

1. Tytuł zadania: **Badania nad regulatorową funkcją cząsteczek miRNA w przebiegu infekcji wirusami ziemniaka PVY i TRV (nr 95)**

2. Kierownik zadania: dr Zhimin Yin, IHAR-PIB, Oddział Młochów

Cel zadania: Celem pracy jest zdobycie podstawowej wiedzy na temat, które cząsteczki miRNA mogą być zaangażowane w reakcję roślin tytoniu na zakażenie wirusem PVY. Tytoń jest rośliną modelową i testową. Wyniki badań przyczynią się do postępu wiedzy o roli miRNA w interakcji ziemniak – wirusy ziemniaka.

PVY jest najważniejszym wirusem ziemniaka w Polsce. Badania będą obejmować oznaczenie ilościowe w roślinach tytoniu inokulowanych wirusem PVY, wybranych miRNA tytoniu, związanych z funkcjami rozwojowymi, miRNA i komplementarnych do nich transkryptów genów związanych z odpowiedzią na stres, oznaczenie wirusowego RNA (np. kodującego geny supresorowe wyciszania wirusowego RNA). Ocena ilościowa będzie przeprowadzona przy użyciu techniki RT-qPCR. Nasze badania dostarczą danych eksperymentalnych o wpływie PVY na ekspresję cząsteczek miRNA.

W 2016 r. realizowano dwa tematy:

- (a) Określenie przydatności genów referencyjnych do oznaczania ekspresji genów w roślinach tytoniu porażonych PVY przy użyciu techniki RT-qPCR: F-box, eIF-5C, SUI1, Sfu2, Actin, Alpha-TUB, Gamma-TUB, EF1a (SGNU446573, D63396 i AB019427)

Materiały i metody

Izolaty używane w projekcie zostały zsekwencjonowane a wyniki umieszczone w bazie NCBI GenBank:

- PVY 12/94 = PVY-3202, numer w bazie KX356068,
- PVY Gr99 = PVY-3303, numer w bazie KX356070,
- PVY 34/01 = PVY-3411, numer w bazie KX356069.

Zakażano po pięć roślin tytoniu każdym z izolatów, których czystość była sprawdzana testem ELISA z użyciem potrójnych przeciwciał. Oprócz poliklonalnych zastosowano 2 specyficzne monoklonalne: Y^N (Bioreba) rozpoznające PVY^{NTN} i Y^O (SASA) rozpoznające PVY^O. Tak sprawdzone źródła poszczególnych izolatów PVY użyto do zakażeń tytoniu odmiany Samsun, po 5 roślin/izolat. Wszystkie rośliny zakażano w fazie 4-5 liści i utrzymywano w fitotronie w temperaturze 22°C i 16-godzinnym dniu w oświetleniu 100 $\mu\text{mol s}^{-1} \text{m}^{-2}$.

Izolacja RNA i RT-qPCR w czasie rzeczywistym

Całkowite RNA izolowano przy użyciu zestawu do izolacji mirVana miRNA z pięciu pojedynczych roślin każdej kombinacji (5 roślin niezakażanych, 5 roślin traktowanych wodą, 5 roślin zakażanych trzema izolatami i testowane w dwóch terminach po 3 lub 7 i 14 dniach. Odwrotną transkrypcję przeprowadzono przy użyciu zestawu TaqMan microRNA Reverse Transcription Kit (Applied Biosystems). Poziomą ekspresję genów referencyjnych oznaczono przy użyciu techniki SYBR Green według Frazier et al. (2010)¹⁰ w termocyklerze Real-Time PCR System LightCycler 480 (Roche). Relatywną ekspresję testowanych genów oszacowano czterema różnymi programami: Delta CT, Best keeper, Normfinder, Genorm, Recommended comprehensive ranking. Analizy statystyczne przeprowadzono przy użyciu programu Statgraphics.

W 2016 r. zaplanowano testowanie siedmiu genów referencyjnych, w tym dwie formy genu Tubuliny (Alpha i Gamma). Dodatkowo testowano trzy różne obiekty genu EF1a, który nie podlegał ekspresji w badaniach w 2015 r. Dlatego łącznie testowano 10 genów, stosowanych w badaniach interakcji wirus-roślina, wymienionych w Tabeli 1. Otrzymane wyniki połączono z wynikami dla pięciu innych genów testowanych w 2015 r. i analizowano wspólnie - w celu wybrania najlepszego genu do badania interakcji tytoń – PVY.

Wyniki

Uszeregowanie kandydujących genów referencyjnych tytoniu (*Nicotiana tabacum* cv. Samsun) testowanych w 2015 i 2016 r.

Uszeregowanie	Algorytm				Rekomendowane uszeregowanie
	Delta CT	Best keeper	Normfinder	Genorm	
1	PP2A	PP2A	PP2A	eIF5C / SfU2	PP2A
2	eIF5C	SUI1	eIF5C		eIF5C
3	SfU2	eIF5C	SfU2	PP2A	SfU2
4	Gamma-TUB	F-box	Gamma-TUB	EBQ3	Gamma-TUB
5	EBQ3	Gamma-TUB	EBQ3	Nad5	EBQ3
6	EF1 α (D)	GAPDH	EF1 α (D)	F-box	F-box
7	F-box	EF1 α (S)	Nad5	Gamma-TUB	SUI1
8	Nad5	Actin	F-box	GAPDH	Nad5
9	GAPDH	SfU2	GAPDH	EF1 α (D)	GAPDH
10	SUI1	Nad5	EF1 α (S)	EF1 α (AB)	EF1 α (D)
11	EF1 α (S)	GTP	SUI1	EF1 α (S)	EF1 α (S)
12	EF1 α (AB)	EF1 α (D)	EF1 α (AB)	SUI1	Actin
13	Actin	EBQ3	Actin	Actin	EF1 α (AB)
14	GTP	EF1 α (AB)	GTP	GTP	GTP
15	Alpha-TUB	Alpha-TUB	Alpha-TUB	Alpha-TUB	Alpha-TUB

EF1 α (S): SGNU446573; EF1 α (D): D63396; EF1 α (AB): AB019427

Dyskusja

W celu oznaczenia liczby transkryptów badanych genów, może dochodzić do zmian ilości materiału genetycznego, których najczęstszą przyczyną jest różna wydajność izolacji mRNA oraz odwrotnej transkrypcji w poszczególnych próbach. Stąd potrzeba normalizacji wyników między analizowanymi próbami, poprzez wykorzystanie genu referencyjnego. Gen referencyjny powinien charakteryzować się stałym, nieregulowanym poziomem ekspresji w danej tkance. Badania ekspresji genów referencyjnych wykazały jednak istniejące różnice w liczbie transkryptów w tkankach zdrowych i zmienionych chorobowo (Romanowski i in., 2007). Na podstawie wyników analizowanych pięcioma metodami statystycznymi wybrano gen referencyjny PP2A do badań ekspresji miRNA w liściach tytoniu po zakażeniu wirusem Y ziemniaka.

Wnioski

Do badania ekspresji miRNA w interakcji tytoń – szczepy wirusa Y ziemniaka wybrano gen fosfatazy 2, PP2A.

Romanowski T, Markiewicz A, Bednarski N, Bielawski KP. 2007. Geny metabolizmu podstawowego jako geny referencyjne w ilościowym oznaczaniu ekspresji genów metodą real-time PCR. Postępy Hig Med Dośw 61: 500-510.

(b) Oznaczenie ilościowej ekspresji miRNA w tytoniu zakażonym i niezakażonym PVY przy użyciu techniki RT-qPCR.

Materiały i metody.

Materiał roślinny do oznaczania miRNA i genów celowych pobrano z roślin zakażonych do oznaczania genów referencyjnych – opisanych w temacie badawczym 3.1.

Izolacja RNA i RT-qPCR w czasie rzeczywistym została opisana w temacie 3.1. Całkowite RNA izolowano w dwóch terminach po 3 lub po 7 i po 14 dniach. Poziomą ekspresję miRNA i ich genów celowych normalizowano do najlepszego genu referencyjnego z zadania 3.1. PP2A

Obecność wirusa w roślinach testowano za pomocą testu ELISA, trzema przeciwciałami (PVYall, PVY^O, PVY^N), w dwóch różnych terminach: 7, 14 dni od daty zakażenia (liczba testów: 10 roślin x 3 izolaty x 2 terminy x 3 przeciwciała = 180). W celu potwierdzenia zakażenia roślin danym szczepem wirusa przeprowadzono reakcję multiplex RT-PCR według Lorenzena i in. (2006) i Chikh-Ali i in. (2010), Testowano po trzy rośliny porażone trzema izolatami, w dwóch terminach, dwiema metodami (36 testów).

Wyniki

Wyniki ekspresji miRNA przedstawiono w Tabeli 1 i 2.

Tabela 1. Zmiany ekspresji miRNA w nieinokulowanych liściach tytoniu odmiany Samsun w odpowiedzi na zakażenie trzema szczepami wirusa Y ziemniaka po 3 i 14 dniach od zakażenia oceniane metodą RT-qPCR^a

miRNAs (mRNA target ^b)	Traktowane wodą ^c		Inokulowane PVY					
			PVY-3202 (PVY ^{NTN} B)		PVY-3411 (PVY ^{N-wi} B)		PVY-3303 (PVY ^Z -NTN)	
			Silne objawy VN		Łagodne objawy VN		Rozjaśnienia nerwów VCI	
	3 dpi	14 dpi	3 dpi	14 dpi	3 dpi	14 dpi	3 dpi	14 dpi
nta-miR168a	nc	nc	nc	↑11.1	nc	↑5.7	nc	↑3.4
nta-miR168b-d	nc	nc	nc	↑5.3	nc	↑4.0	nc	nc
<i>AGO1</i>	nc	nc	nc	↑2.5	nc	↑2.9	nc	↑2.0
nta-miR162a/b	nc	nc	nc	↑6.9	nc	↑3.1	nc	nc
<i>DCL1</i>	nc	nc	nc	nc	nc	nc	nc	nc
nta-miR159a	nc	nc	nc	nc	nc	nc	nc	nc
nta-miR159b/c	nc	nc	nc	nc	nc	↑2.3	nc	nc
nta-miR160a	nc	nc	nc	nc	nc	nc	nc	nc
nta-miR164a/c	nc	nc	nc	nc	nc	nc	nc	nc
nta-miR164b	nc	nc	nc	nc	nc	nc	nc	nc
nta-miR166a-h	nc	nc	nc	↑2.2	nc	↑1.7	nc	nc
nta-miR166i	nc	nc	nc	nc	nc	nc	nc	nc
nta-miR166j	nc	nc	nc	nc	nc	↑3.6	nc	nc
nta-miR172a-e/u/x/y	nc	nc	nc	↑4.0	nc	↑2.6	nc	↑1.7
nta-miR172f/w	nc	nc	nc	↑1.5	nc	↑1.5	nc	nc
nta-miR172h	nc	nc	nc	↑2.1	nc	↑2.1	nc	nc
nta-miR172l	nc	nc	nc	↑1.8	nc	nc	nc	nc
nta-miR172j	ne	ne	ne	ne	ne	ne	ne	ne
nta-miR172r	ne	ne	ne	ne	ne	ne	ne	ne
nta-miR319a	ne	ne	ne	ne	ne	ne	ne	ne
nta-miR319b	ne	ne	ne	ne	ne	ne	ne	ne
nta-miR319c	nc	nc	nc	nc	nc	↑2.9	nc	nc
nta-miR319d	nc	nc	nc	nc	nc	↑1.7	nc	↓0.3
nta-miR390b	nc	nc	nc	↑38.1	nc	↑16.1	nc	nc
nta-miR396b	nc	nc	nc	nc	nc	nc	nc	nc
nta-miR395c	ne	ne	ne	ne	ne	ne	ne	ne
nta-miR395d	ne	ne	ne	ne	ne	ne	ne	ne
nta-miR847	ne	ne	ne	ne	ne	ne	ne	ne
nta-miR1435a	ne	ne	ne	ne	ne	ne	ne	ne
nta-miR1435d	ne	ne	ne	ne	ne	ne	ne	ne

^a zmiany ekspresji wyrażone jako krotność $2^{-\Delta Cq}$ (3dpi próby inokulowanej PVY/ $2^{-\Delta Cq}$ (3dpi próby traktowanej wodą) lub $2^{-\Delta Cq}$ (14 dpi próby inokulowanej PVY/ $2^{-\Delta Cq}$ (14 dpi próby traktowanej wodą)). Wartość cyklu granicznego (Cq) dla każdego genu w każdej próbie była normalizowana do genu referencyjnego (PP2A). Relatywny poziom ekspresji (RELs) wyrażony jako $2^{-\Delta Cq}$. Zmiany ΔCq obliczono według wzoru $Cq_{(\text{gen analizowany})} - Cq_{(\text{gen referencyjny})}$.

Dane prezentują średnie pięciu biologicznych powtórzeń, każde powtórzenie jest średnią trzech powtórzeń technicznych. Różnice statystycznie istotne pomiędzy próbami z inokulowanych roślin i traktowanych wodą z $P \leq 0.05$ były analizowane jednoczynnikową analizą wariancji przy użyciu programu Statgraphics Plus. Próbkę różniącą się istotnie większą lub mniejszą ekspresją są oznaczone ↑ lub ↓ odpowiednio; dpi – dni po inokulacji, nc – brak zmian (no change); ne – brak ekspresji (not expressed); VN – nekrozy nerwów (veinal necroses); VCI – rozjaśnienie nerwów (vein clearing).^b celowe mRNA: AGO1 (FG137295), Argonaute 1; DCL1 (BP528819), endoribonuclease Dicer homolog 1^c w roślinach traktowanych wodą zmiany ekspresji wyrażono jak krotność $2^{-\Delta Cq}$ (5 dpi próby traktowanej wodą) / $2^{-\Delta Cq}$ (5 dpi próby nieinokulowanej) lub $2^{-\Delta Cq}$ (16 dpi próby traktowanej wodą) / $2^{-\Delta Cq}$ (16 dpi próby nieinokulowanej)

Tabela 2. Zmiany ekspresji miRNA w nieinokulowanych liściach tytoniu odmiany Samsun w odpowiedzi na zakażenie trzema szczepami wirusa Y ziemniaka po 7 i 14 dniach od zakażenia oceniane metodą RT-qPCR^a

miRNAs (mRNA target ^b)	Inokulowano PVY					
	PVY-3202 (PVY ^{NTN} B)		PVY-3411 (PVY ^{N-Wi} B)		PVY-3303 (PVY ^Z - NTN)	
	Silne objawy VN		Łagodne objawy VN		Rozjaśnieni a nerwów VCI	
	7 dpi	14 dpi	7 dpi	14 dpi	7 dpi	14 dpi
nta-miR156f	nc	↑9.4	nc	nc	nc	nc
nta-miR159	nc	↑1.7	nc	nc	nc	nc
nta-miR160d	nc	↑2.02	nc	nc	nc	nc
nta-miR164d	nc	nc	nc	nc	nc	nc
nta-miR167a/b/c	nc	↑1.2	↑1.3	↓0.8	nc	nc
nta-miR169q-s	nc	↑5.1	nc	nc	nc	nc
nta-miR169t	nc	nc	nc	nc	nc	nc
nta-miR171c	nc	↑1.9	nc	↑1.6	nc	nc
nta-miR172m/p	nc	nc	nc	nc	nc	nc
nta-miR319a/b	nc	↑2.2	nc	nc	nc	nc
nta-miR393	nc	nc	nc	nc	nc	nc
nta-miR396d	ne	ne	ne	ne	ne	ne
nta-miR397	nc	nc	nc	↑25.7	nc	nc
nta-miR398	nc	ne	nc	↑15.2	nc	↑6.6
nta-miR408	nc	nc	nc	↑26.5	nc	nc
nta-miR479a	nc	↑30.5	nc	↑26.2	nc	nc
nta-miR479b	↑4.8	↑7.9	↑10.1	↑9.8	↑5.3	nc
nta-miR482a/c	nc	↑2.3	nc	↑1.7	nc	nc
nta-miR482b-3p	nc	↑4.1	nc	↑3.0	nc	nc
nta-miR482b-5p	↑28.5	↑280	↑21.3	↑263	↑23.2	↑175
nta-miR482d	nc	↑2.2	nc	↑2.9	nc	nc
nta-miR6019a-b	nc	nc	nc	↑18.8	nc	nc
nta-miR6020a-3p	nc	↑36.1	nc	↑36.3	nc	nc
nta-miR6020b	nc	↑3.5	nc	↑5.7	nc	↑2.7

nta-miR6020-5p	nc	↑5.0	nc	↑10. 2	nc	nc
nta-miR6025a	nc	↑1.4	nc	nc	nc	nc
nta-miR6025b	nc	↑4.1	nc	nc	nc	nc
nta-miR6025c	nc	↑1.6	nc	nc	nc	nc
nta-miR6025d	nc	↑1.5	nc	nc	nc	nc
nta-miR6025e	nc	↑3.3	nc	↑2.0	nc	nc
nta-miR530	↓0.5	nc	↓0.4	nc	↓0.2	nc
nta-miR5303c	nc	nc	nc	↑1.8	nc	nc
nta-miR6021	nc	↑2.0	nc	↑1.8	nc	nc
nta-miR6144	nc	↑4.8	nc	↑3.2	nc	nc
nta-miR6147	nc	↑2.9	nc	nc	nc	nc
nta-miR6154a/b	nc	↑11.2	nc	↑6.2	nc	↑5.2
nta-miR6164a	nc	↑4.9	nc	↑8.5	nc	nc
nta-miR6161	ne	ne	ne	ne	ne	ne
novel-miR38	= nta-miR 6164					
nove-miR4	= nta-miR 6025					
novel-miR10	= nta-miR 6019					

^a zmiany ekspresji wyrażone jako krotność $2^{-\Delta Cq}$ (7dpi próby inokulowanej PVY/ $2^{-\Delta Cq}$ (3dpi próby traktowanej wodą) lub $2^{-\Delta Cq}$ (14 dpi próby inokulowanej PVY/ $2^{-\Delta Cq}$ (14 dpi próby traktowanej wodą) Dalszy opis jak w Tabeli 4

Potwierdzono zakażenie roślin tytoniu trzema szczepami wirusa Y ziemniaka dwiema metodami multiplex RT-PCR: według Lorenzena et al. 2006 oraz Chikh Ali et al. 2010. PVY-3202 (12/94), PVY-3303(Gr99) reprezentują szczep PVY^{NTN}, PVY-3411 (34/01), należy do szczepu PVY^{N-Wi}.

Testowano różnice w ekspresji 28 form miRNA z 13 rodzin miRNA i dwóch genów celowych mRNA *AGO1* i *DCL1* 3 i 14 dni po inokulacji trzema szczepami wirusa Y ziemniaka (Tab. 1.). W górnych nie inokulowanych liściach roślin tytoniu zakażanych trzema szczepami wirusa Y ziemniaka wykryto 19 form, nie wykryto 9 form miRNA w obu terminach testowania. Po trzech dniach po inokulacji nie obserwowano żadnych zmian w poziomie wszystkich badanych miRNA i genów celowych. Spośród 19 form wykrytych miRNA dla 6 nie stwierdzono różnic w ekspresji 14 dni po zakażeniu wirusem Y ziemniaka. Zmianę ekspresji 13 form miRNA z 7 rodzin w nieinokulowanych liściach tytoniu, zakażonych wirusem roślin obserwowano po 14 dniach po inokulacji. Stwierdzono różnice w ekspresji miRNA należących do tej samej rodziny. Zaobserwowano specyficzne różnice zmiany ekspresji w zależności od szczepu wirusa. W nieinokulowanych zdrowych roślinach i w roślinach traktowanych wodą z dodatkiem karborundum nie obserwowano różnic w ekspresji. Ponieważ nie stwierdzono różnic w ekspresji miRNA trzy dni po inokulacji testowano pozostałe miRNA 7 i 14 dni po inokulacji. Testowano różnice w ekspresji 38 form miRNA z 27 rodzin miRNA 7 i 14 dni po inokulacji trzema szczepami wirusa Y ziemniaka (Tab. 2.). W górnych nie inokulowanych liściach roślin tytoniu zakażanych trzema szczepami wirusa Y ziemniaka wykryto 36 form, nie wykryto dwóch form miRNA w obu terminach testowania. Po 7 dniach od inokulacji zmiany ekspresji obserwowano tylko w przypadku 4 spośród 36 miRNA. Zmianę ekspresji 32 form miRNA z 22 rodzin miRNA obserwowano w zależności od użytego szczepu wirusa w nieinokulowanych liściach 14 dni po inokulacji. Stwierdzono również różnice pomiędzy miRNA należącymi do tej samej rodziny. Zmiany ekspresji obserwowano w 27 form miRNA po zakażeniu silnym szczepem (PVY-3202) PVY^{NTN}, 21 form po zakażeniu szczepem średnim (PVY-3411) PVY^{N-Wi}, 6 form po zakażeniu słabym szczepem (PVY-3303) PVY^{Z-NTN}. Cztery formy miRNA reagowały po zakażeniu tylko szczepem PVY^{N-Wi}, a 10 form miRNA tylko ze szczepem PVY^{NTN}. 10 form miRNA reagowało z dwoma szczepami, PVY^{N-Wi} i PVY^{NTN} i pięć ze wszystkimi szczepami.

Podsumowując, testowano ekspresję 37 rodzin miRNA zawierających 66 form miRNA, spośród których 45 form miRNA z 27 rodzin ulegało zmianom po inokulacji tytoniu wirusem Y ziemniaka (Rys. 1 i 2).



Rys 1. Zmiany ekspresji miRNA w nieinokulowanych liściach tytoniu odmiany Samsun w odpowiedzi na zakażenie trzema szczepami wirusa Y ziemniaka po 3 i 14 dniach od zakażenia oceniane metodą RT-qPCR.



Rys 2. Zmiany ekspresji miRNA w nieinokulowanych liściach tytoniu odmiany Samsun w odpowiedzi na zakażenie trzema szczepami wirusa Y ziemniaka po 7 i 14 dniach od zakażenia oceniane metodą RT-qPCR.

Dyskusja

W badaniach Yin i in. 2016, ekspresja miRNA w odmianie ziemniaka Etola po inokulacji tymi samymi szczepami wirusa Y, była zależna od szczepu i intensywności objawów przez nie powodowanych. Porównanie kilku tych samych miRNA wskazuje na różnice w ekspresji, które są związane z różną intensywnością objawów wywoływanych przez użyte szczepy wirusa Y. Szczep PVY^{N-Wi} powodował największe różnice w odmianie Etola, natomiast w tytoniu PVY^{NTN}.

Literatura

- Chikh AM, Maoka T, Natsuaki KT, Natsuaki T, 2010. The simultaneous differentiation of *Potato virus Y* strains including the newly described strain PVY^{NTN-NW} by multiplex PCR assay. *J Virol Methods*. 2010 165(1):15-20.
- Frazier TP, Xie F, Freistaedter A, Burklew CE, Zhang B. 2010. Identification and characterization of microRNAs and their target genes in tobacco (*Nicotiana tabacum*). *Planta*. 232:1289-1308.
- Lorenzen JH, Piche LM, Gudmestad NC, Meacham T, Shiel P, 2006. A multiplex PCR assay to characterize Potato virus Y isolates and identify strain mixtures. *Plant Dis*. 90: 935-940.
- Yin Z., Xie F., Michalak K., Pawełkiewicz M., Zhang B., Murawska Z., Lebecka R., Zimnoch-Guzowska E. 2016. Potato cultivar Etola exhibits hypersensitive resistance to PVYNTN and partial resistance to PVYZ-NTN and PVYN-Wi strains and strain-specific alterations of certain host miRNAs might correlate with symptom severity. *Plant Pathology*. Doi: 10.1111/ppa.12599