

Streszczenie

Wpływ kwasu β -aminomasłowego na zmiany epigenetyczne w nabytej odporności systemicznej ziemniaka (*Solanum tuberosum* L.) względem *Phytophthora infestans* (Mont.) de Bary.

Phytophthora infestans, sprawca zarazy ziemniaka, należy do chorobotwórczych lęgniowców przynoszących rokrocznie ogromne straty w plonowaniu ziemniaka, dlatego uzasadnione są wszelkie badania mające na celu wzmocnienie odporności tej ważnej rośliny uprawnej. Niniejszą pracę podjęto w celu poznania skuteczności oraz epigenetycznego podłoża primingu, wywołanego indukcją kwasem β -aminomasłowym (BABA) roślin ziemniaka 'Sarpo Mira', w nabywaniu odporności systemicznej (SAR) względem wirulentnego izolatu *P. infestans*.

Przeprowadzone eksperymenty wykazały, że uprawiany genotyp ziemniaka, indukowany 5mM BABA charakteryzował się wyższym poziomem odporności względem *P. infestans*, zarówno w roślinach rodzicielskich, jak i w następnym pokoleniu (F₁) uzyskanym, zarówno z nasion, jak i bulw, roślin indukowanych wyłącznie w pokoleniu F₀. Korzystne przystosowanie w postaci spowolnionego rozwoju zarazy na liściach ziemniaka, miało swoje odzwierciedlenie we wzmożonej ekspresji genów *PR1* i *PR2* po inokulacji, zarówno w pokoleniu F₀, jak i F₁, co jest dowodem na udział tych ważnych genów w nabytej odporności.

Po stwierdzeniu, że skuteczny priming w liściach ziemniaka ma wpływ na czasową ekspresję histonów H3 i H4, zarówno po indukacji BABA, jak i inokulacji *P. infestans*, poddano analizie geny związane z kodowaniem białek remodelujących chromatynę. Badania zogniskowano na oszacowaniu aktywności genów odpowiedzialnych za acetylację/deacetylację oraz metylację/demetylację białek histonowych. Zatem, po inokulacji patogenem stwierdzono gwałtowny wzrost ekspresji acetylotransferazy histonowej (HAT), któremu towarzyszył stosunkowo niski i stabilny poziom deacetylacy histonowej (HDAC). Ponieważ podobne tendencje okresowej aktywacji *HAT* zaobserwowano w pokoleniu F₀ i F₁, u roślin uprzednio indukowanych, stąd wnioskuje się, że stan primingu w ziemniaku może być związany z „pamięcią transkrypcyjną” dla znacznika acetylacji, co mogło skutkować szybszą aktywacją genów *PRs* po infekcji właściwej. Z kolei, analizując profile ekspresji genów metylotransferaz, tj. *ATX2* oraz

STRESZCZENIE

SUVH4, stwierdzono dynamiczne zmiany aktywności tych genów, po indukcji i infekcji patogenem, co prawdopodobnie miało swoje odzwierciedlenie w osadzaniu konkretnych znaczników metylacji przez ATX2/ *SUVH4*, na sekwencjach kodujących genów strategii obronnej.

Na potwierdzenie, po indukcji BABA, a przed zasadniczą infekcją, stwierdzono depozycję znacznika H3K4me2 na sekwencji kodującej *NPR1*, czemu towarzyszył wzrost poziomu transkrypcji tego genu. W tym samym czasie wzmożona akumulacja znacznika H3K27me3 na sekwencji kodującej *SNI1* prawdopodobnie hamowała aktywność tego supresora SAR. W późniejszych godzinach po indukcji sytuacja ulegała odwróceniu, gdy stwierdzono wzrost aktywności transkrypcyjnej *SNI1* i spadek *NPR1*. Tym samym uzyskane wyniki potwierdziły, że BABA indukuje procesy epigenetyczne, w których stan chromatyny ulega przeprogramowaniu poprzez przyłączanie lub odłączanie znaczników chromatyny metylacji do sekwencji kodujących ważnych genów regulatorowych kodujących pozytywny (*NPR1*) i negatywny (*SNI1*) regulator SAR, a te zmiany rzutują na ekspresję genów kodujących białka PR1 i PR2.

Badania finalne podjęte w celu identyfikacji epigenetycznych markerów długotrwałej pamięci wykazały po indukcji BABA, wzmożoną akumulację znacznika H3K4me2 na sekwencjach kodujących genów *PR1*, *PR2* oraz *WRKY1*. Podobny efekt uzyskano zarówno w roślinach pokolenia F₀, jak i osobnikach potomnych, otrzymanych z nasion i bulw. Co istotne, wysokiemu poziomowi metylacji H3K4me2, nie towarzyszył wzrost ekspresji analizowanych genów, w sytuacji braku zagrożenia ze strony patogenu.

Zatem, uzyskane wyniki potwierdziły postawioną na wstępie hipotezę roboczą. Pod wpływem skutecznej indukcji 5mM kwasem β-aminomasłowym ziemniak 'Sarpo Mira' nabył odporność względem wirulentnego izolatu *P. infestans*, a cecha ta została przekazana kolejnemu pokoleniu wegetatywnemu i generatywnemu. Po przeanalizowaniu dziedziczonych zmian epigenetycznych stwierdzono, że na tzw. „pamięć” lub postresowy zapis molekularny mają wpływ akumulacja znaczników H3K4me2 na sekwencji kodującej genów *PR1*, *PR2*, *WRKY1* oraz acetylacja histonu H3.

Abstract

Effect of β -aminobutyric acid on epigenetic changes in systemic acquired resistance of potato (*Solanum tuberosum* L.) against *Phytophthora infestans* (Mont.) de Bary.

Phytophthora infestans, the cause of the potato blight, is a pathogenic oomycete that leads to huge losses in potato yielding every year, therefore, it is reasonable to conduct all research aimed at strengthening the resistance of this important crop. This study was launched to learn the efficiency and epigenetic basis for priming, caused by the β -aminobutyric acid (BABA) induction of the ‘Sarpó Mira’ potato, in strengthening the systemic acquired resistance (SAR) against *P. infestans* virulent isolate.

The experiments have shown that the cultivated potatoes genotype, induced 5mM BABA, had a higher level of resistance against vr *P. infestans*, either in the parent plant or in the next generation (F₁) obtained from seeds and tubers of induced plants, including the F₀ generation. The beneficial adaptation in the form of slowed development of the blight on potato leaves had its reflection in the increased expression of the *PR1* and *PR2* genes after inoculation, either in generation F₀ or F₁, which proves the involvement of these important genes in the acquired resistance.

Having found out that efficient priming in potato leaves has an impact on the expression of histones H3 and H4, after the BABA induction and inoculation of vr *P. infestans*, an analysis was conducted on genes related to the coding of chromatin remodeling proteins. The research focused on estimating the activity of genes responsible for the acetylation/deacetylation and methylation/demethylation of histone proteins. Therefore, after the inoculation with the pathogen, a surge was found in the expression of the histone acetyltransferase (HAT), which was accompanied by a relatively low and stable level of histone deacetylase (HDAC). Similar tendencies of periodical *HAT* activation were observed in the F₀ and F₁ generation of the previously induced plants, which implicates that the priming condition in the potato may be related to the “transcription memory” for the acetylation marker. It could lead to faster activation of *PRs* genes after the proper infection. On the other hand, while analyzing the expression of methyltransferase genes, i.e. *TrxG* and *SUVH4*, dynamic changes in the activity of these genes were found after the induction and infection by the pathogen, which probably had an influence on the placement of specific methylation markers by *TrxG*/ *SUVH4* on the coding sequences of defensive strategy genes.

This was further confirmed by the fact that, after the BABA induction and before the very infection, a deposition of the H3K4me₂ marker was found on the *NPR1* coding sequence, which was accompanied by the growth in the transcription level of this gene. At the same time, the

STRESZCZENIE

intensified accumulation of the H3K27me3 marker on the *SNI1* coding sequence probably inhibited the activity of this SAR suppressor. During the hours after the induction, the situation was reversed - an increase was found in the transcription activity of SNI1 and drop in NPR1. Thus, the results confirmed that BABA induces the epigenetic processes in which the chromatin condition is reprogrammed through the connection and disconnection ethylation chromatin markers in the coding sequence of important regulatory genes coding the positive (NPR1) and negative (SNI1) SAR regulator and these changes impact the expression of genes coding the PR1 and PR2 proteins.

The final examination undertaken to identify the epigenetic markers of long-term memory has shown an intensified accumulation of the H3K4me2 marker on sequences coding genes *PR1*, *PR2* and *WRKY1* after the BABA induction. A similar effect was obtained in the F₀ generation plant and in the offspring obtained from seeds and tubers. Importantly, the high level of H3K4me2 methylation level was not accompanied by the increase in the expression of the analyzed genes in the situation of no threat from the pathogen.

Summarizing, the obtained results confirmed the initially posed working hypothesis. As a result of the efficient induction with the β -aminobutyric acid (5mM), the “Sarpo Mira” potato acquired resistance against the virulent isolate *P.infestans*, and the feature was transmitted to the next vegetative and generative generation. After the analysis of the inherited epigenetic changes, it was found out that the so-called “memory” or the post-stress molecular record is impacted by the accumulation of H3K4me2 markers on the coding sequence of the *PR1*, *PR2*, *WRKY1* genes and the acetylation of the H3 histone.