

GABRIELA MACHAJ¹
ALICJA MACKO-PODGÓRNI¹
KATARZYNA STELMACH¹
KAMILA KOZAK-STANKIEWICZ²
ADAM SITARSKI²
DARIUSZ GRZEBELUS¹

¹ Instytut Biologii Roślin i Biotechnologii, Wydział Biotechnologii i Ogrodnictwa,
Uniwersytet Rolniczy w Krakowie

² Kutnowska Hodowla Buraka Cukrowego w Straszkwie, Sp. z o.o.
e-mail: gabrielamachaj@gmail.com

Odporność buraka cukrowego na rizomanię warunkowana genem *Rz1*: różnicowa ekspresja genów i możliwości prowadzenia selekcji wspomaganej markerami

Rizomania to jedna z najbardziej ekonomicznie istotnych chorób buraka. Obecnie występuje ona na większości obszarów uprawy buraka cukrowego, powodując znaczne straty w plonach. Przyczyną rizomanii jest porażenie wirusem nekrotycznego żółknięcia nerwów buraka (ang. *Beet Necrotic Yellow Vein Virus*, BNYVV), przenoszonym przez mikroorganizm glebowy *Polymyxa betae*. Charakterystycznym symptomem porażenia jest tzw. broda korzeniowa, od której choroba bierze swoją nazwę. Jedynym efektywnym sposobem kontrolowania rizomanii jest stosowanie odpornych lub tolerancyjnych odmian. Zidentyfikowano kilka źródeł odporności na rizomanię, a najszerzej wykorzystywana jest dominująca odporność typu Holly warunkowana genem *Rz1*, zmapowanym do 3 chromosomu. Do oceny podatności roślin w procesie hodowli odmian odpornych stosuje się test ELISA. Alternatywą dla immunodetekcji może stać się selekcja wspomagana markerami molekularnymi sprzężonymi z cechą odporności. Celem badań była ocena zmian globalnego profilu ekspresji genów buraka cukrowego w reakcji na infekcję BNYVV w celu identyfikacji genów kandydujących, a następnie opracowanie markerów molekularnych umożliwiających identyfikację roślin niosących allel *Rz1* warunkujący odporność na BNYVV.

Badania prowadzono na roślinach z segregującej populacji F2 buraka cukrowego uzyskanej w KHBC z krzyżowania linii wrażliwej na rizomanię z linią odporną, u której odporność była warunkowana genem *Rz1*. Rośliny F2 (231 sztuk) zostały poddane inokulacji

BNYVV w teście szklarniowym, w wyniku wysiewu w zakażonej glebie, a ok. 50 roślin tej samej populacji, stanowiących grupę kontrolną, uprawiano w analogicznych warunkach, ale bez kontaktu z patogenem. Po ok. ośmiu tygodniach od siewu, testem ELISA określono zawartość wirusa w korzeniach roślin. Sekwencjonowanie transkryptomów przeprowadzono dla pięciu roślin wrażliwych i pięciu roślin odpornych. Identyfikację genów charakteryzujących się różnicową ekspresją (ang. *differentially expressed genes*, DEGs) przeprowadzono przy wykorzystaniu trzech różnych pakietów w środowisku R (DESeq2, EBSeq, edgeR) przy założeniu minimalnej ilości odczytów ≥ 10 i FDR (ang. *false discovery rate*) $\leq 0,001$. Geny ulegające różnicowej ekspresji zostały pogrupowane zgodnie z ich potencjalną funkcją. Ekspresję wytypowanych genów kandydujących oraz innych genów potencjalnie zaangażowanych w reakcję odporności zweryfikowano przy użyciu ilościowego PCRu (RT-qPCR). Polimorfizmy pojedynczego nukleotydu zidentyfikowane w genach kandydujących zlokalizowanych na chromosomie 3 buraka i cechujących się różnicową ekspresją zostały wykorzystane do zaprojektowania markerów CAPS (ang. *cleaved amplified polymorphic sequence*). Markery te wykorzystano do genotypowania roślin ocenionych pod względem ich odporności testem ELISA, w celu potwierdzenia sprzężenia pomiędzy markerem a cechą.

Zidentyfikowano 171 genów, które istotnie różnicowały rośliny buraka cukrowego wrażliwe i odporne na rizomanię. Analiza genów ulegających różnicowej ekspresji pozwoliła na przyporządkowanie 38 genów do reakcji roślin na stres biotyczny. Trzy z przypisanych genów były związane z bezpośrednią reakcją na atak patogena (stres biotyczny — białka PR). Pozostałe 35 genów zostało sklasyfikowanych jako biorące udział w procesach metabolicznych związanych z reakcją komórki na stres biotyczny. Analiza RT-qPCR potwierdziła około 2,5-krotny wzrost poziomu ekspresji genu kandydującego *Rz1* u roślin odpornych w stosunku do roślin wrażliwych, oraz około 3-krotne obniżenie poziomu ekspresji genu będącego analogiem genu odporności zlokalizowanego bezpośrednio poniżej genu *Rz1*. Jest zatem prawdopodobne, że oba te fizycznie sprzężone geny są zaangażowane w warunkowanie reakcji odporności na rizomanię. Zbadano ekspresję kilku genów różnicowo ekspresjonowanych w roślinach odpornych i wrażliwych na BNYVV w odniesieniu do nieinfekowanej kontroli. Wskazały one na konstytutywne różnice poziomu ekspresji genu *Rz1* u roślin odpornych i wrażliwych, zgodne z wynikami opisanymi powyżej. Wbrew wynikom analizy transkryptomu nie zaobserwowano różnic ekspresji genów związanych z biogenezą siRNA (*Ago2* i *DCL2*), natomiast potwierdzono wyższą ekspresję polimerazy RNA zależnej od RNA (*RDR6*).

Analizy polimorfizmów pojedynczych nukleotydów w sekwencjonowanych próbkach przez obliczenie współczynnika utrwalenia (F_{ST}) ujawniły rejon genomu na chromosomie 3 różnicujący subpopulacje odporną i wrażliwą, obejmujący gen *Rz1*. Do opracowania markerów molekularnych sprzężonych z odpornością na rizomanię wyselekcjonowano jedynie takie miejsca polimorficzne (SNP), które występowały w genach ulegających różnicowej ekspresji zmapowanych do chromosomu 3. Walidacja opracowanych markerów na roślinach z segregującej populacji F2 potwierdziła kosegregację sześciu z nich z odpornością na rizomanię. Mogą one zatem stanowić skuteczną alternatywę dla selekcji roślin odpornych w toku hodowli nowych odmian buraka cukrowego.