

WOJCIECH SZCZUCHURA
MARZENA NOWAKOWSKA
URSZULA KŁOSIŃSKA
KATARZYNA NOWAK
KRZYSZTOF RUTKOWSKI

Instytut Ogrodnictwa

Kierownik Tematu: mgr Wojciech Szczuchura Instytut Ogrodnictwa, Pracownia Genetyki i Hodowli Roślin

Warzywnych, ul. Konstytucji 3 Maja 1/3, 96-100 Skierniewice, tel. 46 8346718,

e-mail: wojciech.szczuchura@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 96.

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

**Studies of cytological and biochemical mechanisms of plant resistance in the
pathosystems tomato — *Phytophthora infestans* and cucumber —
*Pseudoperonospora cubensis***

Słowa kluczowe: fitohormony, inhibitory biosyntezy etylenu, mączniak rzekomy, zaraza ziemniaka

Celem podjętego tematu jest wyjaśnienie biochemicznych i molekularnych podstaw odporności pomidora na *Phytophthora infestans* (Mont.) de Bary i ogórka — *Pseudoperonospora cubensis* [(Berk. et Curt.) Rostov.], sprawcy — odpowiednio — zarazy ziemniaka oraz mączniaka rzekomego. Badania prowadzone w 2018 roku miały natomiast na celu: (i) określenie zmian w poziomie ekspresji wybranych genów kodujących białka zaangażowane w mechanizmy obronne u pomidora w odpowiedzi na infekcję *P. infestans*, (ii) określenie roli etylenu w regulacji reakcji odpornościowych w procesie patogenezы i generowaniu reakcji odpornościowych u ogórka i pomidora, przed i po infekcji patogenami, oraz (iii) zbadanie możliwości indukcji systemicznej

odporności przy pomocy egzogennych fitohormonów: jasmonian metylu (Me-JA), kwasu salicylowego (SA) oraz kwasu DL- β -aminobutyrowego (BABA) w obu patosystemach.

WYNIKI

Analiza zmian w poziomie względnej ekspresji wybranych genów zaangażowanych w indukcję mechanizmów obronnych roślin pomidora przed patogenami, w tym: syntazy kalozy (*CalSyn*), białek związanych z patogenezą (PR, ang. pathogenesis related, *PR1*, *PR2*, *PR3*, *PR5*, *PR6*, *PR7*), markerów biosyntezy i transdukcji kwasu jasmonowego (*LOX2*, *AOS*, *AOC2*, *OPR3*) i kwasu salicylowego (*pAD4*, *cpr1*), oraz wakuolarniej endoproteazy (*VPE*). Obiektem badań było 5 linii dzikich gatunków pomidora zróżnicowanych pod względem reakcji na porażenie przez *P. infestans*: 'WV 700', LA 1604, L 3708, LA 1033 oraz LA 722 (Nowakowska i in., 2014). Dynamikę zmian ekspresji ww. genów analizowano w komórkach liści pomidora, przed i po inokulacji roślin *P. infestans* w różnych odstępach czasowych po: 2, 4, 6, 12, 24, 48, 72 godzinach od inokulacji (hpi). Zauważono różnice w poziomie ekspresji większości analizowanych transkryptów w zależności od poziomu odporności na *P. infestans* badanych linii. Niezależnie od badanego transkryptu bardzo zbliżony wzór zmian ekspresji odnotowano u linii LA 1604 i L 3708. U linii LA 1033 zaobserwowano wyraźną indukcję ekspresji genów *PR-1*, *PR-2* i *PR-5* począwszy od 2 lub 4 godziny po inokulacji. Podwyższony poziom ww. transkryptów zauważono również u podatnej linii LA 722, jednak w odróżnieniu od odpornej linii LA 1033 ich aktywacja następowała znacznie później, bo dopiero po 72 hpi. Warto jednak dodać, że poziom ekspresji badanych transkryptów w linii LA 722 był wielokrotnie wyższy w porównaniu z linią LA 1033. W przypadku pozostałych linii odpornych ('WV 700, L 3708, LA 1604) poziom akumulacji ww. transkryptów praktycznie nie zmieniał się w odpowiedzi na porażenie przez *P. infestans*. Podobne zależności zaobserwowano w przypadku poziomu ekspresji genów związanych z biosyntezą kwasu salicylowego (*pAD4*, *cpr1*). U trzech linii: WV 700, L 3708, LA 1604 zaobserwowano aktywację transkryptu *VPE* już w 4 godzinie po inokulacji, co może sugerować na występowanie reakcji nadwrażliwości w tych liniach. Na uwagę zasługują również podwyższony poziom ekspresji genu kodującego syntazę kalozy u linii LA 1033, którego maksymalny poziom występował w 48 hpi. U pozostałych linii pomidora poziom akumulacji tego transkryptu nie ulegał większym zmianom w odpowiedzi na inokulację roślin patogenem. Przeprowadzone w poprzednim roku dla pięciu populacji ogórka (trzy odporne: 'Ames 2354', PI 197088, PI 330628, dwie podatne: PI 175695, 'Coolgreen') analizy ekspresji wybranych genów: *PAL*, *LiPOX*, *CalSyn*, *PR1b*, *PR2a*, *PR2b*, *PR3a*, *PR3b*, *PR5*, *PR7*, *MT2bL-1*, *LOX2*, *AOS*, *AOC2*, *OPR3*, *PDF1.2*, *pAD4*, *cpr1*, *VPE* związanych z reakcją na porażenie *P. cubensis* wykazały, że w genotypach podatnych (PI 175695, 'Coolgreen') do aktywacji badanych genów dochodziło po 36 hpi, natomiast w liniach odpornych: 'Ames 2354', PI 197088, PI 330628 ich akumulacja następowała wcześniej, bo już w 8 hpi. Szczególnie wyraźnie ten trend był obserwowany dla transkryptów *PR2*, *PR3* i *PR5*. Należy jednak dodać, że podobnie jak w przypadku podatnej linii pomidora, ekspresja ww. transkryptów u roślin genotypów podatnych była

zdecydowanie większa w porównaniu do linii odpornych. Stwierdzono także wyższy poziom ekspresji syntazy kalozy w liniach odpornych w porównaniu do obiektów podatnych. Na uwagę zasługuje również to, że u 'Ames 2354' i PI 175695 odnotowano wzmożoną indukcję transkryptu *VPE*. Znakowanie fluorescencyjne DCF-DA pozwoliło na wykrycie nagromadzenia reaktywnych form tlenu w zainfekowanych tkankach ogórka.

Celem określenia roli etylenu w regulacji reakcji odpornościowych w procesie patogenezы i generowaniu reakcji odpornościowych, rośliny obu gatunków przed inokulacją patogenami potraktowano inhibitorami jego biosyntezy: aminotoksywinyloglicyną (AVG) oraz tiosiarczanem srebra (STS). W przypadku ogórka, u wszystkich badanych odmian/linii niezależnie od ich poziomu odporności na *P. cubensis* (odporne: 'Ames 2354', PI 197088, PI 330628, podatna PI 175695) potraktowanie roślin przed inokulacją roztworem AVG ograniczyło produkcję etylenu w porównaniu do kontroli (rośliny nietraktowane inhibitorem, ale opryskane inokulum), nie miało jednak wpływu na stopień porażenia roślin przez patogena. W wyniku opryskania roślin roztworem STS odnotowano wzrost produkcji etylenu w porównaniu do kontroli, przy czym był on zdecydowanie większy w przypadku linii odpornych (5 do 10 razy). U wszystkich linii STS wpłynął korzystnie na zmniejszenie objawów mączniaka rzekomego, co szczególnie było widoczne u roślin podatnej linii PI 175695. Podobne zależności w zakresie stosowania AVG i STS stwierdzono w przypadku pomidora. Oprysk AVG ograniczył produkcję etylenu nie wpływając jednak na stopień porażenia roślin przez *P. infestans*. Natomiast potraktowanie roślin roztworem STS było bardziej efektywne prowadząc do zmniejszenia objawów zarazy ziemniaka u wszystkich badanych linii pomidora ('WV 700', LA 1604, L 3708, LA 1033, LA 722).

Oceniano również wpływ egzogennie podanych: SA, Me-JA i BABA na przebieg patogenezы i indukcję odporności na *P. cubensis* u ogórka (PI 175695 i 'Coolgreen') oraz na *P. infestans* u pomidora ('Rumba', LA 722). Niezależnie od badanego patosystemu, opryskiwanie roślin przed inokulacją zarówno roztworem SA (1 mM), jak i Me-JA (1.7 mM) nie miało wpływu na stopień porażenia roślin przez *P. cubensis* i *P. infestans*. Zarówno rośliny traktowane, jak i nie nietraktowane ww. substancjami cechowały się podobnym, wysokim stopniem porażenia w testach fitopatologicznych. Badania z zastosowaniem kwasu DL- β -aminobutyrowego w stężeniu 2000 $\mu\text{g/l}$ (BABA) przeprowadzone na dwóch odmianach ogórka (PI 175695 i 'Coolgreen') wykazały jego istotny wpływ na zwiększenie odporności odmian podatnych. Dwukrotne potraktowanie roślin przed inokulacją patogenem roztworem BABA spowodowało ograniczenie objawów mączniaka w stosunku do kontroli o odpowiednio 60 (PI 175695) i 45% ('Coolgreen'), po 7 dpi. W przeciwieństwie do ogórka, w przypadku pomidora nie stwierdzono korzystnego wpływu roztworu BABA (1000 $\mu\text{g/l}$) na nasilenie objawów zarazy ziemniaka u obu testowanych odmian.

WNIOSKI

1. Dla każdego z badanych patosystemów, poziom ekspresji wybranych do badań genów był zależny od poziomu odporności testowanych linii/odmian. Generalnie

aktywacja genów kodujących białka zaangażowane w mechanizmy obronne u pomidora i ogórka takich jak: *PR1*, *PR3*, *PR5*, *cpr1*, *pad4*, w odpowiedzi na infekcję odpowiednio *P. infestans* oraz *P. cubensis* następowała szybciej w liniach/odmianach odpornych niż w podatnych.

2. Wzrost poziomu reaktywnych form tlenu oraz wzrost ekspresji transkryptu *VPE* obserwowany u 'Ames 2354' i PI 175695 w odpowiedzi na inokulację roślin *P. cubensis* może wskazywać na występowanie u tych linii odporności typu HR.
3. Szybka aktywacja (4 hpi) oraz nadekspresja transkryptu *VPE* w WV 700, L 3708, LA 1604 może świadczyć o reakcji nadwrażliwości w badanych liniach pomidora.
4. Potraktowanie roślin pomidora i ogórka przed inokulacją patogenami roztworem STS spowodowało indukowanie odporności u odmian podatnych. Znaczny wzrost produkcji etylenu na skutek potraktowania roślin roztworem STS może sugerować, iż etylen może uczestniczyć w mechanizmach odpornościowych.
5. Ani jasmonian metylu ani kwas salicylowy nie indukuje odporności pomidora na zarazę ziemniaka i ogórka na mączniaka rzekomego. Zastosowanie roztworu BABA miało korzystny efekt na ograniczenie objawów mączniaka rzekomego u ogórka, natomiast u pomidora nie indukowało mechanizmów odporności u roślin podatnych.

LITERATURA

- Nowakowska M., Nowicki M., Kłosińska U., Maciorowski R., Kozik E. U. 2014. Appraisal of artificial screening techniques of tomato to accurately reflect field performance of the late blight resistance. PLoS One, October 3, 2014.