



# Poszukiwanie genów referencyjnych na potrzeby analizy ekspresji genów po zainfekowaniu roślin ogórka *Pseudomonas syringae* pv. *lachrymans*



RENATA SŁOMNICKA, GABOR MILIŃSKI, GRZEGORZ BARTOSZEWSKI

Szkoła Główna Gospodarstwa Wiejskiego w Warszawie, Katedra Genetyki, Hodowli, Biotechnologii Roślin, Wydział Ogródnictwa, Biotechnologii i Architektury Krajobrazu, ul. Nowoursynowska 159, 02-776 Warszawa

## WSTĘP

Jedną z groźniejszych chorób w uprawie polowej ogórka jest kanciasta plamistość, której sprawcą jest bakteria *Pseudomonas syringae* pv. *lachrymans* (Psl). Występowanie kanciastej plamistości doprowadza coraz częściej do poważnych strat ekonomicznych w uprawie polowej ogórka. Przykładowo w latach 2014-2016 wystąpienie kanciastej plamistości doprowadziło nawet do 50% strat w plonach na terenie 4 prowincji w Chinach (Meng i in. 2016).

W ostatnich latach wielu nowych informacji o przebiegu procesów biologicznych dostarcza sekwencjonowanie transkryptomów RNA-seq i identyfikacja genów różnicujących poszczególne etapy tych procesów. Jak dotąd, zastosowanie analizy RNA-seq u ogórka umożliwiło identyfikację genów ulegających zróżnicowanej ekspresji w trakcie porażenia mączniakiem rzekomym, szarą pleśnią oraz wirusem CMV. W ostatnim czasie otrzymano również dane transkryptomowe dla ogórka porażonego Psl oraz zidentyfikowano wstępnie geny ulegające zróżnicowanej ekspresji (Słomnicka i in., niepublikowane). Standardową procedurą potwierdzenia tego typu wyników jest analiza Real-Time RT-PCR, podczas której analizuje się ekspresję genów różnicujących w odniesieniu do genów referencyjnych.

W pracy podjęto próbę identyfikacji genów referencyjnych przydatnych w normalizacji genów ulegających zróżnicowanej ekspresji po zainfekowaniu liści ogórka *Pseudomonas syringae* pv. *lachrymans*. Dobranie odpowiednich genów referencyjnych dla danego układu badawczego jest kluczowe w analizach Real-Time PCR i podczas właściwego określenia poziomu ekspresji genów w trakcie przebiegu patogenezы.

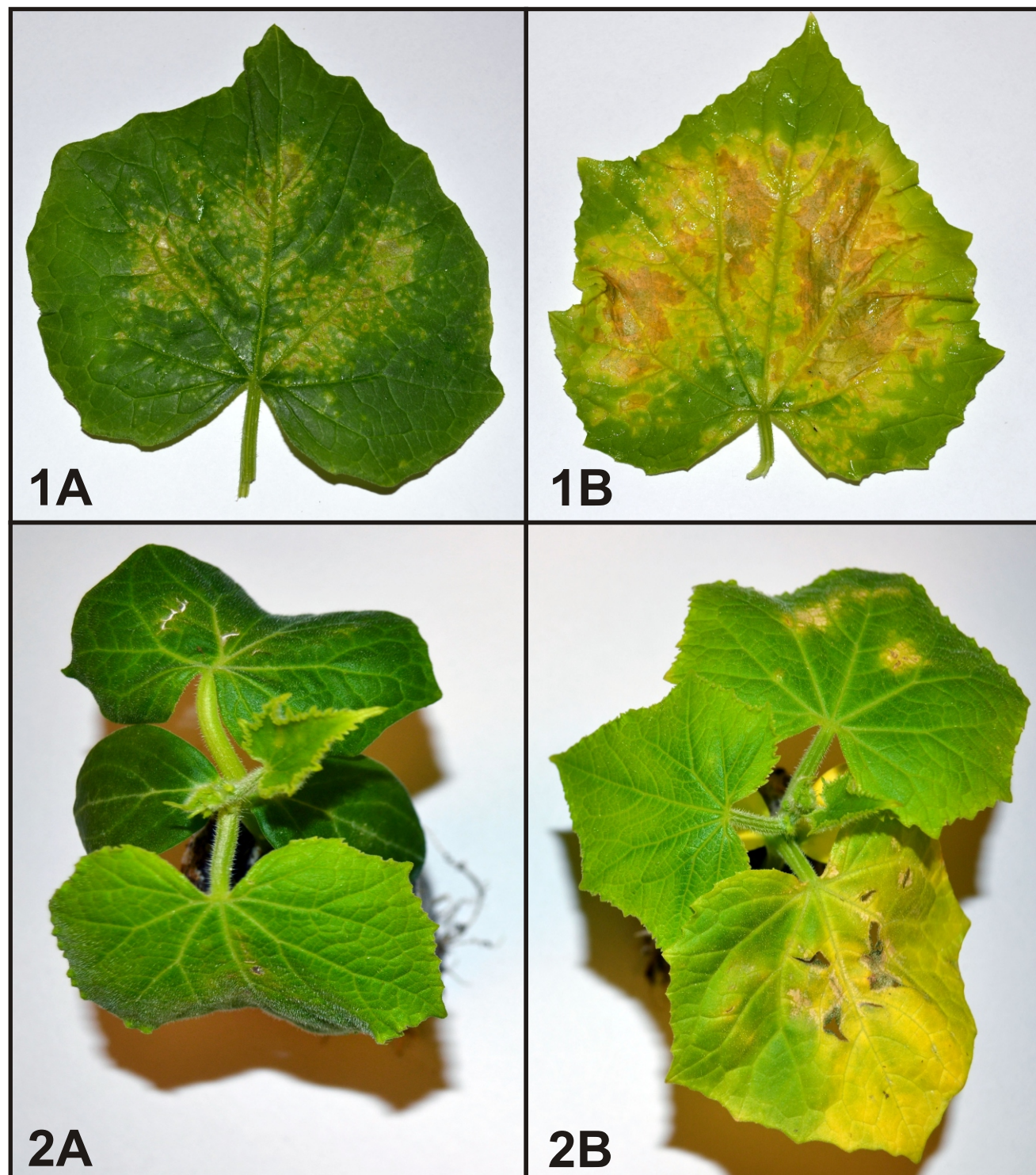


Figura 1. (1) Objawy bakteryjnej kanciastej plamistości ogórka wywołane przez szczep Psl814/98, siedem dni po inokulacji. (A) linia Gy14 wykazująca częściową odporność, (B) linia B10 podatna na kanciastą plamistość ogórka (2) Dwytygodniowe rośliny linii Gy14 (A) i B10 (B) trzy dni po inokulacji szczepem Psl814/98.

## MATERIAŁY I METODY

**Przygotowanie i zbiór tkanki.** Materiał roślinny stanowiły dwie linie ogórka o odmiennym typie reakcji odpornościowej. Linia Gy14 wykazuje częściową odporność, natomiast linia B10 jest wrażliwa na kanciastą plamistość (Figura 1). Rośliny inokulowano wirulentnym szczepem Psl814/98 w fazie 2-3 liści właściwych wg metodyki opisanej przez Olczak-Woltman i in. (2008). Tkanekę zbierano z prób zbiorczych ogórka (6 reprezentatywnych roślin) przed inokulacją, a następnie 1 i 3 dni po inokulacji roślin (próby 0, 1, 3).

**Izolacja RNA i identyfikacja genów referencyjnych.** Całkowite RNA izolowano z wykorzystaniem zestawu RNasy Plant Mini Kit (Qiagen, Niemcy), DNazując RNA bezpośrednio na kolumnach zestawem RNase-FreeDNase Set (Qiagen, Niemcy). Syntezę cDNA na matrycy RNA wykonano przy użyciu zestawu Transcriptor High Fidelity cDNA Synthesis Kit (Roche, Niemcy). Dla trzech wybranych genów referencyjnych (Tabela 1.) przeprowadzono reakcję Real-Time RT-PCR wg procedury opisanej przez Mróz i in. (2015).

Tabela 1. Zestawienie sekwencji testowanych par starterów genów referencyjnych.

#	Oznaczenie genu	Kodowane przez gen białko	Seqwencja startera (5' - 3')	Źródło
1	CACS	białko adaptorowe kompleksu klatryny	TGGGAAGATTCTTATGAAGTGC CTCGTCAAATTTACACATTGGT	Migocka i Papierniak (2010)
2	TIP41	białko podobne do białka TIP41	CACCAAGCCCAAGAAGATC TAAACCTAATCACCCAGC	Wan i in. (2010)
3	UBI-ep	białko towarzyszące ubikwitynie	CAACAGGTGATATTGGATTATGATTATAC GCCAGCTCATCTCATATAAG	Migocka i Papierniak (2010)

## WYNIKI

Dla wszystkich testowanych par starterów otrzymano produkty amplifikacji. Dla starterów CACS i UBI-ep otrzymano wyraźne produkty amplifikacji nieróżnicujące między badanymi próbkami (Figura 2). Obie pary starterów wytypowano do analiz metodą Real-Time PCR (Figura 3). Ze względu na różnice między produktami amplifikacji gen TIP41 wyłączono z dalszych analiz. W analizie Real-Time PCR dla genu CACS otrzymano bardziej jednolite wyniki dla wszystkich badanych prób. Jednak, liczba genów poddanych identyfikacji metodą Real-Time PCR była zbyt mała, aby można było je miarodajnie i wiarygodnie porównywać.

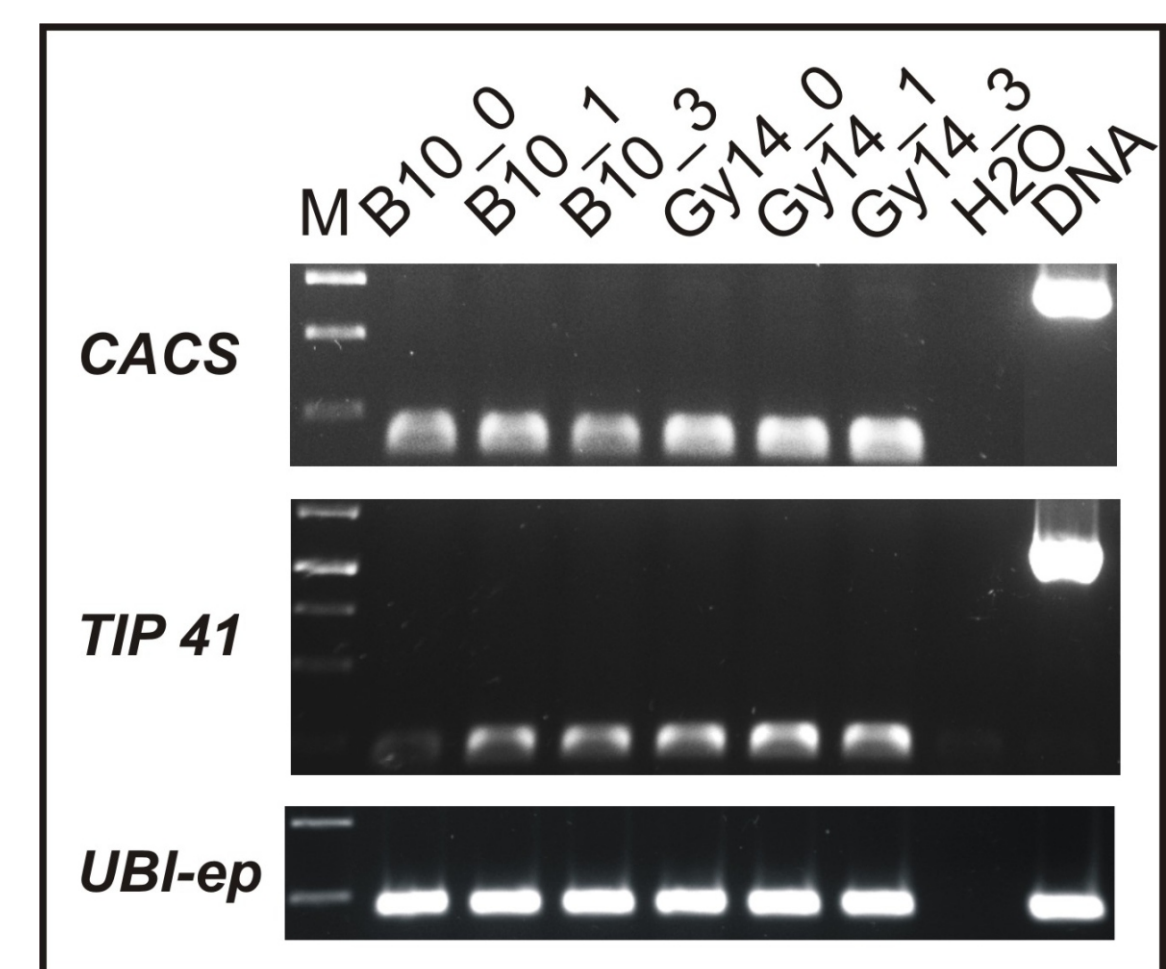


Figura 2. Zdjęcia żeli z elektroforetycznie rozdzielonymi produktami reakcji RT-PCR dla trzech badanych par starterów. H<sub>2</sub>O - kontrola negatywna, DNA - kontrola pozytywna

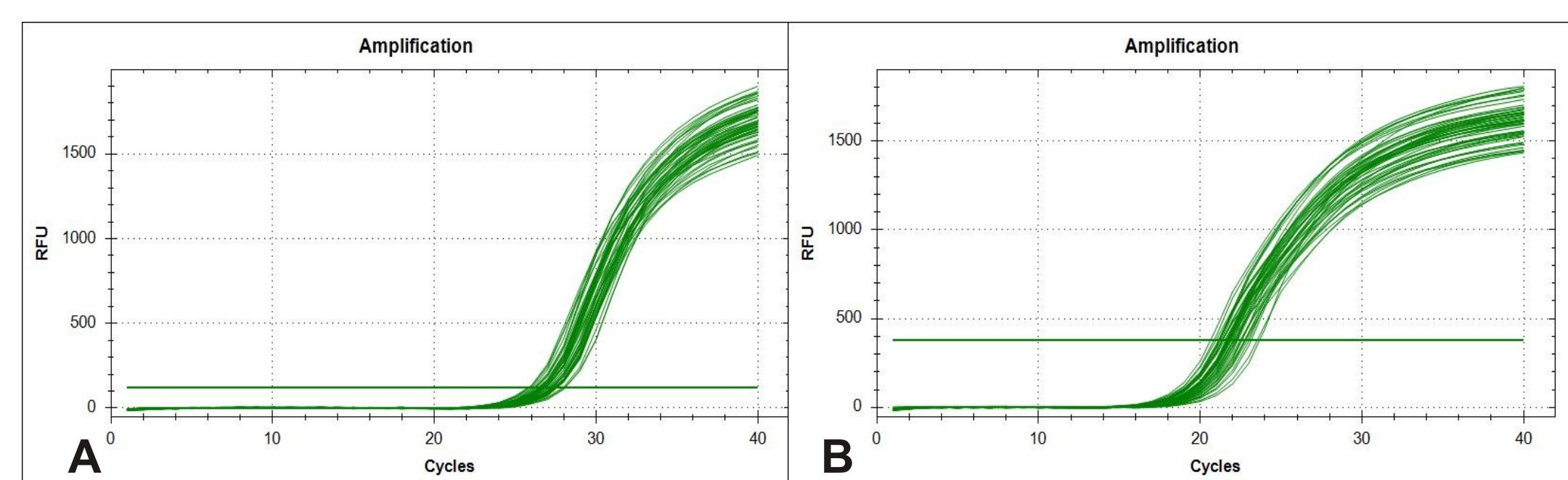


Figura 3. Wykres przedstawiający krzywe amplifikacji dla genu referencyjnego CACS (A) oraz UBI-ep (B) podczas reakcji Real-Time PCR.

## WNIOSKI

1.) Wstępne testowanie genów referencyjnych dla ogórka porażonego *Pseudomonas syringae* pv. *lachrymans* wskazało potencjalnie na gen CACS jako przydatny gen referencyjny w analizach Real-Time PCR i podczas właściwego określenia poziomu ekspresji genów w trakcie przebiegu patogenezы.

2.) Aby można było rzetelnie i wiarygodnie wytypować najlepsze geny referencyjne konieczne jest przetestowanie większej liczby genów i zweryfikowanie analiz za pomocą programów wyznaczających najlepsze geny referencyjne, jak BestKeeper, NormFinder i GeNorm.

## PODZIĘKOWANIA

Badania wykonano w ramach programu badań na rzecz postępu biologicznego w produkcji roślinnej finansowanego przez Ministerstwo Rolnictwa i Rozwoju Wsi (zadanie 100).

## LITERATURA

- Meng X, Xie X, Shi Y, Chai A, Ma Z, Li B (2016) Evaluation of a loop-mediated isothermal amplification assay based on hrpZ gene for rapid detection and identification of *Pseudomonas syringae* pv. *lachrymans* in cucumber leaves. J. Appl. Microbiol. doi:10.1111/jam.1335.
- Migocka M, Papierniak A (2011) Identification of suitable reference genes for studying gene expression in cucumber plants subjected to abiotic stress and growth regulators. Mol Breed 28:343357.
- Mróz TL, Havey MJ, Bartoszewski G (2015) Cucumber possesses a single terminal alternative oxidase gene that is upregulated by cold stress and in the mosaic (MSC) mitochondrial mutants. Plant Mol Biol Rep 33(6): 1893-1906.
- Wan H, Zhao Z, Qian C, Sui Y, Malik AA, Chen J (2010) Selection of appropriate reference genes for gene expression studies by quantitative real-time polymerase chain reaction in cucumber. Anal Biochem 15:257261.