Tytuł

„Zastosowanie badań asocjacyjnych całego genomu, metod profilowania transkryptomu oraz genetyki funkcjonalnej do wyjaśnienia udziału poszczególnych genów w kształtowaniu cech odporności bądź wrażliwości na kiłę kapusty".

Streszczenie

Kiła kapusty wywołana przez obligatoryjnego biotrofa *Plasmodiophora brassicae* stanowi jeden z bardziej poważnych czynników powodujących utratę plonu roślin kapustowatych. Najbardziej korzystną metodą zapobiegania temu zjawisku jest wykorzystanie odmian odpornych. Ze względu na coraz bardziej powszechne występowanie ras patogenu, mogących przełamać odporności genetyczne wykorzystywane w aktualnie uprawianych odmianach, poznanie oraz dalsza charakterystyka stabilnych mechanizmów odporności jest zadaniem priorytetowym.

W niniejszej pracy wykorzystano kolekcję 142 ekotypów rzodkiewnika (*Arabidopsis thaliana* L.) w celu identyfikacji czynników genetycznych, mogących mieć związek z niepodatnością na dominujący aktualnie w Polsce patotyp *P. brassicae.* Dzięki zastosowaniu badania asocjacyjnego całych genomów (*ang. Genome Wide Association Study – GWAS*) zidentyfikowano dwa loci statystycznie istotnie powiązane z odpornością. Jeden z wytypowanych rejonów u genotypów rzodkiewnika Uod-1 oraz Est-1 zawierał gen *RPB1* (*ang. Resistance to Plasmodiophora brassicae1*) oraz jego homologi, podczas gdy drugi znajdował się w sekwencji kodującej genu *RAC1 (Resistance to Albugo candida 1)*, którego produktem jest receptor typu TIR-NB-LRR (*ang. Toll/Interleukin-1 Receptor Nucleotide-Binding site Leucine-Rich Repeat*). Udział czynnika RPB1 w odporności roślin na kiłę kapusty potwierdzono poprzez analizę mutantów typu utraty funkcji, wygenerowanych w niepodatnych genotypach Uod-1 oraz Est-1 przy pomocy techniki edycji genomów CRISPR/Cas9 (ang. *Clustered Regularly Interspaced Short Palindromic Repeats and CRISPR-Associated protein 9*). W uzyskanych mutantach *rpb1* obserwowano typowe symptomy choroby oraz akumulację patogenu, określoną poprzez pomiar DNA, porównywalną do wrażliwego genotypu kontrolnego Col-0.

Gen *RPB1* koduje niewielkie (148 aa, 16,0 kDa) białko transmembranowe, którego funkcja, czy też homologia do innych genów, jest na dzień dzisiejszy nieznana. Sekwencja kodująca tego genu jest obecna w wielu z badanych przez nas ekotypach i wykazuje stosunkowo duży stopień zakonserwowania podczas gdy sekwencja promotorowa wykazuje duże

zróżnicowanie. W genotypach odpornych transkrypcja genu *RPB1* nasila się po inokulacji *P. brassicae* i ma to związek z indukcją ekspresji genów odpowiedzialnych za reakcje obronne rośliny takich jak np. *PR5* (*Pathogenesis Related 5*) czy *CYP71A13 (Cytochrome P450 Monooxygenase 71A13*). Przejściowa ekspresja tego genu w liściach tytoniu (*Nicotiana tabacum* L.) uruchamiała odpowiedź typu nadwrażliwości (*ang. Hypersensitive Response HR*), co dodatkowo potwierdza hipotezę, w której zakładamy że jest on czynnikiem stymulującym odpowiedzi obronne. Linie delecyjne *rpb1* zachowują swą zdolność do odpowiedzi na inokulację (co obserwowano jako powstawanie niepełnego, niefunkcjonalnego transkryptu), jednakże nie prowadzi to do dalszej indukcji odpowiedzi obronnych. Powyższy fakt wskazuje na to, że białko RPB1 raczej nie jest zaangażowane w rozpoznanie patogenu, choć jest kluczowym elementem dla reakcji odporności.

Podczas poszukiwania odpornych ekotypów stwierdzono, że genotyp Pro-0 przejawiał mniej nasilone objawy choroby i akumulował wyższy poziom DNA patogenu. Postanowiono dokładniej przyjrzeć się temu zjawisku, w tym celu przeprowadzono porównawcze analizy histologiczne oraz transkryptomiczne dla wrażliwych ekotypów Col-0 oraz Pro-0. Stwierdzono, że hipokotyle formy Pro-0 zawierają wyższą proporcję ksylemu w stosunku do swej powierzchni a podczas obserwacji przekrojów pochodzących z roślin zainfekowanych stwierdzono, że rozwój tej tkanki jest w znacznie mniejszym stopniu zaburzony niż u ekotypu Col-0. Porównawcza analiza transkryptomiczna wykazała, że dynamika przeprogramowania rośliny przez patogen jest niższa u formy Pro-0. Można to stwierdzić na podstawie przebiegu powstawania narośli, w którym wyróżnia się fazę proliferacji, ściśle powiązaną z zaburzeniem różnicowania ksylemu oraz późniejszą fazę wzrostu, w której następuje spadek tempa podziałów komórkowych. Na podstawie zmiany transkrypcji genów związanych z postępem cyklu komórkowego oraz różnicowaniem ksylemu stwierdzono, że podczas gdy narośla formy Pro-0 są w stadium proliferacji u roślin Col-0 struktury te znajdują się w już fazie wzrostu. W związku z tym sformułowano hipotezę, według której różnice we wzroście i rozwoju rośliny żywicielskiej, zwłaszcza te w obrębie tkanki przewodzącej, mogą mieć istotne znaczenie dla postępu kiły kapusty. Dalsze zrozumienie tego zagadnienia oraz możliwości praktyczne jego wykorzystania wymagają dokładnego poznania roli poszczególnych genów odpowiedzialnych za regulację procesów rozwojowych rośliny.

Na podstawie przeprowadzonych eksperymentów oraz analizy ich wyników stwierdza się, że poprzez eksplorację naturalnej zmienności roślin rzodkiewnika zidentyfikowano czynniki

pełniące istotną rolę w odporności tego gatunku na kiłę kapusty oraz opisano możliwe mechanizmy związane z różnicami w przebiegu choroby u genomów podatnych.