

STRESZCZENIE

Identyfikacja genów związanych z reakcją roślin z rodzaju *Brassica* na infekcję przez *Plasmodiophora brassicae*

Kiła kapusty wywoływana przez *Plasmodiophora brassicae* Wor. stanowi ogromne zagrożenie dla upraw warzyw kapustnych oraz plantacji rzepaku w Polsce i na świecie. *P. brassicae* jest bezwzględny pasożytem wyniszczającym system korzeniowy roślin żywicielskich. Choroba ta jest trudna do zwalczania, ze względu na brak zarejestrowanych fungicydów. Straty powodowane przez chorobę można jedynie ograniczać poprzez stosowanie preparatów poprawiających kondycję roślin, a także przez stosowanie metod agrotechnicznych. Dlatego duże szanse na ograniczenie rozprzestrzeniania się choroby upatruje się w uprawie odmian o małej podatności na porażenie przez patogena.

Odporność na kiłę kapusty u *Brassica* na konkretny patotyp patogena (warunkowana przez pojedynczy gen lub kombinację kilku genów) może zostać szybko przełamana na skutek adaptacji patogena w warunkach intensywnej uprawy. Z kolei odporność na różne typy patogena (warunkowana przez wiele genów) jest trudniejsza do przełamania, lecz hodowla roślin z tego typu odpornością jest skomplikowana, ponieważ wymaga skumulowania wielu genów w jednym genotypie. Uzyskanie roślin odpornych na kiłę kapusty jest przedmiotem prac hodowlanych, jednak skomplikowane relacje genetyczne pomiędzy gatunkami z rodzaju *Brassica*, duża zmienność genetyczna patogena oraz jego zdolność do przełamania odporności, znacznie utrudniają prace hodowlane. Utrudnia je także ograniczona wiedza zarówno o mechanizmach odporności na kiłę kapusty, jak i markerach molekularnych pomocnych przy wczesnej selekcji genotypów mało podatnych na porażenie.

Celem prezentowanych badań było pogłębienie wiedzy na temat molekularnych mechanizmów odporności na kiłę kapusty.

Materiał roślinny do badań stanowiły rośliny z rodzaju *Brassica*: siedem genotypów opisanych w literaturze jako mało podatne na porażenie: *B. rapa* (ECD03 – rzepa, ‘Bilko F1’ – kapusta pekińska), *B. oleracea* (‘Kilaton F1’, ‘Bindsachsener’ – kapusty głowiaste, ‘Verheul’ – jarmuż), *B. napus* (‘Mendel F1’ – rzepak, ‘Wilhelmsburger’ – brukiew); oraz jeden genotyp *B. rapa* (‘Granaat’ – kapusta chińska), uznawany za podatny na porażenie przez wszystkie poznane patotypy patogena. Do badań wykorzystano patotyp 2 *P. brassicae* (Pb2). Rośliny inokulowano poprzez wysiew nasion do zainfekowanego podłoża. Kontrolę stanowiły rośliny rozwijające się z nasion wysianych w kuwetach z podłożem wolnym od patogena. Materiał do badań w postaci korzeni roślin pobierano po 10, 20 i 35 dniach po inokulacji (DPI). Wykonano ocenę makroskopową na obecność symptomów choroby, a także molekularną analizę obecności patogena w korzeniach roślin. Do identyfikacji genów związanych z reakcją roślin na porażenie zastosowano technikę cDNA-AFLP z wykorzystaniem 256 par starterów różnicujących. Profile ekspresji porównywano a różnicujące je produkty (ulegające nadekspresji lub wyciszeniu) sekwencjonowano oraz poddano analizie podobieństwa sekwencji

do znanych genów zdeponowanych w bazie danych NCBI oraz mapowano na referencyjny genom kapusty *B. rapa*. Wytypowano geny kandydujące związane z reakcjami odpornościowymi i przeprowadzono ich walidację metodą real-time PCR określając względny poziom ekspresji genów normalizowany w stosunku do genu referencyjnego.

Na podstawie indeksu porażenia (DI) badane genotypy podzielono na trzy grupy: 1) wykazujące małą podatność / wysoką odporność: *B. oleracea* 'Kilaton F1', *B. napus* 'Wilhelmsburger', *B. rapa* ECD03 i *B. rapa* 'Bilko F1'; 2) wykazujący średnią podatność / tolerancję genotyp: *B. napus* 'Mendel F1'; 3) wykazujące wysoką podatność / przełamanie odporności genotypy: *B. oleracea* 'Verheul' i *B. oleracea* 'Bindsachsener'.

Analiza transkryptomów wykazała, że podczas infekcji w zależności od genotypu, nadekspresji ulegało od 37,6% do 48,2% transkryptów, a wyciszeniu od 31,8% do 42,4% transkryptów. Zidentyfikowano i przeprowadzono analizę podobieństwa sekwencji dla 150 transkryptów o zróżnicowanej ekspresji (EST). Wśród EST ulegających nadekspresji u genotypów infekowanych 69,3% EST wykazywało podobieństwo do sekwencji genów kodujących znane białka związane z regulacją ekspresji genów, reakcjami odpornościowymi, transportem komórkowym, budową cytoszkieletu, transdukcją sygnału, regulacją cyklu komórkowego czy potranslacyjnymi modyfikacjami białek; 8% EST wykazywało podobieństwo do genów kodujących białka o funkcji dotąd nieznannej; dla 18,7% EST nie znaleziono podobieństwa do żadnej z sekwencji genów z bazy danych GenBank.

Walidacji poddano 45 genów kandydujących wykazujących podobieństwo do genów kodujących następujące grupy białek: odpornościowe z domeną TIR-NBS-LRR; kinazy serynowo-treoninowe, białka związane z reakcjami odpornościowymi, transdukcją sygnału, regulujące cykl komórkowy, związane z transportem komórkowym, regulujące ekspresję genów, związane z budową cytoszkieletu, hydrolazy i dehydrogenazy i białka związane z syntezą metabolitów wtórnych. Wykazano, że różnice w ekspresji dotyczyły zarówno etapów infekcji (pierwotnej i wtórnej), jak i badanych genotypów (o niskiej i wysokiej podatności). Podczas infekcji pierwotnej, nadekspresji ulegały jedynie pojedyncze geny kandydujące, niezależnie od poziomu odporności badanych genotypów. We wczesnej fazie infekcji wtórnej (20 DPI), obserwowano wzrost ekspresji genów kodujących białka odpornościowe z domeną TIR-NBS-LRR oraz kinazy serynowo-treoninowe, zarówno u genotypów odpornych, jak i u genotypu określonego w niniejszych badaniach jako tolerancyjny. W fazie infekcji wtórnej, analizowane profile ekspresyjne różniły się znacznie pomiędzy genotypami o różnym stopniu podatności. U genotypów odpornych/mało podatnych obserwowano nadekspresję genów kodujących białka odpornościowe, kinazy, hydrolazy, dehydrogenazy, cykliny, transportery oraz białka związane z cytoszkieletem. Natomiast u genotypów wysoce podatnych następował spadek ekspresji badanych genów kandydujących.

Na markery molekularne wytypowano tzw. markery funkcjonalne – 28 EST wysoko skorelowanych z odpornością roślin. Wśród EST negatywnie skorelowanych ze wskaźnikiem DI znajdują się EST homologiczne do genów kodujących białka odpornościowe (białka N, PDCD1; kinazy At5g24010 i cdc7; proteazę SBT3.3; dehydrogenazę B7; hydrolazę Sgpp; syntazę germakrenu D; białka

z domeną SNARE oraz wiążące rybosomy), a także białka związane z transdukcją sygnału (błonowy receptor KCTD8; fosfataza PP1R26); transportem komórkowym (transporter 4 i NRT1/PTR); regulacją ekspresji genów (metylotransferazy PMT24 i ATX5; czynniki transkrypcyjne bHLH118 oraz ERF109; białka PPR i ZAT5); regulacją cyklu komórkowego (cyklina Y) oraz budową cytoszkieletu (formina 3 i białko związane z mikrotubulami). Natomiast wśród EST dodatnio skorelowanych ze wskaźnikiem DI znajdują się EST homologiczne do genów kodujących między innymi: dioksygenazę flawanonu oraz białko związane z regulacją ekspresji genów (podjednostkę polimerazy RNA). Wszystkie sekwencje potencjalnych markerów funkcjonalnych były homologiczne do sekwencji znajdujących się w genomie referencyjnym *B. rapa*, a 68% sekwencji lokalizowało się w obrębie znanych i anotowanych genów. Najwięcej fragmentów mapowało się na chromosomie A06, A10 i A07; najmniej – na chromosomie A04. Analiza funkcjonalna genów (Gene Ontology) wykazała, że większość badanych EST bierze udział w odpowiedzi na stres abiotyczny, transporcie a także organizacji cytoszkieletu i potranslacyjnych modyfikacjach białek. Badanym sekwencjom przypisano głównie aktywności enzymatyczne transferazy, hydrolazy oraz transporterów. A większość zidentyfikowanych sekwencji kodowało białka zlokalizowane głównie w błonie komórkowej, jądrze komórkowym, chloroplastach oraz cytoplazmie.

Podsumowując, potwierdzono, że odporność roślin z rodzaju *Brassica* na kiłę kapusty oznaczona w stosunku do jednego patotypu *Plasmodiophora brassicae* może zostać przełamana przez inny patotyp patogena. Infekcja powodowana przez *P. brassicae* u badanych genotypów roślin z rodzaju *Brassica* powoduje zmianę ekspresji wielu genów. Zidentyfikowano geny, które kodują białka związane niemal z każdym etapem reakcji obronnej: rozpoznaniem patogena, transdukcją sygnału (poprzez kaskady sygnałowe) i odpowiedzią obronną związaną z wytwarzaniem reaktywnych form tlenu i metabolitów wtórnych, związków antagonistycznych wobec patogena, czy wzmocnieniem ścian komórkowych. Pośród zidentyfikowanych genów znajdują się te, które bezpośrednio zaangażowane są w reakcje obronne roślin oraz w interakcje zachodzące pomiędzy żywicielem a patogenem. Wykazano, że mechanizm odporności na kiłę kapusty roślin z rodzaju *Brassica* jest złożony i najprawdopodobniej związany z odpornością systemiczną nabytą (SAR), lecz także z reakcją nadwrażliwości (HR) i programowaną śmiercią komórki (PCD).

Dogłębne zrozumienie procesów zachodzących w patosystemie roślina – patogen może w przyszłości umożliwić opracowanie lepszej strategii walki z chorobą poprzez wprowadzenie do uprawy odmian gatunków kapustowatych o wysokim stopniu odporności na kiłę kapusty. Zidentyfikowana pula genów ulegająca zróżnicowanej ekspresji pod wpływem infekcji patogenem wzbogaca wiedzę na temat genów zaangażowanych w reakcje odpornościowe a kandydujące geny markerowe mogą stanowić bazę do poszukiwania markerów do selekcji genotypów o pożądanых cechach (odporności na kiłę kapusty). Może to przełożyć się na skrócenie cyklu hodowlanego i zwiększenie efektywności wytwarzania nowych genotypów roślin ogrodniczych.

SUMMARY

Identification of genes related to response of *Brassica* plants to infection by *Plasmodiophora brassicae*

Clubroot disease caused by *Plasmodiophora brassicae* Wor. inflicts heavy losses in *Brassica* vegetable crops and canola plantations in Poland and worldwide. *P. brassicae* is an absolute (obligate) parasite that destroys the root system of host plants. The disease is difficult to control due to the lack of registered fungicides. The losses caused by the disease can only be reduced through the use of preparations that improve the plants' condition and by agronomic treatments. Therefore, one of the priorities in *Brassica* breeding programmes is generation of genotypes resistant to clubroot. The clubroot resistance to a particular pathogen's pathotype (usually conditioned by a single gene or a set of several genes) can be quickly overcome by the pathogen's adaptation under intensive cultivation conditions. In contrast, resistance conditioned by multiple genes is more difficult to overcome, but breeding plants with this type of resistance is complicated. This requires the pyramiding of many genes in a single genotype. Thus, it is necessary to search for new sources of resistance useful in breeding, however the complex genetic relationships between different *Brassica* species, the high genetic diversity of the pathogen and its ability to rapidly overcome genetic resistance of the plants make breeding work hampered. The progress is also hampered by limited knowledge of both clubroot resistance mechanisms and molecular markers used for early selection of resistant genotypes.

The aim of presented study is to enhance the knowledge of molecular mechanism of resistance to the clubroot disease.

The study was done on seven *Brassica* genotypes described in the literature as resistant to clubroot: *B. rapa* (ECD03 – turnip, 'Bilko F1' – chinese cabbage), *B. oleracea* ('Kilaton F1', 'Bindsachsener' – head cabbage, 'Verheul' – kale), *B. napus* ('Mendel F1' – canola, 'Wilhelmsburger' – swede); and on one *Brassica* genotype susceptible to all known *P. brassicae* pathotypes (*B. rapa* 'Granaat' – chinese cabbage). *Plasmodiophora brassicae* pathotype 2 (Pb2) was used for the study for the plant inoculation. Plant seeds were sown in cuvettes filled with peat substrate contaminated with *P. brassicae* inoculum. Control seeds were sown in cuvettes with not-contaminated substrate. Root samples for analyses were collected 10, 20 and 35 days after seed inoculation (DPI). The macroscopic observations of disease symptoms on the plant roots and molecular analysis of the pathogen presence in plant roots were done. To identify genes associated with plant's response to infection, cDNA-AFLP method using 256 primer pairs was used. AFLP products (expressed sequence tags, ESTs) showing differential expression were reamplified and sequenced and their homology to sequences of known genes deposited in the NCBI database was analysed. Candidate genes related to plant resistance were selected and validated by determining their relative expression levels using real-time PCR and subsequently were mapped onto *B. rapa* reference genome.

Based on the disease index (DI), the tested genotypes were divided into three groups showing: 1) low susceptibility (highly resistant genotypes): *B. oleracea* 'Kilaton F1', *B. napus* 'Wilhelmsburger', *B. rapa* ECD03 and *B. rapa* 'Bilko F1'; 2) medium susceptibility (tolerant genotypes): *B. napus* 'Mendel F1'; 3) high susceptibility (resistance-breaking genotypes): *B. oleracea* 'Verheul' and *B. oleracea* 'Bindsachsener'.

Transcriptome analysis showed that during infection, depending on the genotype, 37.6% to 48.2% of the transcripts were overexpressed, and 31.8% to 42.4% were silenced. From ESTs obtained from analyses, 150 gene transcripts (ESTs) whose expression is modulated during infection *P. brassicae* Pb2 have been identified. Among ESTs overexpressed in infected genotypes, 69.3% showed homology to the sequences of the known genes encoding the proteins involved in the regulation of gene expression, defense reactions, cell transport, cytoskeletal structure, signal transduction, cell cycle regulation and post-translational protein modifications. 8% of the ESTs showed homology to genes encoding proteins with unknown functions and for 18.7% of the ESTs no homology was found to any of the gene sequences deposited in the GenBank database.

In this study, 45 candidate genes were validated. They are homologous to the genes encoding the proteins belonging to the following groups: resistance proteins with TIR-NBS-LRR domain; serine/threonine kinases; proteins related to disease responses, signal transduction, cell cycle regulation, cellular transport, regulation of gene expression, cytoskeleton structure; hydrolases and dehydrogenases, and proteins involved in secondary metabolites synthesis. It was shown that the differences in expression were related to both the stages of infection (primary and secondary) and the genotypes tested (low and high susceptibility). During primary infection, only single candidate genes were overexpressed, regardless of the level of susceptibility of the tested genotypes. During the early phase of secondary infection (20 DPI), an increase in the expression of genes encoding TIR-NBS-LRR proteins and serine/threonine kinases was observed in both resistant and tolerant genotypes. During the secondary infection phase, the expression profiles of the analyzed genes differed significantly between genotypes depending on their resistance level to clubroot. Overexpression of genes encoding resistance proteins, kinases, hydrolases, dehydrogenases, cyclins, transporters and cytoskeleton-related proteins was observed in resistant genotypes. In contrast, in highly susceptible genotypes, a decreased expression of the candidate genes was observed.

In the presented study, 28 ESTs highly correlated with plant resistance were selected as molecular, functional markers. Among the ESTs negatively correlated with the DI were these homologous to genes encoding resistance proteins (N-like, PDCD1; At5g24010 and cdc7 kinases; SBT3.3 protease; aldehyde dehydrogenase B7; Sgpp hydrolase; germacrene D synthase; SNARE domain proteins and ribosome binding proteins) and also proteins related to signal transduction (KCTD8 protein, PP1R26 phosphatase), cell transport (NRT1/PTR and transporter 4), gene expression regulation (PMT24 and ATX5 methyltransferases, bHLH119 and ERF109 transcription factors, PPR and ZAT5 proteins), cell cycle regulation (cyclin Y) and cytoskeleton structure (formin 3 and microtubule-associated protein). In the case of the ESTs positively correlated with the DI index, they were

homologous to genes encoding, among others: flavanone dioxygenase and the protein associated with the regulation of gene expression (RNA polymerase subunit).

Functional gene analysis (Gene Ontology) showed that most of the ESTs studied were involved in the abiotic stress response, transport, cytoskeletal organization and post-translational modifications of proteins. The ESTs studied were mainly related to the enzymatic activities of transferases, hydrolases and transporters, and were located mainly in the cell membrane, cell nucleus, chloroplasts and cytoplasm.

All sequences of the potential functional markers were homologous to sequences found in the *B. rapa* reference genome, and 68% of the sequences were located within known and annotated genes. The largest number of ESTs were assigned to A06, A10 and A07 chromosomes; only a few fragments were assigned to A04 chromosome.

In conclusion, it was confirmed that the resistance of *Brassica* plants to clubroot determined against one pathotype of *Plasmodiophora brassicae*, can be overcome by another pathogen pathotype. *P. brassicae* infection of the *Brassica* plants causes changes in the expression of many genes. In the present study, genes that encode proteins associated with almost every step of the defense response: pathogen recognition, signal transduction (via signaling cascades) and the defense response associated with the production of reactive oxygen species and secondary metabolites, compounds antagonistic to the pathogen, or cell wall strengthening were identified. Among the identified genes are these that are directly involved in plant defense responses and in host-pathogen interactions. The mechanism of resistance to clubroot of *Brassica* plants has been shown to be complex and most likely related to systemic acquired resistance (SAR), but also to the hypersensitive response (HR) and programmed cell death (PCD).

Understanding the processes within the plant-pathogen pathosystem may, in the future, make it possible to develop better strategies to control the disease by introducing cultivars with a high degree of resistance to clubroot. The identified pool of genes differentially expressed under pathogen infection enriches the knowledge of the genes involved in the immune responses and candidate marker genes can provide a basis for searching for markers useful for selecting genotypes with desirable traits (resistance to clubroot). This may shorten the breeding cycle and increase the efficiency of producing new genotypes of horticultural plants.