapusty głowiastej 'Binsachsner' oraz brukwi 'Wilhelmsburger'. Średnio największą liczbę plazmodiów w korzeniach włośnikowych obserwowano między 11 a 15 dniem od wysiania nasion u większości genotypów. Wyjątek stanowiły rośliny jarmużu 'Verheul', u których liczba plazmodiów wzrastała w 7 dniu od wysiania, następnie malała, aby znowu wzrosnąć w dniu 14. U roślin kapusty głowiastej 'Kilaton' najwyższą liczbę plazmodiów obserwowano w dniu 10, a następnie w 19, co może świadczyć o wtórnej infekcji.

## **Temat badawczy 2. Wstępna analiza poziomu ekspresji genów zaangażowanych w reakcje odpornościowe podczas infekcji badanych genotypów różnymi patotypami patogena.**

Celem tematu badawczego 2. była wstępna analiza poziomu ekspresji genów zaangażowanych w reakcje odpornościowe podczas infekcji badanych genotypów różnymi patotypami patogena (Pb2 oraz Pb9). W ramach tematu zaprojektowano startery oraz optymalizowano warunki reakcji real-time PCR dla czterech genów zaangażowanych w reakcje odpornościowe kodujących białko G (rozpoznanie patogena), białko NPR1 (aktywacja genów PR), oksydazę NADPH (białko RbohG) oraz dysmutazę SOD (metabolizm ROS). Wszystkie analizy real-time PCR prowadzono przy użyciu odczynników wykorzystujących w pomiarze interkalujący barwnik SybrGreen. Poziom ekspresji poszczególnych genów wyrażony został jako względna ilość mRNA, normalizowana w stosunku do genu referencyjnego kodującego podjednostkę 18S rRNA. Temat został zrealizowany w 100%.

U wszystkich badanych genotypów stwierdzono wzrost ekspresji wybranych genów zaangażowanych w reakcje odpornościowe u roślin zainfekowanych *P. brassicae*, aczkolwiek efekt był zależny zarówno od genotypu rośliny, jak i patotypu patogena. Najwyższy poziom względnej ekspresji badanych genów odpornościowych obserwowano u 3 badanych genotypów: brukwi odmiany 'Wilhelmsburger', jarmużu odmiany 'Verheul' oraz kapusty głowiastej 'Kilaton F1'. Najniższy poziom względnej ekspresji badanych genów odpornościowych obserwowano u rzepy ECD03, kapusty głowiastej 'Binsachsner', kapusty pekińskiej 'Bilko F1' oraz rzepaku odmiany 'Mendel F1'.

Względna ekspresja genu kodującego dysmutazę ponadtlenkową (SOD) u jarmużu 'Verheul', kapusty głowiastej 'Kilaton F1' i brukwi 'Wilhelmsburger' zainfekowanych patotypem Pb9 była kilka do kilkunastu razy wyższa niż u pozostałych genotypów. W przypadku patotypu Pb2 najwyższą ekspresję tego genu stwierdzono u rzepy ECD03, kapusty głowiastej 'Kilaton F1' oraz jarmużu 'Verheul'. W przypadku genu kodującego białko G, wyraźny wzrost względnej ekspresji nastąpił tylko u roślin jarmużu odmiany 'Verheul', infekowanych zarówno patotypem Pb9, jak i Pb2. W kilku przypadkach obserwowano, że wzrost względnej ekspresji tego genu był widoczny dopiero w 20 dniu

od wysiana nasion do inokulowanego podłoża, po czym nastąpił spadek jego ekspresji w 35. dniu u kapusty głowiastej 'Kilaton F<sub>1</sub>' i kapusty głowiastej 'Binsachsner' infekowanych patotypem Pb9 oraz u kapusty głowiastej 'Kilaton F<sub>1</sub>' i u rzepaku 'Mendel F<sub>1</sub>' podczas infekcji patotypem Pb2. Tylko u jednego genotypu – jarmużu odmiany 'Verheul' infekowanego patotypem Pb9 – stwierdzono wyraźny wzrost ekspresji genu kodującego białko NPR1 w czasie trwania doświadczenia. Natomiast u kapusty głowiastej 'Kilaton F<sub>1</sub>' infekowanej patotypem Pb9 oraz Pb2, obserwowano spadek ekspresji tego genu w czasie. W przypadku genu kodującego białko RbohG (oksydazę NADPH) najwyższy względny poziom ekspresji obserwowano w 10. oraz 35. dniu od wysiania nasion u brukwi odmiany 'Wilhelmsburger' oraz jarmużu odmiany 'Verheul'. Największy wzrost ekspresji genu kodującego białko RbohG w 20. dniu od wysiania nasion obserwowano u 2 genotypów infekowanych patotypem Pb2: u rzepy ECD03 oraz kapusty pekińskiej 'Bilko F<sub>1</sub>'. U roślin kapusty głowiastej 'Kilaton F<sub>1</sub>' infekowanych Pb9 i Pb2, oraz kapusty głowiastej 'Binsachsner', jarmużu 'Verheul', brukwi 'Wilhelmsburger' oraz rzepaku 'Mendel F<sub>1</sub>' infekowanych patotypem Pb2 obserwowano spadek ekspresji tego genu w czasie trwania doświadczenia.

Porównując wartości względnej ekspresji badanych genów, wywnioskować można, że infekcja patotypem *P.brassicae* Pb9 wywołuje silniejszą reakcję komórki na stres wywołany porażeniem przez patogena.

### **Temat badawczy 3. Analiza transkryptomów porażonych i zdrowych roślin 7 genotypów z rodzaju *Brassica* metodą cDNA-AFLP.**

Zgodnie z planem, w ramach tematu badawczego 3. kontynuowano analizę cDNA-AFLP u siedmiu genotypów z rodzaju *Brassica* z wykorzystaniem kolejnych 85 par primerów różnicujących. Temat został zrealizowany w 100%.

Do analiz pobrano korzenie roślin rosnących w podłożu inokulowanym *P. brassicae* oraz roślin kontrolnych. Próbkę do analiz pobrano trzykrotnie: po 10, 20 i 35 dniach od inokulacji. Z testowanych 85 par starterów AFLP, 70 pozwoliło na amplifikowanie fragmentów cDNA u badanych genotypów i analizę markerów AFLP. Analizie poddano ponad 3700 produktów amplifikacji – fragmentów cDNA – które ulegały zróżnicowanej ekspresji u badanych genotypów – roślin zdrowych oraz infekowanych. Wstępna analiza wykazała, że u roślin infekowanych *P.brassicae* 43,5% produktów cDNA-AFLP ulegało nadekspresji, a 36,4% było wyciszonych, w porównaniu do roślin kontrolnych. Największą ogólną liczbę amplifikowanych fragmentów cDNA-AFLP otrzymano dla dwóch badanych genotypów: brukwi odmiany 'Wilhelmsburger' oraz kapusty pekińskiej 'Bilko F<sub>1</sub>'. Największą liczbę produktów amplifikacji AFLP specyficznych jedynie dla roślin infekowanych *P. brassicae* otrzymano u kapusty głowiastej odmiany 'Kilaton F<sub>1</sub>' oraz dla jarmużu odmiany 'Verheul' – u tych roślin nadekspresji ulegało odpowiednio 53,1% oraz 44,6% genów. Największą liczbę genów, które ulegały wyciszeniu pod wpływem infekcji patogenem stwierdzono u roślin brukwi odmiany 'Wilhelmsburger' – prawie 45% wszystkich analizowanych genów oraz u rzepy ECD03 – 42% wszystkich genów.

W roku 2017 reamplifikowano oraz sekwencjonowano kolejnych 50 produktów AFLP wykazujących zróżnicowaną ekspresję u roślin zainfekowanych i zdrowych. Spośród nich, 29 uległo nadekspresji, a 21 wyciszeniu u roślin infekowanych. Analiza BLAST wykazała, że spośród 29 genów ulegających nadekspresji u roślin infekowanych, 22 geny były homologiczne do genów kodujących znane białka roślinne. Białka te biorą udział w regulacji ekspresji genów (odwrotne transkryptazy oraz polimerazy RNA, białka z domeną zinc finger, czynniki transkrypcyjne); transporcie komórkowym (białkowy transporter 4); potranslacyjnej modyfikacji białek (białkowa ligaza ubikwityny E3), budowie cytoszkieletu (hydrolazy glukanu oraz formin) czy innych procesach komórkowych (m.in.: fosforylaza pirydyn, dehydrogenaza NADH oraz oksydoreduktazy ubichinonu). Dla 6 z nich

wykazano homologię do znanych białek zaangażowanych w reakcje odpornościowe u roślin: białko PDCD1, kinazę serynowo-treoninową ATM, dehydrogenazę B7 oraz hydrolazę Sgpp, oksygenazy flawonoidów oraz białko z domeną SNARE. Dla 1 genu analiza homologii wykazała podobieństwo do genu kodującego białko o nieznannej funkcji, a dla 2 genów (pochodzących prawdopodobnie od patogena) wykazano homologię do białek kodujących transporter ABC oraz oksydoreduktazę NADH. Dla 7 genów z tej grupy analiza BLAST nie wykazała homologii do żadnego z genów/sekwencji zgromadzonych w bazie NCBI.

Spośród 21 genów, które ulegały wyciszeniu u roślin infekowanych, dla 14 stwierdzono homologię do genów zgromadzonych w bazie NCBI. Kodują one białka zaangażowane w regulację ekspresji genów (czynnik transkrypcyjny, białko wiążące DNA, białko z domeną zinc finger, odwrotna transkryptaza, polimeraza RNA), transport komórkowy (białko NRT1/PTR, zw10, rab11), potranslacyjne modyfikacje białek (ligaza ubikwityny PUB23) i biorące udział w innych procesach komórkowych (syntazy ATP, kinaza fosfatydyloinozytolu). Dla jednego z genów analiza homologii wykazała podobieństwo do genu kodującego białko o nieznannej funkcji. Dla 7 genów z tej grupy analiza BLAST nie wykazała homologii do żadnego z genów/sekwencji zgromadzonych w bazie NCBI

**Tabela. Profil ekspresyjny fragmentów cDNA-AFLP sekwencjonowanych w roku 2017, ich homologia i funkcja.**

Lp.	fragment cDNA-AFLP	startery AFLP	wielkość produktu [pz]	odmiana*	Homologia BLAST	E value	funkcja
nadekspresja w roślinach infekowanych <i>P. brassicae</i>							
1	15-116	P-GA/M-GT	145	k.pekińska 'Bilko', rzepak 'Mendel', jarmuż 'Verheul', k.głowiasta 'Kilaton'	NADH dehydrogenase subunit 5 (nad5) gene, KF771323.1	1e <sup>-04</sup>	inne (oddychanie komórkowe)
2	21-135	P-TT/M-GG	123	k.głowiasta 'Kilaton', k.pekińska 'Bilko'	reverse transcriptase, RNA-dependent DNA polymerase, OTG33339.1	0,043	regulacja ekspresji genów
3	23-135	P-TT/M-GG	345	rzepak 'Mendel', brukiew 'Wilhelmsburger'	zinc finger protein ZAT5, XP_011469606.1	4e <sup>-33</sup>	regulacja ekspresji genów
4	26.1-140	P-TT/M-CG	437	k.pekińska 'Bilko', jarmuż 'Verheul'	aldehyde dehydrogenase family 2 member B7, XP_004297642.1	1e <sup>-41</sup>	reakcje odpornościowe
5	26.2-140	P-TT/M-CG	327	k.pekińska 'Bilko', jarmuż 'Verheul'	haloacid dehalogenase-like hydrolase domain-containing protein Sgpp, XM_004300236.2	5e <sup>-33</sup>	reakcje odpornościowe
6	29-159	P-TA/M-TC	150	jarmuż 'Verheul', k.pekińska 'Bilko', rzepak 'Mendel'	brak homologii		
7	43-87	P-AC/M-TG	457	k.głowiasta 'Binsachsner', k.głowiasta 'Kilaton', k.pekińska 'Bilko', rzepak 'Mendel'	carboxylating nicotinate-nucleotide diphosphorylase, WP_005220475.1	6e <sup>-72</sup>	inne (synteza pirydyny)
8	46-87	P-AC/M-TG	171	jarmuż 'Verheul', rzepa ECD03, k.głowiasta 'Kilaton', k.pekińska 'Bilko', rzepak 'Mendel'	transcription factor bHLH118-like, XM_004303098.2	0,0081	regulacja ekspresji genów
9	47-87	P-AC/M-TG	169	k.głowiasta 'Kilaton', jarmuż 'Verheul', k.pekińska 'Bilko', rzepak 'Mendel'	glycerol-3-phosphate transporter 4, XP_008343456.1	0,019	transport komórkowy
10	48-87	P-AC/M-TG	166	k.głowiasta 'Kilaton', brukiew 'Wilhelmsburger', k.głowiasta 'Binsachsner'	ethylene-responsive transcription factor ERF109-like, XM_004294762.2	5e <sup>-05</sup>	regulacja ekspresji genów
11	51-87	P-AC/M-TG	169	k.pekińska 'Bilko', brukiew 'Wilhelmsburger', k.głowiasta 'Binsachsner', jarmuż 'Verheul', k.głowiasta 'Kilaton', rzepak 'Mendel'	brak homologii		
12	54-92	P-GG/M-AC	144	k.głowiasta 'Kilaton', jarmuż 'Verheul', k.pekińska 'Bilko', rzepak 'Mendel'	formin-like protein 3 isoform X1, XP_004289149.1	7e <sup>-14</sup>	budowa cytoszkieletu
13	56-92	P-GG/M-AC	157	k.pekińska 'Bilko', k.głowiasta 'Kilaton', rzepak 'Mendel'	brak homologii		
14	58-92	P-GG/M-AC	143	rzepak 'Mendel', k.głowiasta 'Kilaton'	xyloglucan endotransglucosylase/hydrolase, XP_007217342.2	8e <sup>-15</sup>	budowa cytoszkieletu
15	60-105	P-GA/M-AA	284	rzepa ECD03, jarmuż 'Verheul', k.głowiasta 'Kilaton', k.pekińska 'Bilko', rzepak 'Mendel'	brak homologii		

16	62-105	P-GA/M-AA	412	brukiew 'Wilhelmsburger', k.głowiasta 'Binsachsner', k.pekińska 'Bilko', rzepak 'Mendel'	programmed cell death 1 (PDCD1), XM_017810508.1	4,81	reakcje odpornościowe
17	66-108	P-GA/M-TT	195	rzepa ECD03, k.głowiasta 'Binsachsner', jarmuż 'Verheul', k.głowiasta 'Kilaton'	ATM serine/threonine kinase, XM_014495812.1	0,69	reakcje odpornościowe
18	67-108	P-GA/M-TT	193	rzepa ECD03, brukiew 'Wilhelmsburger', k.głowiasta 'Kilaton', k.pekińska 'Bilko'	E3 ubiquitin-protein ligase, XM_013872977.1	9,92	potranslacyjna modyfikacja białek
19	68-108	P-GA/M-TT	195	brukiew 'Wilhelmsburger', rzepa ECD03, jarmuż 'Verheul', k.głowiasta 'Kilaton'	brak homologii		
20	6-111	P-GA/M-AG	151	k.pekińska 'Bilko', jarmuż 'Verheul', k.głowiasta 'Kilaton', rzepak 'Mendel'	DNA-directed RNA polymerase I subunit rpa1, XP_011469851.1	3e <sup>-16</sup>	regulacja ekspresji genów
21	70-108	P-GA/M-TT	192	k.głowiasta 'Kilaton', brukiew 'Wilhelmsburger', k.głowiasta 'Binsachsner', k.pekińska 'Bilko'	flavanone 3-dioxygenase, PcbC superfamily, XP_002521659.1	0,007	reakcje odpornościowe
22	72-108	P-GA/M-TT	146	k.pekińska 'Bilko', k.głowiasta 'Binsachsner', k.głowiasta 'Kilaton'	brak homologii		
23	75- 110**	P-GA/M-TA	601	rzepa ECD03	carbohydrate ABC transporter permease, WP_037095955.1	8e <sup>-115</sup>	transport komórkowy
24	77-110	P-GA/M-TA	370	brukiew 'Wilhelmsburger', rzepa ECD03, k.głowiasta 'Binsachsner'	snare-domain-containing protein, XP_005646153.1	4e <sup>-10</sup>	reakcje odpornościowe
25	78-110	P-GA/M-TA	208	brukiew 'Wilhelmsburger', rzepa ECD03, k.głowiasta 'Binsachsner', k.głowiasta 'Kilaton'	brak homologii		
26	8-111	P-GA/M-AG	164	rzepak 'Mendel', k.głowiasta 'Binsachsner', jarmuż 'Verheul', k.głowiasta 'Kilaton', k.pekińska 'Bilko'	uncharacterized protein, XM_004301763.1	1e <sup>-17</sup>	nieznana
27	9-116	P-GA/M-GT	91	rzepa ECD03, jarmuż 'Verheul', k.głowiasta 'Kilaton', k.pekińska 'Bilko'	NF-X1-type zinc finger protein NFXL2, XM_009123914.2	3,6	regulacja ekspresji genów
28	11-116	P-GA/M-GT	144	jarmuż 'Verheul', k.głowiasta 'Kilaton', k.pekińska 'Bilko', rzepak 'Mendel'	NADH-ubiquinone oxidoreductase chain 5, XM_022134117.1	5e <sup>-17</sup>	inne (oddychanie komórkowe)
29	13- 116**	P-GA/M-GT	148	k.głowiasta 'Kilaton', rzepa ECD03, jarmuż 'Verheul', k.pekińska 'Bilko', rzepak 'Mendel'	NADH-quinone oxidoreductase subunit L, WP_062140597.1	1e <sup>-04</sup>	inne (oddychanie komórkowe)
wyciszenie w roślinach infekowanych <i>P. brassicae</i>							
30	10-116	P-GA/M-GT	150	rzepa ECD03, jarmuż 'Verheul', k.pekińska 'Bilko'	brak homologii		
31	12-116	P-GA/M-GT	186	jarmuż 'Verheul', k.pekińska 'Bilko'	protein NRT1/PTR family 4.6-like, XP_012852935.1	2e <sup>-12</sup>	transport komórkowy
32	14-116	P-GA/M-GT	102	k.głowiasta 'Kilaton'	putative DNA-binding protein ESCAROLA, XM_011466718.1	1,91	regulacja ekspresji genów
33	16-116	P-GA/M-GT	149	k.pekińska 'Bilko', jarmuż 'Verheul', k.głowiasta 'Kilaton'	brak homologii		
34	18-135	P-TT/M-GG	413	rzepa ECD03, k.pekińska 'Bilko'	zinc finger amd BTB domain containing protein (ZBTB20), XM_016137794.1	0,0061	regulacja ekspresji genów
35	24-140	P-TT/M-CG	84	jarmuż 'Verheul', k.głowiasta 'Kilaton'	brak homologii		
36	30-159	P-TA/M-TC	155	jarmuż 'Verheul', k.głowiasta 'Kilaton', k.pekińska 'Bilko'	ATP synthase CF0 subunit 1, ARD02209.1	3e <sup>-13</sup>	inne (oddychanie komórkowe)
37	31-159	P-TA/M-TC	154	k.głowiasta 'Kilaton', k.pekińska 'Bilko'	ATP synthase CF0 B chain, YP_009326403.1	2e <sup>-12</sup>	inne (oddychanie komórkowe)
38	39-87	P-AC/M-TG	127	rzepa ECD03, k.głowiasta 'Binsachsner', jarmuż 'Verheul', k.głowiasta 'Kilaton', k.pekińska 'Bilko', rzepak 'Mendel'	eucaryotic translation initiation factor 3 subunit A-like, XP_013718615.1	2e <sup>-07</sup>	regulacja ekspresji genów
39	3-111	P-GA/M-AG	401	brukiew 'Wilhelmsburger', k.głowiasta 'Kilaton', k.pekińska 'Bilko'	centromere/kinetochore protein zw10 homolog, XM_011102167.2	6,21	transport komórkowy
40	44.1-87	P-AC/M-TG	350	k.głowiasta 'Binsachsner', k.głowiasta 'Kilaton'	phosphoribosylformylglycinamide synthase, WP_006008931.1	8e <sup>-07</sup>	inne (synteza puryn)

41	45-87	P-AC/M-TG	107	k.głowiasta 'Binsachsner', k.głowiasta 'Kilaton'	hypothetical protein, WP_049950282.1	3,74	nieznana
42	55-92	P-GG/M-AC	134	k.głowiasta 'Kilaton', k.pekińska 'Bilko', rzepak 'Mendel'	rab11 family-interacting protein 1-like, XM_008419045.2	0,991	transport komórkowy
43	57-92	P-GG/M-AC	143	k.pekińska 'Bilko', k.głowiasta 'Kilaton', rzepak 'Mendel'	brak homologii		
44	59-92	P-GG/M-AC	148	rzepak 'Mendel', k.głowiasta 'Kilaton', k.pekińska 'Bilko'	E3 ubiquitin-protein ligase PUB23-like, XM_010241195.1	1,41	potranslacyjna modyfikacja białek
45	5-111	P-GA/M-AG	149	k.głowiasta 'Kilaton'	DNA-directed RNA polymerase I subunit rpa1, XP_011469851.1	1e <sup>-14</sup>	regulacja ekspresji genów
46	63-105	P-GA/M-AA	133	brukiew 'Wilhelmsburger', k.głowiasta 'Binsachsner'	brak homologii		
47	64-105	P-GA/M-AA	301	k.głowiasta 'Binsachsner'	phosphatidylinositol 4-phosphate 5-kinase 7-like, XP_008218794.1	2e <sup>-42</sup>	inne (rozwoj włośników)
48	7-111	P-GA/M-AG	111	k.pekińska 'Bilko', rzepak 'Mendel'	brak homologii		
49	22-135	P-TT/M-GG	95	k.głowiasta 'Kilaton', k.głowiasta 'Binsachsner', k.pekińska 'Bilko'	putative reverse transcriptase, OTG33339.1	0,41	regulacja ekspresji genów
50	44.2-87	P-AC/M-TG	159	k.głowiasta 'Binsachsner', k.głowiasta 'Kilaton', k.pekińska 'Bilko', rzepak 'Mendel'	brak homologii		

\* w pierwszej kolejności wymieniono tę odmianę, z której dany fragment był izolowany

\*\* gen prawdopodobnie pochodzący od patogena

**Prezentacja wyników uzyskanych w ramach zadania nr 99 w roku 2016 oraz 2017:**

Markiewicz M., Michalczuk L., Czajka A. 2017: *Poszukiwanie molekularnych markerów odporności na kiłę kapusty (Plasmodiophora brassicae) u roślin z rodzaju Brassica*. Ogólnopolska Ogrodnicza Konferencja Naukowa 'Ziemia – Roślina – Człowiek' Kraków 20-21 września 2017, Materiały konferencyjne s. 163

**Poszukiwanie molekularnych markerów odporności na kiłę kapusty (Plasmodiophora brassicae) u roślin z rodzaju Brassica.**



**Markiewicz Monika<sup>1</sup>, Michalczuk Lech<sup>1</sup>, Czajka Agnieszka<sup>2</sup>**  
 Instytut Ogrodnictwa, Skiermiewice: 1) Zakład Biologii Stosowanej; 2) Zakład Fitopatologii

monika.markiewicz@inhort.pl  
 46 834 54 47

**WSTĘP**

Kiła kapusty powodowana przez *Plasmodiophora brassicae* Wor. jest powszechna choroba roślin uprawnych z rodziny kapustowatych i chwastów należących do rodziny *Brassicaceae*. Według danych z Ośrodków Doradztwa Rolniczego, blisko 30% plantacji warzyw kapustowatych i rzepaku w Polsce jest porażonych przez chorobę. Oczekuje się, że prognozowane globalne ocieplenie klimatu będzie sprzyjało dalszemu rozprzestrzenianiu się patogena oraz przyczyni się do zwiększenia powodowanych przez niego strat. Choroba może być zwalczana przez środki chemiczne oraz agrotechniczne, jednak z ograniczoną skutecznością. W związku z tym, jednym z priorytetów programów hodowlanych roślin kapustowatych jest hodowla roślin odpornych na kiłę kapusty.

W obrębie rodzaju *Brassica*, istnieje kilka źródeł odporności, ale skomplikowane relacje genetyczne pomiędzy różnymi gatunkami roślin kapustowatych utrudniają postęp w hodowli. Prace hodowlane znacznie utrudnia także duże zróżnicowanie genetyczne patogena, co powoduje, że może on w szybkim tempie przełamać odporność genetyczną roślin. Konieczne jest więc poszukiwanie nowych źródeł odporności przydatnych do hodowli twórczej roślin kapustowatych, a zrozumienie mechanizmu odporności umożliwi bardziej efektywną strategię hodowli.

Celem przedstawionych badań jest poznanie molekularnych mechanizmów leżących u podstaw odporności na kiłę kapusty i wytypowanie nowych źródeł odporności u roślin z rodzaju *Brassica*. Sprzyjające rezultaty przyczynią się do poprawy stanu wiedzy na temat mechanizmów reakcji roślin na infekcję patogenu, włącznie z identyfikacją genów/białek biorących udział w reakcjach odpornościowych na choroby i wytypowaniu nowych źródeł odporności.

**MATERIAŁY I METODY**

Siedem genotypów roślin z rodziny *Brassicaceae* różniących się poziomem i rodzajem odpornością na kiłę kapusty stanowiło materiał roślinny do badań:

1. rzepa (*B. rapa* subsp. *rapa* 'ECD03');
2. brukiew (*B. napus* var. *rapifera* cv. 'Wilhelmsburger');
3. kapusta głowiasta (*B. oleracea* var. *capitata* cv. 'Bimschoner');
4. jarmuz (*B. oleracea* var. *acephala* subvar. *lacinata* cv. 'Verheul');
5. kapusta głowiasta (*B. oleracea* var. *capitata* cv. 'Kilaton F1');
6. kapusta pekińska (*B. rapa* subsp. *pekinensis* cv. 'Bilko F1');
7. rzepak (*B. napus* var. *napus* cv. 'Mendel F1').

Nasiona roślin wysiewano do kuwek z substratem torfowym zakażonym inokulum *P. brassicae* (10<sup>8</sup> zarodników/ml), a nasiona roślin kontrolnych wysiewano do kuwek z podłożem nieinokulowanym.

Próbki do analiz pobierano trzy razy: 10, 20 i 35 dni po wysianiu.

- W ramach podjętych badań przeprowadzono:
- ✓ makroskopowe obserwacje systemów korzeniowych w 3 terminach na obecność symptomów choroby;
  - ✓ analizy transkryptomów zainfekowanych i zdrowych roślin metodą cDNA-AFLP przy użyciu 170 par startów;
  - ✓ następną identyfikację wybranych różnicujących produktów AFLP, sekwencjonowanie oraz wstępna analiza ich homologii.

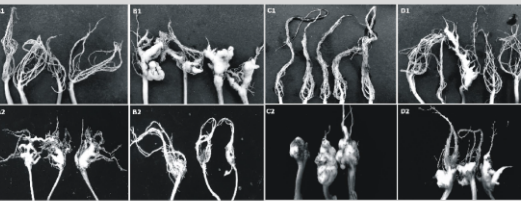
**WYNIKI**

**OBSERWACJE MAKROSKOPOWE**

Obserwacje makroskopowe rozwoju choroby prowadzone były na 10 losowo wybranych roślinach, a stopień porażenia korzeni oceniano wg skali 0-3: '0' – brak wyrosła na całym systemie korzeniowym; '1' – pojedyncze wyrosła na korzeniach bocznych; '2' – liczne wyrosła na korzeniach bocznych i delikatne wyrosła na korzeniu głównym; '3' – zniknięcie całego systemu korzeniowego, jednolite wyrosła na korzeniu głównym.



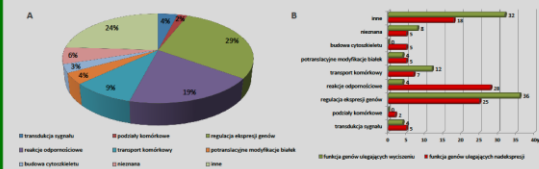
Fot. Wzorzec oceny makroskopowej na korzeniach kapusty. Wykres. Średni stopień porażenia korzeni podczas infekcji 20 oraz 35 dni od wysiania nasion podczas infekcji dwiema patogenami.



Fot. Makroskopowa ocena stopnia infekcji korzeni infekcyjnymi zarodnikami *P. brassicae* w 35 dni po wysianiu nasion odmian 'Wilhelmsburger' (A), 'Verheul' (B), 'Bilko F1' (C) oraz 'Mendel F1' (D) dwiema patogenami – patogenem 2. (1) oraz patogenem 9. (2).

**ANALIZA TRANSKRYPTOMÓW**

Analizę transkryptomów badanych genotypów wykonano metodą cDNA-AFLP przy użyciu 170 par primerów różnicujących. Z fragmentów cDNA-AFLP różnicujących rośliny infekowane *P. brassicae* patogenem 2, wyizolowano 100 losowo wybranych, spośród których 60% ulegało nadekspresji w roślinach infekowanych *P. brassicae*, natomiast 40% ulegało wyciszeniu. Po sekwencjonowaniu przeprowadzono wstępną analizę homologii pozwalającą na określenie funkcji wyizolowanych fragmentów. Dla 29% fragmentów analiza BLAST nie wykazała homologii do żadnego z genów/sekencji zgromadzonych w bazie danych NCBI.



Wykres. Funkcje genów ulegających zróżnicowanej ekspresji w roślinach infekowanych *P. brassicae* wyizolowanych podczas analizy transkryptomów w ujęciu ogólnym (A) oraz z podziałem na geny ulegające nadekspresji oraz wyciszeniu w roślinach infekowanych (B).

Tabela. Profille ekspresyjny sekwencjonowanych fragmentów cDNA-AFLP izolowanych z roślin infekowanych *P. brassicae*.

l.p.	fragment cDNA-AFLP	startery AFLP	wielkość produktu [bp]	Homologia BLAST	E Value
wyciszenie w roślinach infekowanych <i>P. brassicae</i>					
1	7-1	P-ACM-AC	137	alpha-mannosidase 1 (MNS5, XM_00821493.2)	0,001
2	51-4	P-ACM-CC	121	BEN domain containing 3 (Bnd3), XM_010621812.1	2,2
3	57-1	P-ATM-CA	258	bifunctional L-3-cyanolamin synthase/cystine synthase 1, XM_005103931.1	0,55
4	13-4	P-CCM-CC	334	sulfate transporter 3.5 (Fragaria vesca), XM_00488644.2	8e-06
5	57-6	P-ATM-CA	229	F-box/WD-40 repeat-containing protein, XM_011463484.2	2e-07
6	11-1	P-GAM-GA	69	bialka o nieznanym funkcji pochodzące z Brassica rapa	2e-12
7	11-7	P-GAM-GA	209	calmodulin-binding transcription activator 4, XM01145191.1	2e-79
8	21-5	P-AGM-AG	193	decapping nuclease DMC3, XM00430063.2	6e-08
9	37-1	P-TGM-TG	957	glucan synthase 6, XP_009662676.1	1,8
10	66-4	P-AM-TT	178	NADH dehydrogenase subunit 4 (complex I) (nad4), AF003146.2	1e-08
11	66-3	P-AM-TT	173	penicillin-binding protein-like domain-containing protein, XM01360631.1	5,8
12	12-116	P-GAM-GT	186	protein NRT1/PTP family 4-6-like, XP_012852935.1	2e-17
13	14-116	P-GAM-GT	102	putative DNA-binding protein ESCORT4, XM_011466718.1	1,91
14	18-135	P-TTM-GG	410	Zinc finger and BTB domain containing protein (ZBTB20), XM_010127261.1	0,0061
15	30-159	P-TAM-TG	155	ATP synthase CF0 subunit 1, A0200209.1	3e-11
16	31-159	P-TAM-TG	154	ATP synthase CF0 B chain, XP_009126403.1	2e-17
17	39-87	P-ACM-TG	127	eucaryote translation initiation factor 3 subunit A-like, XP_013718615.1	2e-07
18	3-111	P-GAM-AG	401	centromere/kinetochore protein zw10 homolog, XM_011102167.2	6,21
19	44-187	P-ACM-TG	350	phosphorylase kinase gamma subunit, WP_006004933.1	8e-07
20	45-87	P-ACM-TG	107	hypothetical protein, WP_049950262.1	3,74
21	55-92	P-GCM-AC	134	nail1 family interacting protein 1-like, XM_008419965.2	0,991
22	59-92	P-GCM-AC	148	E3 ubiquitin-protein ligase PRR23-like, XM_0101041195.1	1,41
23	5-111	P-GAM-AG	149	DNA-directed RNA polymerase 1 subunit, XM_011460851.1	1e-14
24	64-105	P-GAM-AG	301	phosphatidylinositol 4-phosphate 5-kinase Z-like, WP_008218794.1	2e-07
25	22-135	P-TM-TG	95	putative reverse transcriptase, CFC3339.1	0,41

l.p.	fragment cDNA-AFLP	startery AFLP	wielkość produktu [bp]	Homologia BLAST	E Value
nadekspresja w roślinach infekowanych <i>P. brassicae</i>					
1	55-2	P-ATM-AC	186	Ry motif and SECF domain-containing protein 1, XM_017224916.1	2,6
2	56-4	P-ATM-CC	245	cylin-10-2-like, XM_008012862.2	2e-06
3	63-1	P-AM-GG	166	lysine methyltransferase 2A (KMT2A), XM_008249437.2	1,6
4	81-1	P-ACM-GC	220	resistance protein 8-like, XM_008237702.1	1e-08
5	85-3	P-ACM-CA	319	MA3 domain-containing protein, XM_1021203.3	4e-07
6	29-14	P-TGM-TG	168	surface glycoprotein C21a-like, XM_048101613.2	1e-06
7	29-15	P-TGM-TG	211	potassium channel tetramerization domain containing 9 (KCTD9), XM_012749317.1	0,95
8	29-17	P-TGM-TG	163	subtilisin-like protease SBT3.3, XM_011472578.1	9e-12
9	29-21	P-TGM-TG	145	blast resistance protein (Ptd3) gene, FJ45368.1	2,4
10	7-2	P-ACM-AC	142	penicillin-binding protein repeat-containing protein, XM_009123109.2	0,17
11	7-5	P-ACM-AC	245	phosphorylase kinase gamma subunit, XM_005960319.1	0,007
12	22-6	P-ACM-GC	313	C2H2-like protein, XM_018409725.2	2e-08
13	22-3	P-AGM-CG	227	probable methyltransferase PMT24, XM_008246353.2	9e-06
14	23-2	P-GM-AG	194	disease resistance protein TAO1-like, XM_009115688.2	0,067
15	39-2	P-TGM-GT	157	zinc finger protein 652, XM_004326274.1	3,0
16	47-1	P-AM-AA	127	umc-119 like binding chaperone (UMC119), XM_013016409.1	4,1
17	71-1*	P-AM-CA	287	stomatal/protein-ligase membrane protein subunit Y8AK, CC91464.1	2e-18
18	71-2	P-AM-CA	137	anthocyanidin reductase (ANR), AY081301.1	5e-06
19	71-6*	P-AM-CA	445	phosphotransferase transferase (Phosphotransferase group), WP_035226354.1	4e-12
20	11-2	P-GAM-CA	68	bialko o nieznanym funkcji pochodzące z Brassica rapa	2e-14
21	11-3	P-GAM-CA	156	protein phosphatase 1 regulatory subunit 2B (PPP2R2B), XM015093866.1	0,5
22	11-6	P-GAM-GA	162	E3 ubiquitin-protein ligase RNF14, XM013200050.1	2,8
23	11-8	P-GAM-GA	158	ABC transporter G family member, XM008246521.1	6e-14
24	66-2	P-AM-TT	175	NADH dehydrogenase subunit 5 (nad5) gene, KP94848.1	1e-08
25	15-116	P-GAM-GT	145	NADH dehydrogenase subunit 5 (nad5) gene, KF771323.1	1e-06
26	21-135	P-TM-GG	123	reverse transcriptase, RNA-dependent DNA polymerase, CFC3339.1	0,043
27	23-135	P-TM-GG	345	zinc finger protein ZAT5, XP_011469606.1	4e-12
28	26-140	P-TM-CG	437	aldehyde dehydrogenase family 2 member B7, XP_004297642.1	1e-01
29	26-2-140	P-TM-CG	327	haloacid dehalogenase-like hydrolase domain-containing protein Sapp, XM_004300236.2	5e-12
30	43-87	P-ACM-TG	408	carbonylating reductase-nucleoside diphosphate kinase, WP_005220475.1	6e-07
31	46-87	P-ACM-TG	171	transcription factor RFLH18-like, XM_04033099.2	0,0003
32	47-87	P-ACM-TG	169	glycerol-3-phosphate transporter 4, XP_008343436.1	0,019
33	48-87	P-ACM-TG	166	ethylene-responsive transcription factor ERF109-like, XM_004294762.2	5e-06
34	54-92	P-GCM-AC	144	formin-like protein 3 isoform X1, XP_004291493.1	7e-14
35	59-92	P-GCM-AC	143	tylkozacyan mediatorek cytozyny/hydrolaze, XP_007217462.2	8e-07
36	62-105	P-GAM-AA	414	progesterone cell death 1 (PCD1), XM_017810581.1	4,81
37	66-108	P-GAM-TT	195	ATM serine/threonine kinase, XM_014959312.1	0,69
38	67-108	P-GAM-TT	193	E3 ubiquitin-protein ligase, XM_013829771.1	9,92
39	6-111	P-GAM-AG	151	DNA-directed RNA polymerase 1 subunit (pa1), XP_011460851.1	3e-18
40	70-108	P-GAM-TT	192	flavonane 3-O-glucosylase, P1K (cupressin), XP_005016109.1	0,007
41	75-108*	P-GAM-TA	603	carbohydrate ABC transporter permease, WP_027095955.1	8e-10
42	77-110	P-GAM-TA	370	snare-domain-containing protein, XP_005646173.1	4e-06
43	8-111	P-GAM-AG	164	uncharacterized protein, XM_0043017653.1	1e-17
44	9-116	P-GAM-GT	91	NF-X1-type zinc finger protein NR22, XM_009122914.2	3,6
45	11-116	P-GAM-GT	146	NADH ubiquinone oxidoreductase chain 5, XM_022124171.2	5e-17
46	113-116*	P-GAM-GT	148	NADH-ubiquinone oxidoreductase subunit L, WP_062140597.1	1e-08

\* gen prawdopodobnie pochodzący od patogena



## **Poszukiwanie molekularnych markerów odporności na kiłę kapusty (*Plasmodiophora brassicae*) u roślin z rodzaju *Brassica***

Markiewicz Monika<sup>1\*</sup>, Michalczuk Lech<sup>1</sup>, Czajka Agnieszka<sup>2</sup>

<sup>1</sup>*Zakład Biologii Ogólnej, Instytut Ogrodnictwa w Skierniewicach*

<sup>2</sup>*Zakład Ochrony Roślin Warzywnych i Ozdobnych, Instytut Ogrodnictwa w Skierniewicach*

\* Autor korespondujący: monika.markiewicz@inhort.pl

Kiła kapusty wywoływana przez *P. brassicae* Wor. powoduje ogromne straty w uprawach roślin kapustowatych. Kiłę można zwalczać chemicznie i agrotechnicznie, jednak z ograniczoną skutecznością, dlatego też jednym z priorytetów programów hodowlanych jest hodowla roślin odpornych.

Celem badań jest poznanie molekularnego mechanizmu odporności roślin na kiłę kapusty. W tym celu wykonano analizę transkryptomów porażonych i zdrowych roślin 7 genotypów różniących się poziomem i typem odporności na kiłę metodą cDNA-AFLP. Materiał do badań stanowiły genotypy kapusty głowiastej, kapusty pekińskiej, brukwi, jarmużu, rzepy oraz rzepaku. Analizie poddano produkty cDNA-AFLP generowane przez 170 par starterów AFLP – ponad 60% z nich ulegało nadekspresji u roślin infekowanych. Analiza BLAST wykazała, że większość genów ulegających nadekspresji koduje znane białka biorące udział w reakcjach odpornościowych u roślin (białka N, Pid3, TAO1, białka z domeną MA3, glikoproteina CD1, proteaza SBT3.3); transdukcji sygnału w komórce (białka z motywem IQ i domeną SEC7; białkowe kanały potasowe, białkowa fosfataza 1 PP1); regulacji ekspresji genów (metylotransferazy, białka z domeną pentatricopeptide repeat i zinc finger); transporcie komórkowym (Unc119 lipid binding chaperone, transporter ABC); potranslacyjnej modyfikacji białek (białkowa ligaza RNF14) czy innych procesach metabolicznych (m.in.: COBRA-like protein, reduktaza ANR, dehydrogenaza NADH). Pośród genów ulegających wyciszeniu u roślin infekowanych znalazły się geny kodujące białka zaangażowane w regulację ekspresji genów (białka z domeną BEN, białko F-box, aktywator transkrypcji wiążący kalmodulinę, nukleazę DXO), transdukcję sygnału (siarczanowy transporter 3.5) i biorące udział w innych reakcjach metabolicznych (mannozydaza, syntaza cysteiny I, syntaza glukanu, dehydrogenaza NADH).

Wyniki przyczynią się do pogłębienia wiedzy o mechanizmach odporności kapustowatych na kiłę i identyfikacji genów warunkujących odporność. Generowane markery EST mogą być przydatne w pracach hodowlanych, a poznanie mechanizmu odporności umożliwi efektywną strategię hodowlaną.

Prace finansowane przez Ministerstwo Rolnictwa i Rozwoju Wsi w ramach zadania nr 99 Badań podstawowych na rzecz postępu biologicznego w produkcji roślinnej.