

Daniel Kuźnicki

Temat pracy doktorskiej:

## **Dziedziczenie nabytej odporności systemicznej ziemniaka (*Solanum tuberosum* L.) na *Phytophthora infestans* (Mont.) de Bary**

### **Streszczenie**

Ziemniak jako jedna z czterech najważniejszych roślin uprawnych, obok ryżu, pszenicy i kukurydzy, stanowi kluczowe źródło pożywienia dla ludności na świecie. Wśród wielu agrofagów atakujących uprawy ziemniaka we wszystkich niemal regionach świata dominuje sprawca zarazy ziemniaka, organizm grzybopodobny *Phytophthora infestans*. Straty spowodowane tym patogenem na nieodpowiednio chronionych plantacjach dochodzą do 70% plonu, przy czym w szczególnie niekorzystnych warunkach patogen ten jest w stanie zniszczyć nawet 100% plonu. Dodatkowo surowe przepisy europejskie dążą do redukcji liczby

i różnorodności pestycydów dostępnych dla rolnictwa, a niechęć wobec GMO uniemożliwia wprowadzenie modyfikowanych genetycznie upraw o podwyższonym stopniu odporności wobec niekorzystnych warunków środowiskowych. Dlatego trwałe utrzymanie wzrostu produktywności rolnictwa wymaga podjęcia nowych strategii w ochronie upraw.

Odpowiednim rozwiązaniem może być stymulacja endogennych mechanizmów obronnych rośliny w ramach SAR, czyli nabytej odporności systemicznej. W efekcie SAR roślina narażona na stres pierwotny bądź działanie induktora chemicznego, uruchamia w odpowiedzi na stres wtórny szereg szybkich i skutecznych reakcji obronnych. Tak nabyty stan podwyższonej gotowości obronnej, kontrolowany wielogenowo, jest skuteczny względem szerokiego spektrum zagrożeń biologicznych. SAR może utrzymywać się przez długi okres czasu od wystąpienia początkowej indukcji, a także może ulegać transmisji do kolejnych pokoleń, w co zaangażowane są mechanizmy epigenetyczne. To długotrwałe utrzymanie stanu podwyższonej gotowości obronnej, nosi obecnie nazwę „pamięci stresowej” roślin i może stanowić potencjalne źródło dla przyszłych strategii integrowanej ochrony upraw rolniczych.

W niniejszej pracy wykazano, że badana odmiana ziemniaka Sarpo Mira, indukowana 5 mM kwasem  $\beta$ -aminomasłowym (BABA) charakteryzowała się wyższym poziomem odporności względem wirulentnego izolatu *P. infestans*, zarówno w roślinach rodzicielskich  $P_0$ , jak i w kolejnym pokoleniu  $P_1$  roślin uprzednio indukowanych. Hamowanie rozwoju zarazy na liściach ziemniaka traktowanych BABA, korelowało ze wzmożoną ekspresją genów *PR1*

i *PR2* zaangażowanych w odporność typu SAR oraz genu głównego odporności *R3a* względem patogenu. Wzmożoną aktywację transkrypcji wymienionych genów stwierdzono po inokulacji vr *P. infestans* również w pokoleniu  $P_1$ , uzyskanym zarówno z nasion, jak i bulw ziemniaków indukowanych BABA w pokoleniu  $P_0$ .

W celu wykazania, że nabyta odporność ziemniaka pod wpływem BABA ma charakter modyfikacji epigenetycznych przekazywanych następnemu pokoleniu, zbadano udział procesu metylacji DNA i wybranych elementów szlaku RdDM. Induktor BABA w roślinach rodzicielskich spowodował gwałtowne i okresowe zmiany w poziomie globalnej metylacji DNA, potwierdzonej zarówno metodą immunoenzymatyczną jak też immunocytochemiczną. Wczesnej i silnej hypermetylacji DNA towarzyszył wzrost ekspresji metyltransferaz *CMT3* oraz *DRM2*, po której następowała gwałtowna demetylacja, z udziałem genów demetylaz *ROS1* oraz *StDML2*.

Metodą MS-HRM zidentyfikowano również powstałe w wyniku traktowania BABA zmiany w stopniu zmetylowania sekwencji promotorowych i kodujących genów *PR1*, *PR2* oraz *R3a*. Szczególnie wysoką odziedziczalnością cechowała się podwyższona metylacja fragmentów kodujących powyższych genów, co może mieć duże znaczenie w manifestowaniu SAR w potomstwie roślin indukowanych.

Nabywaniu odporności w pokoleniu rodzicielskim 'Sarpo Mira' towarzyszyła podwyższona ekspresja genów *AGO4* oraz *DCL3*, których produkty odpowiadają za dojrzewanie małych RNA (sRNA) w mechanizmie RdDM. Indukcja BABA spowodowała również zmiany w ilości dojrzałego sRNA *miR482e*, biorącego udział w regulacji poziomu transkryptu genu odporności *R3a*. Uzyskane dane potwierdzają zaangażowanie procesu metylacji DNA zależnej od RNA w nabywaniu dziedziczonej odporności ziemniaka na vr *P. infestans*.

Przeprowadzone badania wpisują się w narastający obecnie trend tworzenia epigenetycznie modyfikowanych organizmów (EMO), które w przeciwieństwie do GMO nie posiadają zmodyfikowanej sekwencji nukleotydowej genomu, a jedynie zmodulowany w wyniku, m.in. metylacji DNA, poziom transkrypcji selektywnie wybranych genów.

Zatem uzyskane wyniki potwierdzają postawioną na wstępie hipotezę roboczą, gdyż liście ziemniaka 'Sarpo Mira' indukowane 5 mmol roztworem kwasu  $\beta$ -aminomasłowego nabyły odporność systemiczną względem wirulentnego izolatu *P. infestans*, a odporność ta była dziedziczona, zarówno w pokoleniu wegetatywnym, jak i generatywnym. Dodatkowo, po analizie dziedziczonych zmian epigenetycznych stwierdzono, że molekularnym nośnikiem trwania nabytej odporności systemicznej jest metylacja cytozyny w docelowych loci DNA, w tym na sekwencjach kodujących genów *PR1*, *PR2* i *R3a*, a za powstanie tego postresowego zapisu molekularnego może odpowiadać precyzyjnie regulowany przez sRNA mechanizm RdDM.

Daniel Kuźnicki

## **Inheritance of potato (*Solanum tuberosum* L.) systemic acquired resistance to *Phytophthora infestans* (Mont.) de Bary**

### **Abstract**

The potato is one of the four most important crops, next to rice, wheat and maize, and a staple food for the global population. Among many pests attacking potato cultures in almost all regions worldwide the dominant role is played by the fungi-like *Phytophthora infestans* causing potato blight. Losses generated by this pathogen in inadequately protected plantations may be as high as 70% yields, while under particularly adverse conditions this pathogen is capable of destroying even 100% yield. Additionally, strict EU regulations aim at reducing the number and range of pesticides approved for use in agriculture, while the general distrust in GMO hinders the introduction of genetically modified crops with increased resistance against adverse environmental conditions. For this reason new crop protection strategies need to be implemented to ensure sustainable maintenance of agricultural productivity.

An adequate solution seems to be provided by the stimulation of endogenous defense mechanisms of plants within the systemic acquired resistance (SAR). Through SAR plants, when previously exposed to a primary stress or the action of a chemical elicitor, in response to the secondary stress or challenge inoculation activate a series of fast and effective defense responses. Such an acquired polygenic enhanced defense readiness is effective in relation to a broad spectrum of biological threats. SAR may be maintained for an extended period of time after the primary inducer treatment, while it may also be transmitted to the next generations, when epigenetic mechanisms are involved. This long-term maintenance of enhanced defense readiness is now referred to as the stress imprint of plants and it may constitute a potential source of future integrated crop protection strategies.

It was shown in this dissertation that the tested potato cv. Sarpo Mira, when immunized by 5 mM  $\beta$ -aminobutyric acid (BABA) was characterized by a higher level of resistance against a virulent isolate of *P. infestans* both in the P<sub>0</sub> parent plants and in the successive P<sub>1</sub> generation of previously induced plants. Inhibition of late blight on BABA-treated potato leaves was correlated with the enhanced expression of the *PR1* and *PR2* genes involved in the SAR resistance and the R3a major pathogen resistance gene. An enhanced transcription activation of the above-mentioned genes was recorded after inoculation of vr *P. infestans* also in the P<sub>1</sub> generation generated both from potato seeds and tubers induced by BABA in generation P<sub>0</sub>.

In order to show that the BABA-induced acquired resistance involves epigenetic modifications transferred to the next generation, analyses focused on the involvement of DNA methylation and selected elements of the RdDM pathway. The BABA elicitor in parental plants triggered rapid and periodical changes in global DNA methylation, confirmed using both immunoenzymatic and immunocytochemical methods. An early and strong DNA hypermethylation was accompanied by an increase in the expression of methyltransferases *CMT3* and *DRM2*, followed by a rapid demethylation involving demethylase genes *ROS1* and *StDML2*.

The MS-HRM method was also used to identify BABA-induced changes in the methylation of the promoter and coding sequences of the *PR1*, *PR2* and *R3a* genes. A particularly high heritability was observed for the enhanced methylation of coding fragments of these genes, which may be of considerable importance in the SAR manifested in the progeny of induced plants.

Resistance acquisition in the parental generation of cv. Sarpo Mira was accompanied by elevated expression of the *AGO4* and *DCL3* genes, which products are responsible for the maturation of small RNA (sRNA) in the RdDM mechanism. Induction by BABA also caused changes in the level of mature sRNA *miR482e*, participating in the regulation of the *R3a* resistance gene transcript level. Obtained data confirm involvement of the RNA dependent DNA methylation in the acquisition of inherited resistance of potato to vr *P. infestans*.

Conducted studies are in line with the increasingly important trend to develop epigenetically modified organisms (EPO), which in contrast to GMO have no modified genome nucleotide sequence, but only the transcription level of selected genes is modified e.g. through DNA methylation.

Thus the recorded results confirm the working hypothesis presented in the introduction, since leaves of potato cv. Sarpo Mira immunized with 5 mmol solution of  $\beta$ -aminobutyric acid acquired systemic resistance against a virulent isolate of *P. infestans* and this resistance was inherited both in the vegetative and generative progeny. Additionally, the analysis of inherited epigenetic changes showed that the molecular carrier for the maintenance of acquired systemic resistance is provided by cytosine methylation in target DNA loci, including coding sequences of the *PR1*, *PR2* and *R3a* genes, while the post-stress molecular imprint may be the effect of the RdDM mechanism fine-tuned by sRNA.