

MONIKA MARKIEWICZ

LECH MICHALCZUK

AGNIESZKA CZAJKA

BEATA KOWALSKA

PIOTR KAMIŃSKI

Instytut Ogrodnictwa, Skierniewice, Zakład Biologii Stosowanej

Kierownik Tematu: mgr Monika Markiewicz Instytut Ogrodnictwa, ul. Konstytucji 3 Maja 1/3,

96-100 Skierniewice, tel. 46 8345447, 46 8345376, e-mail: monika.markiewicz@inhort.pl

Prace zostały wykonane w ramach badań podstawowych na rzecz postępu biologicznego w produkcji roślinnej na podstawie decyzji Ministra Rolnictwa i Rozwoju Wsi nr HOR.hn.802.20.2018, Zadanie 99.

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

Studies on molecular mechanism of clubroot (*Plasmodiophora brassicae*) in *Brassica* plants

Słowa kluczowe: *Brassica* sp., cDNA-AFLP; kiła kapusty; odporność; patogenezą;
Plasmodiophora brassicae

Celem badań była makro- i mikroskopowa analiza rozwoju infekcji u wybranych genotypów roślin kapustowatych różniących się poziomem i typem odporności na kiłę kapusty infekowanych *P. brassicae* Pb3, wykonanie testów molekularnych na obecność zarodników *P. brassicae* Pb3 w korzeniach roślin i w glebie, analiza ekspresji genów zaangażowanych w reakcje odpornościowe roślin podczas infekcji u roślin infekowanych *P. brassicae* Pb3 oraz analiza transkryptomów roślin porażonych *P. brassicae* Pb2. Badania realizowano w ramach trzech tematów badawczych. Materiał do badań stanowiło siedem genotypów roślin z rodziny *Brassicaceae*: *B. rapa* var. *capitata* ECD03; *B. oleracea* var. *capitata* cv. 'Binsachsner'; *B. oleracea* var. *acephala* subvar. *lacinata* cv. 'Verheul'; *B. oleracea* var. *capitata* cv. 'Kilaton F1'; *B. napus* var. *rapifera* cv. 'Wilhelmsburger'; *B. rapa* subsp. *pekinensis* cv. 'Bilko F1'; *B. napus* var. *napus* cv. 'Mendel F1'.

W temacie badawczym 1. wykonano mikroskopową i makroskopową ocenę nasilenia infekcji oraz określono ilości patogena w badanych roślinach i w podłożu przy pomocy testów molekularnych. Pierwsze symptomy choroby pojawiły się na korzeniach kapusty pekińskiej ‘Bilko F1’ w 20. dniu od wysiania nasion (średnie porażenie (ŚP) wyniosło 0,2). Po 35 dniach makroskopowe objawy choroby pojawiły się u wszystkich badanych genotypów. Największe nasilenie objawów (ŚP 2,0) obserwowano na korzeniach kapusty głowiastej ‘Binsachsner’ oraz ‘Kilaton F1’, a także kapusty pekińskiej ‘Bilko F1’. Ilościowe analizy metodą real-time PCR wykazały wysokie stężenie patogena w korzeniach roślin oraz w inokulowanym podłożu. Średnia ilość patogena w podłożu inokulowanym we wszystkich kuwetach przed siewem roślin wynosiła 10^7 spor/g podłoża. Po 35. dniach wzrostu roślin w zainfekowanym podłożu ilość zarodników zmalała we wszystkich próbach podłoża. Największy spadek ilości zarodników zaobserwowano w kuwetach, w których rosły rośliny rzepaku ‘Mendel F1’ i jarmużu ‘Verheul’, a najmniejszy — w kuwetach, w których rosły rośliny kapusty głowiastej ‘Kilaton F1’. Ilość spor w korzeniach po 10. dniach od wysiania do infekowanego podłoża wynosiła $0,9 \times 10^4$ – $0,9 \times 10^6$. Po 35 dniach wzrostu roślin w infekowanym podłożu nastąpił znaczny wzrost ilości spor w korzeniach kapusty głowiastej ‘Binsachsner’ oraz ‘Kilaton F1’, jarmużu ‘Verheul’, kapusty pekińskiej ‘Bilko F1’ oraz rzepaku ‘Mendel F1’. W przypadku brukwi ‘Wilhelmsburger’ oraz rzepy ECD03 ilość spor w korzeniach uległa zmniejszeniu w stosunku do początkowej ilości. W ocenie mikroskopowej u większości genotypów najczęściej dojrzałych plazmodiów w komórkach włóśnikowych pojawiało się około 14–15. dnia od wysiewu, najwcześniej u jarmużu ‘Verheul’ (w 4. dniu), najpóźniej u brukwi ‘Wilhelmsburger’ (w 12. dniu od wysiania nasion). Największą maksymalną liczbę plazmodiów we włóśnikach zaobserwowano u jarmużu ‘Verheul’ oraz u kapusty pekińskiej ‘Bilko F1’, a najmniejszą — u brukwi ‘Wilhelmsburger’. Wykonano analizy intensywności generowania reaktywnych form tlenu (ROS) w korzeniach badanych genotypów. Pomimo niskiego poziomu fluorescencji w komórkach korzeni stwierdzono różnice w intensywności generowania ROS pomiędzy badanymi genotypami oraz terminem poboru prób. U jarmużu ‘Verheul’ w 10 oraz 20. dniu od wysiania nasion obserwowano wysoki poziom fluorescencji w komórkach włóśnikowych, a co za tym idzie — nagromadzenia ROS. W 20 dniu wysoki poziom fluorescencji obserwowano także u kapusty głowiastej ‘Binsachsner’ oraz brukwi ‘Wilhelmsburger’. Najniższy poziom fluorescencji obserwowano u korzeni pobranych w 35 dniu od wysiania nasion, z wyjątkiem kapusty głowiastej ‘Kilaton F1’.

W temacie badawczym 2. wykonano analizę poziomu ekspresji czterech genów zaangażowanych w reakcje odpornościowe (kodujących białko G, NPR1, RbohG oraz SOD) podczas infekcji genotypów *P. brassicae* Pb3. U wszystkich genotypów stwierdzono wzrost ekspresji genów, aczkolwiek efekt był zależny od genotypu rośliny. Podobnie jak w latach poprzednich, najwyższy poziom względnej ekspresji badanych genów obserwowano u trzech genotypów: brukwi ‘Wilhelmsburger’, jarmużu ‘Verheul’ oraz kapusty głowiastej ‘Kilaton F1’, a najniższy u rzepy ECD03, kapusty głowiastej ‘Binsachsner’, kapusty pekińskiej ‘Bilko F1’ oraz rzepaku ‘Mendel F1’. Względna ekspresja genu kodującego dysmutazę ponadtlenkową (SOD) u jarmużu ‘Verheul’,

kapusty głowiastej 'Kilaton F1' i brukwi 'Wilhelmsburger' była kilka do kilkunastu razy wyższa niż u pozostałych genotypów, jednak u żadnego z tych genotypów nie stwierdzono wzrostu ekspresji tego genu w czasie. Spadek ekspresji tego genu obserwowano u brukwi 'Wilhelmsburger'. W przypadku genu kodującego białko G, spadek względnej ekspresji nastąpił u kapusty głowiastej 'Kilaton F1'. Wzrost poziomu ekspresji genu kodującego białko RbohG (oksydazę NADPH) w czasie prowadzenia doświadczenia obserwowano u jarmużu 'Verheul' oraz kapusty głowiastej 'Kilaton F1'. U jednego genotypu — brukwi 'Wilhelmsburger' widać wyraźny wzrost ekspresji genu kodującego białko NPR1 w czasie infekcji. Także u kapusty głowiastej 'Binsachsner' obserwowano wzrost ekspresji tego genu, jednak ekspresja ta była na bardzo niskim poziomie. W przypadku rzepy ECD03 nie obserwowano zmian w ekspresji genu kodującego białko NPR1.

W temacie badawczym 3. kontynuowano analizę cDNA-AFLP dla badanych genotypów z wykorzystaniem 86 par starterów różnicujących. Wykazano, że u roślin infekowanych 41% produktów cDNA-AFLP ulegało nadekspresji, a 38% było wyciszonych, w porównaniu do roślin kontrolnych. Największą liczbę amplifikowanych fragmentów cDNA-AFLP otrzymano dla kapusty pekińskiej 'Bilko F1' oraz brukwi 'Wilhelmsburger'. Reamplifikowano oraz sekwencjonowano 50 produktów AFLP wykazujących zróżnicowaną ekspresję u roślin zainfekowanych i zdrowych (tab. 1). Analiza BLAST wykazała, że spośród genów ulegających nadekspresji u roślin infekowanych, 75% genów wykazywało homologię do genów kodujących znane białka roślinne zaangażowane w regulację ekspresji genów; transport komórkowy; budowę cytoszkieletu; transdukcję sygnału czy inne procesy komórkowe. Dla 7 z nich wykazano homologię do znanych białek zaangażowanych w reakcje odpornościowe u roślin: kinazę receptorową At5g24010, syntazę germakrenową, polimerazę RNA II, hydrolazę ABH, białko wiążące rybosomy, kinazę TMK1 oraz kinazę serynowo-treoninową cdc7. Spośród genów, które ulegały wyciszeniu u roślin infekowanych, dla połowy stwierdzono homologię do genów kodujących białka zaangażowane w regulację ekspresji genów, transport komórkowy, transdukcję sygnału, regulację cyklu komórkowego i inne procesy komórkowe.

Wystąpienie objawów choroby na odmianach uważanych za odporne oraz duża ilość spor w korzeniach świadczyć mogą, że odporność tych genotypów została przełamana przez patotyp Pb3, a badane genotypy nie są one odporne na kiłę kapusty, lecz charakteryzują się różnym poziomem tolerancji. Brak objawów choroby w początkowym okresie wzrostu roślin sugeruje konieczność zastosowania metod molekularnych lub oceny mikroskopowej włośników korzeni roślin jako wsparcia w wykrywaniu *P. brassicae*. Wykorzystując profilowanie transkrypcyjne zidentyfikowano szereg genów, których ekspresja jest związana z reakcją roślin z rodziny *Brassicaceae* na infekcję *P. brassicae*. Analiza BLAST wykazała, że geny te kodują białka zaangażowane w regulację ekspresji genów (24,4%), reakcje odpornościowe (17%), transport komórkowy (4,9%), budowę cytoszkieletu (4,9%), transdukcję sygnału (4,9%), regulację cyklu komórkowego (4,9%) oraz inne procesy komórkowe (17%).

Brassica sp.

Tabela 1

Profil ekspresyjny fragmentów cDNA-AFLP sekwencjonowanych w roku 2018, ich homologia i funkcja

Lp.	Fragment cDNA-AFLP	Startery AFLP	Wielkość produktu [pz]	Odmiana*	Homologia BLAST	E value	Funkcja
1	2	3	4	5	6	7	8
Nadekspresja w roślinach infekowanych <i>P. brassicae</i>							
1	103-189	P-CG/M-AA	151	rzepa ECD03, k. głowiasta 'Binsachsner', jarmuż 'Verheul', k. pekińska 'Bilko', rzepak 'Mendel'	Putative transposase-associated domain-containing protein, PRQ51341.1	1e ⁻⁰⁶	regulacja ekspresji genów
2	104-189**	P-CG/M-AA	361	rzepa ECD03, k. głowiasta 'Binsachsner', jarmuż 'Verheul', k. głowiasta 'Kilaton' rzepak 'Mendel'	Hypothetical protein, OLH56707.1	3e ⁻⁷²	nieznana
3	106-189	P-CG/M-AA	316	brukiew 'Wilhelmsburger', rzepa ECD03, rzepak 'Mendel'	Protein NRT1/PTR FAMILY, XM_010693332.2	0,27	transport komórkowy
4	110-189	P-CG/M-AA	322	jarmuż 'Verheul', rzepa ECD03, k. głowiasta 'Binsachsner', k. głowiasta 'Kilaton', rzepak 'Mendel'	brak homologii		
5	111-189	P-CG/M-AA	122	jarmuż 'Verheul', rzepa ECD03, k. głowiasta 'Binsachsner', k. pekińska 'Bilko', rzepak 'Mendel'	Unknown protein, EU024836.1	0,36	nieznana
6	112-189**	P-CG/M-AA	215	k. głowiasta 'Kilaton', rzepa ECD03, k. głowiasta 'Binsachsner', jarmuż 'Verheul', rzepak 'Mendel'	Fibronectin type III-containing domain protein, ENE80460.1	1e ⁻²³	inne (horizontalny transfer genów)
7	114-189	P-CG/M-AA	214	k. pekińska 'Bilko', k. głowiasta 'Binsachsner', jarmuż 'Verheul', rzepak 'Mendel'	Galacturonosyltransferase 13, XM_023040219.1	7,8	inne (synteza pektyn w ścianie komórkowej)
8	11-201**	P-CA/M-TC	123	jarmuż 'Verheul', rzepa ECD03, k. głowiasta 'Kilaton', k. pekińska 'Bilko'	Unkown protein from Plasmodium cynomolgi LT841381.1	8,6	nieznana
9	14-201	P-CA/M-TC	187	k. pekińska 'Bilko', brukiew 'Wilhelmsburger', k. głowiasta 'Binsachsner', k. głowiasta 'Kilaton', rzepak 'Mendel'	Probable receptor-like protein kinase At5g24010, XM_016864596.1	1,7	reakcje odpornościowe
10	1-201	P-CA/M-TC	164	rzepa ECD03, k. głowiasta 'Binsachsner', k. głowiasta 'Kilaton', k. pekińska 'Bilko'	Germacrene D synthase-like, XM_024344578.1	9e ⁻¹⁷	reakcje odpornościowe, patogeneza
11	34.1-183	P-AG/M-CA	334	rzepa ECD03, brukiew 'Wilhelmsburger', k. głowiasta 'Binsachsner', k. głowiasta 'Kilaton', k. pekińska 'Bilko'	Protein indeterminated-domain 11-like, XM_013829349.2	0,42	regulacja ekspresji genów
12	34.2-183	P-AG/M-CA	316	rzepa ECD03, brukiew 'Wilhelmsburger', k. głowiasta 'Binsachsner', k. głowiasta 'Kilaton', k. pekińska 'Bilko', rzepak 'Mendel'	brak homologii		

Brassica sp.

c.d. Tabela 1

1	2	3	4	5	6	7	8
13	35.1-183	P-AG/M-CA	519	rzepa ECD03, k. głowiasta 'Kilaton'	histone-lysine N-methyltransferase ATX5 isoform X3, XP_024437843.1	2e ⁻¹⁰	regulacja ekspresji genów
14	35.2-183	P-AG/M-CA	197	rzepa ECD03, k. głowiasta 'Kilaton', rzepak 'Mendel'	wybutosine-synthesizing protein 2/3/4, XM_011461686.1	3e ⁻⁰⁵	regulacja ekspresji genów (metylacja)
15	37-183	P-AG/M-CA	335	brukiew 'Wilhelmsburger', rzepa ECD03, k. głowiasta 'Binsachsner', k. głowiasta 'Kilaton', k. pekińska 'Bilko', rzepak 'Mendel'	formin-like protein 5, XP_023928560.1	7e ⁻⁰⁴	budowa cytoszkieletu
16	40.1-183	P-AG/M-CA	250	jarmuż 'Verheul', rzepa ECD03, k. głowiasta 'Kilaton'	eukaryotic translation initiation factor 2 subunit beta-like, XM_024327291.1	0,038	regulacja ekspresji genów
17	43-183	P-AG/M-CA	240	k. głowiasta 'Kilaton', brukiew 'Wilhelmsburger', k. głowiasta 'Binsachsner'	microtubule-associated protein futsch-like, XM_011460190.1	7e ⁻¹⁰	budowa cytoszkieletu
18	64-207	P-CA/M-CC	134	brukiew 'Wilhelmsburger', rzepa ECD03, k. głowiasta 'Binsachsner', jarmuż 'Verheul', k. pekińska 'Bilko', rzepak 'Mendel'	zinc finger CCCH domain-containing protein 15-like, XM_022120781.1	2,4	Regulacja ekspresji genów
19	67-207	P-CA/M-CC	315	jarmuż 'Verheul', rzepa ECD03, brukiew 'Wilhelmsburger', k. głowiasta 'Binsachsner', k. głowiasta 'Kilaton'	kinase non-catalytic C-lobe domain-containing protein 1 isoform X2, XP_004942222.3	3,5	transdukcja sygnału
20	68-207	P-CA/M-CC	138	k. pekińska 'Bilko', rzepa ECD03, brukiew 'Wilhelmsburger', k. głowiasta 'Binsachsner', jarmuż 'Verheul', rzepak 'Mendel'	ATP synthase subunit b, chloroplastic, PHT45330.1	0,66	inne (oddychanie komórkowe)
21	70-207	P-CA/M-CC	152	rzepak 'Mendel', rzepa ECD03, brukiew 'Wilhelmsburger', k. głowiasta 'Binsachsner', jarmuż 'Verheul'	mediator of RNA polymerase II transcription subunit 25, XM_024336364.1	6e ⁻¹⁹	reakcje odpornościowe
22	71-171	P-TA/M-TG	195	rzepa ECD03, brukiew 'Wilhelmsburger', k. głowiasta 'Binsachsner', k. głowiasta 'Kilaton'	cyclin-Y-like protein 1, XM_022469660.1	2,4	regulacja cyklu komórkowego
23	72-171	P-TA/M-TG	347	rzepa ECD03, k. pekińska 'Bilko', rzepak 'Mendel'	alpha/beta fold hydrolase, WP_073512592.1	4e ⁻⁵²	reakcje odpornościowe
24	75-171	P-TA/M-TG	132	brukiew 'Wilhelmsburger', rzepa ECD03, k. głowiasta 'Binsachsner', k. głowiasta 'Kilaton', k. pekińska 'Bilko'	cadmium/zinc-transporting ATPase HMA3-like, XM_021982942.1	1,4	inne (detoksyfikacja organizmu)
25	77-171	P-TA/M-TG	228	k. głowiasta 'Binsachsner', jarmuż 'Verheul', k. głowiasta 'Kilaton', k. pekińska 'Bilko'	ribosome-binding protein 1, XM_008224782.1	5,2	reakcje odpornościowe
26	79-171	P-TA/M-TG	208	jarmuż 'Verheul', k. głowiasta 'Binsachsner', k. głowiasta 'Kilaton', k. pekińska 'Bilko'	uncharacterized protein, XP_004309187.1	3e ⁻¹²	nieznana

Brassica sp.

c.d. Tabela 1

1	2	3	4	5	6	7	8
27	80-171	P-TA/M-TG	235	k. głowiasta 'Kilaton', rzepa ECD03, k. pekińska 'Bilko', rzepak 'Mendel'	pentatricopeptide repeat-containing protein, XM_004308198.1	6e ⁻¹⁴	regulacja ekspresji genów
28	83-171	P-TA/M-TG	169	k. pekińska 'Bilko', rzepa ECD03, k. głowiasta 'Binsachsner', k. głowiasta 'Kilaton'	unknown protein, LS992097.1	0,19	nieznana
29	122-247	P-GT/M-GG	269	rzepa ECD03, k. głowiasta 'Kilaton', rzepak 'Mendel'	receptor protein kinase TMK1, XP_008467095.1	4,5	reakcje odpornościowe
30	124-247	P-GT/M-GG	182	k. głowiasta 'Binsachsner', brukiew 'Wilhelmsburger', jarmuż 'Verheul'	brak homologii		
31	125-247	P-GT/M-GG	625	k. głowiasta 'Kilaton', rzepa ECD03, rzepak 'Mendel'	eukaryotic translation initiation factor 3 subunit C-like, XP_004299722.1	4e ⁻⁶⁰	regulacja ekspresji genów
32	127-247	P-GT/M-GG	387	rzepak 'Mendel', rzepa ECD03, k. głowiasta 'Kilaton', k. pekińska 'Bilko'	probable serine/threonine-protein kinase cdc7, XM_023900799.1	9,9	reakcje odpornościowe
wyciszenie w roślinach infekowanych <i>P. brassicae</i>							
33	105-189	P-CG/M-AA	294	rzepa ECD03, brukiew 'Wilhelmsburger', rzepak 'Mendel'	Unknown protein, LS992082.1	0,58	nieznana
34	107-189	P-CG/M-AA	279	brukiew 'Wilhelmsburger', rzepa ECD03, rzepak 'Mendel'	Uncharacterized protein, XM_022143086.1	3,3	nieznana
35	109-189	P-CG/M-AA	288	k. głowiasta 'Binsachsner', rzepa ECD03, jarmuż 'Verheul', k. głowiasta 'Kilaton', rzepak 'Mendel'	brak homologii		
36	113-189	P-CG/M-AA	254	k. głowiasta 'Kilaton', rzepa ECD03, k. głowiasta 'Binsachsner', jarmuż 'Verheul', rzepak 'Mendel'	brak homologii		
37	116-189	P-CG/M-AA	254	rzepak 'Mendel', rzepa ECD03, brukiew 'Wilhelmsburger', k. głowiasta 'Kilaton'	Galactokinase, XM_008225183.2	9e ⁻¹⁶	inne (metabolizm galaktozy)
38	12-201	P-CA/M-TC	141	jarmuż 'Verheul', rzepa ECD03, brukiew 'Wilhelmsburger', k. głowiasta 'Binsachsner', k. pekińska 'Bilko', rzepak 'Mendel'	brak homologii		
39	3-201	P-CA/M-TC	214	rzepa ECD03, brukiew 'Wilhelmsburger', k. głowiasta 'Binsachsner', k. głowiasta 'Kilaton', rzepak 'Mendel'	coatomer subunit beta'-2-like, XM_019392522.1	1,7	transport komórkowy
40	41.2-183	P-AG/M-CA	370	jarmuż 'Verheul', rzepa ECD03, brukiew 'Wilhelmsburger', k. głowiasta 'Binsachsner'	Asparagine synthetase domain-containing protein 1, OBZ84200.1	6,4	regulacja ekspresji genów
41	44.1-183	P-AG/M-CA	551	k. pekińska 'Bilko', k. głowiasta 'Kilaton'	protein TSS isoform X1, XP_013749627.1	5e ⁻⁸⁵	transdukcja sygnału
42	44.2-183	P-AG/M-CA	502	k. pekińska 'Bilko', rzepa ECD03, jarmuż 'Verheul',	hypothetical protein, KUM45774.1	5e ⁻⁰⁴	nieznana

Brassica sp.

c. d. Tabela 1

1	2	3	4	5	6	7	8
43	61-243	P-GT/M-TC	307	k. pekińska 'Bilko', rzepa ECD03, brukiew 'Wilhelmsburger'	Unknown protein, LS992088.1	8,9	nieznana
44	63-207	P-CA/M-CC	146	rzepa ECD03, brukiew 'Wilhelmsburger', k. głowiasta 'Binsachsner', jarmuż 'Verheul', k. pekińska 'Bilko', rzepak 'Mendel'	ATP synthase CF0 subunit III, YP_009341764.1	8e ⁻⁰⁵	inne (oddychanie komórkowe)
45	76-171	P-TA/M-TG	122	k. głowiasta 'Binsachsner', rzepa ECD03 jarmuż 'Verheul' k. głowiasta 'Kilaton', k. pekińska 'Bilko'	brak homologii		
46	66-207	P-CA/M-CC	196	k. głowiasta 'Binsachsner', k. pekińska 'Bilko'	G2/mitotic-specific cyclin S13-7-like, XM_011042436.1	0,4	regulacja cyklu komórkowego
47	73-171	P-TA/M-TG	150	rzepa ECD03, k. głowiasta 'Binsachsner', k. głowiasta 'Kilaton', k. pekińska 'Bilko'	prolyl endopeptidase-like, XM_020739840.1	6,3	inne (dojrzewanie i degradacja białek)
48	74-171	P-TA/M-TG	359	brukiew 'Wilhelmsburger', k. pekińska 'Bilko'	brak homologii		
49	78-171	P-TA/M-TG	102	k. głowiasta 'Binsachsner', rzepa ECD03, brukiew 'Wilhelmsburger', k. głowiasta 'Kilaton', k. pekińska 'Bilko'	WUSCHEL-related homeobox 13, XM_021749837.1	6,3	regulacja ekspresji genów
50	126-247	P-GT/M-GG	206	k. pekińska 'Bilko', rzepa ECD03, k. głowiasta 'Kilaton', rzepak 'Mendel'	FRIGIDA-like protein 4a, XM_023658571.1	0,025	inne (różnicowanie komórek)

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

** gen prawdopodobnie pochodzący od patogena

