

**Uniwersytet Przyrodniczy w Poznaniu**  
**Wydział Rolnictwa, Ogrodnictwa i Bioinżynierii**  
Dyscyplina: rolnictwo i ogrodnictwo  
Katedra Fizjologii Roślin

**mgr Andżelika Drozda**

**Udział tlenku azotu w epigenetycznej regulacji  
odporności ziemniaka (*Solanum tuberosum* L.) na  
*Phytophthora infestans* (Mont.) de Bary**

Participation of nitric oxide in epigenetic regulation of  
potato (*Solanum tuberosum* L.) resistance to  
*Phytophthora infestans* (Mont.) De Bary

Praca doktorska  
wykonana w Katedrze Fizjologii Roślin  
Uniwersytetu Przyrodniczego w Poznaniu  
pod kierunkiem promotora  
**prof. dr hab. Jolanta Floryszak-Wieczorek**

**Poznań, 2023**

## PODZIĘKOWANIA

*Chciałabym podziękować Pani Promotor, **prof. dr hab. Jolancie Floryszak-Wieczorek** za cierpliwość, merytoryczne uwagi oraz motywację do krytycznego spojrzenia na problematykę badawczą i ciągłego doskonalenia własnych umiejętności.*

***Wszystkim współautorom** publikacji wchodzących w skład tej rozprawy doktorskiej, dziękuję za owocną współpracę.*

*Szczególne wyrazy wdzięczności kieruję w stronę mojej **rodziny i przyjaciół** za okazywaną wyrozumiałość i wsparcie, które każdego dnia były dla mnie siłą napędową do działania.*

## *Finansowanie*

Badania wykonano w ramach projektu finansowanego przez Narodowe Centrum Nauki

- OPUS13 NCN (2017/25/B/NZ9/00905) „Tlenek azotu jako epigenetyczny mediator odporności ziemniaka typu ETI”, 2018-2023



NARODOWE CENTRUM NAUKI

## SPIS TREŚCI

	<b>STRESZCZENIE ROZPRAWY DOKTORSKIEJ</b>	<b>5</b>
	<b>SUMMARY OF DOCTORAL THESIS</b>	<b>7</b>
	<b>Wykaz publikacji stanowiących podstawę postępowania w sprawie o nadanie stopnia naukowego doktora</b>	<b>9</b>
<b>1.</b>	<b>WPROWDZENIE</b>	<b>10</b>
<b>2.</b>	<b>HIPOTEZA BADAWCZA</b>	<b>21</b>
<b>3.</b>	<b>CEL PRACY</b>	<b>22</b>
<b>4.</b>	<b>MATERIAŁY i METODY</b>	<b>23</b>
<b>4.1.</b>	<b>Material roślinny</b>	<b>23</b>
<b>4.2.</b>	<b>Material infekcyjny</b>	<b>24</b>
<b>4.3</b>	<b>Mikrorozmnażanie ziemniaka w kulturach <i>in vitro</i></b>	<b>24</b>
<b>4.4.</b>	<b>Kultura patogenu i przygotowanie zawiesiny zarodników</b>	<b>27</b>
<b>4.5</b>	<b>Traktowanie roślin</b>	<b>29</b>
•	<b>Traktowanie liści ziemniaka roztworami donorów i zmiataczy NO oraz ONOO-</b>	<b>30</b>
•	<b>Traktowanie roztworem inhibitora PRMT5</b>	<b>30</b>
•	<b>Inokulacja roślin zarodnikami <i>P. infestans</i></b>	<b>31</b>
•	<b>Inokulacja roślin zarodnikami <i>P. infestans</i> po zastosowaniu inhibitora PRMT5</b>	<b>31</b>
•	<b>Inokulacja roślin zarodnikami <i>P. infestans</i> po zastosowaniu zmiatacza nadtlenoazotynu</b>	<b>32</b>
<b>4.6</b>	<b>Stosowane metody analityczne</b>	<b>32</b>
<b>5.</b>	<b>ZADANIA BADAWCZE</b>	<b>35</b>
<b>6.</b>	<b>WYNIKI I ICH OMÓWIENIE</b>	<b>38</b>
<b>7.</b>	<b>DYSKUSJA</b>	<b>52</b>
<b>8.</b>	<b>WNIOSKI</b>	<b>56</b>
	<b>PODSUMOWANIE</b>	<b>57</b>
<b>9.</b>	<b>SPIS LITERATURY</b>	<b>59</b>
<b>10.</b>	<b>Aneks</b>	<b>74</b>
	<b>Wykaz dorobku naukowego</b>	<b>77</b>
	<b>Kopie publikacji wchodzących w skład rozprawy doktorskiej</b>	<b>80</b>
	<b>Oświadczenia współautorów</b>	

## STRESZCZENIE ROZPRAWY DOKTORSKIEJ

Tlenek azotu (NO) jest ważną cząsteczką sygnałową *redoks*, zaangażowaną w liczne procesy fizjologiczne i patofizjologiczne u roślin. Jak dotąd, brakowało jednak informacji odnośnie potencjalnego udziału NO w ekspresji genów zaangażowanych w odpowiedzi na stres regulowanych epigenetycznie, poprzez zmianę dostępności chromatyny dla czynników transkrypcyjnych. Publikacje wchodzące w skład rozprawy doktorskiej, dotyczą ustalenia potencjalnej roli NO w epigenetycznej kontroli odporności typu ETI ziemniaka ‘Sarpo Mira’ na *Phytophthora infestans* (Mont.) de Bary. Nadrzędnym celem badań była identyfikacja i analiza funkcjonalna biomolekuł modyfikowanych bezpośrednio lub pośrednio przez NO, o istotnym wpływie na rearanżację chromatyny i ekspresję genów związanych z wymienionym stresem biotycznym (Drozda i in. 2022a; Drozda i in. 2022b).

W **Publikacji 1** (Drozda i in. 2022a) badano wpływ dwufazowego generowania NO regulowanego przez aktywność reduktazy S-nitrozoglutationu (GNSOR) po inokulacji avr *P. infestans*. Wykazano, że w dwufazowym wybuchu NO po inokulacji, faza okresowego obniżenia NO w 6 godzinie po infekcji, współgrała ze wzrostem ekspresji genów strategii obronnej (*NPRI*, *WRKY1*, *PR1*) i genu odporności *R3a* wzbogaconych w aktywny znak H3K4me3/*TrxG* w regionach promotora wymienionych genów. Ponadto, uzyskane w tym samym czasie po inokulacji wyniki dowodzą, że metylotransferaza argininowa PRMT5 katalizująca symetryczną dimetylację histonu H4R3 (H4R3sme2), jest wymagana do zapewnienia odporności ziemniaka na avr *P. infestans*. Zarówno inokulacja patogenem, jak i traktowanie donorem NO (GSNO) zmieniły status metylacji analizowanych genów, poprzez okresową redukcję znaku represyjnego H4R3sme2 w promotorze genów obronnych, *R3a* i genu markera aktywnego zamierania jąder komórkowych *HSR203J*, wzmacniając w ten sposób ich transkrypcję. Na potwierdzenie, hamowanie PRMT5 pod wpływem selektywnego inhibitora zmniejszyło ekspresję *R3a* i nadwrażliwą reakcję typu HR na patogen. Badania dowodzą, że dzięki aktywności GSNOR okresowe obniżenie poziomu NO (w 6 godzinie po infekcji) jest kluczowe dla wzrostu ekspresji genów strategii obronnej i genu odporności *R3a* regulowanych epigenetycznie poprzez zmianę wzorca metylacji histonów H3/H4, co ma wpływ na odporność ziemniaka na zarazę.

Dociekania prowadzone w ramach **Publikacji 2** (Drozda i in. 2022b) stanowią kontynuację badań zapoczątkowanych w pracy poprzedniej, gdyż dotyczą analizy potencjalnego wpływu NO na ekspresję genów regulujących proces (de)metylacji DNA, pozostający w dialogu funkcjonalnym z metylacją histonów w odporności liści ziemniaka

na avr *P. infestans*. Podczas wczesnej fazy po inokulacji, przy wysokim poziomie NO, stwierdzono globalny wzrost metylacji DNA oraz wzmożoną ekspresję genów szlaku RdDM (*DCL3*, *AGO4*, *DRM2* oraz *miRNAs*), co rzutowało na hamowanie ekspresji *R*-genów (*R3a* i *Rpi-phu1*) i genów strategii obronnej (tj. *NPR1*, *WRKY1* i *PR1*). Późniejszy spadek biodostępności NO w 6 godzinie (dzięki aktywności reduktazy GSNOR), wpłynął na obniżenie transkrypcji wybranych miRNAs, co umożliwiło wzrost ekspresji targetowanych *R*-genów oraz genów strategii obronnej, z niskim poziomem inhibicyjnego znacznika H3K9me2/*SUVH4* na promotorze *R3a*. Uzyskane wyniki dowodzą, że kontrolowany przez GSNOR poziom NO po inokulacji, ma pośredni wpływ na regulację szlaku RdDM, który kontrolując ekspresję genu *R3a*, ma wpływ na odporność ziemniaka względem avr *P. infestans*.

Otrzymane w ramach przedstawionej dysertacji wyniki, wzbogaciły wiedzę, o dotąd nieznaną rolę NO jako pośredniego, epigenetycznego regulatora metylacji histonów i metylacji 5-mC DNA, w odporności liści ziemniaka na zarazę.

**Kluczowe słowa:** tlenek azotu, zaraza ziemniaka, metylacja histonów, 5-mC DNA, szlak RdDM.

## SUMMARY OF DOCTORAL THESIS

Nitric oxide (NO) is a critical redox signaling molecule involved in numerous physiological and pathophysiological processes in plants. To date, there has been no information on the potential involvement of NO in the expression of genes involved in the stress response regulated epigenetically by changing the availability of chromatin for transcription factors. The publications in the doctoral dissertation concern the determination of the potential role of NO in the epigenetic control of the ETI-type resistance of potato ‘Sarpò Mira’ to avr *Phytophthora infestans* (Mont.) de Bary. The overarching goal of the research was the identification and functional analysis of biomolecules modified directly or indirectly by NO, with a significant impact on chromatin rearrangement and expression of genes related to the mentioned biotic stress (Drozda et al. 2022a; Drozda et al. 2022b).

**Publication 1** (Drozda et al. 2022a) investigated the effect of biphasic NO generation regulated by the activity of S-nitrosogluthathione reductase (GNSOR) after inoculation of avr *P. infestans*. It was shown that in the biphasic NO burst after inoculation, the phase of periodic NO reduction at 6 hours after infection coincided with the increase in the expression of the defense strategy genes (*NPR1*, *WRKY1*, *PR1*) and the *R3a* resistance gene enriched in the active H3K4me3/*TrxG* mark in the promoter regions of these genes. Furthermore, the post-inoculation results obtained at the same time show that the PRMT5 arginine methyltransferase catalysing the symmetrical dimethylation of histone H4R3 (H4R3me2) is required for potato resistance to avr *P. infestans*. Both pathogen inoculation and NO donor (GSNO) treatment altered the methylation status of the analysed genes by periodically reducing the repressive mark H4R3me2 in the promoter of defense genes, *R3a* and the active nucleus death marker gene *HSR203J*, thereby enhancing their transcription. In confirmation, inhibition of PRMT5 under a selective inhibitor reduced the expression of *R3a* and the HR-type hypersensitivity reaction to the pathogen. Research shows that due to the activity of GSNOR, a periodic reduction in the level of NO (in the 6th hour after infection) is crucial for the increase in the expression of defense strategy genes and the *R3a* resistance gene, which are epigenetically regulated by changing the H3/H4 histone methylation pattern, which affects potato resistance to late blight.

The investigations conducted as part of **Publication 2** (Drozda et al. 2022b) are a continuation of the research initiated in the previous work, as they concern the analysis of the potential impact of NO on the expression of genes regulating the process of DNA (de)methylation, remaining in a functional dialogue with histone methylation in the

resistance of potato leaves on avr *P. infestans*. During the early phase after inoculation, with high levels of NO, a global increase in DNA methylation and increased expression of RdDM pathway genes (*DCL3*, *AGO4*, *DRM2*, and *miRNAs*) were found, which affected the inhibition of the expression of *R*-genes (*R3a* and *Rpi-phu1*) and defense strategy genes (i.e. *NPR1*, *WRKY1*, and *PR1*). The subsequent decrease in the bioavailability of NO at 6 hours (due to the activity of GSNOR reductase) resulted in a decrease in the transcription of selected miRNAs, which enabled an increase in the expression of targeted *R*-genes and defense strategy genes, with a low level of the inhibitory marker H3K9me2/*SUVH4* on the *R3a* promoter. The obtained results prove that the level of NO controlled by GSNOR after inoculation indirectly affecting the regulation of the RdDM pathway, which by controlling the expression of the *R3a* gene, affects potato resistance to avr *P. infestans*.

The results obtained as part of the presented dissertation enriched the knowledge about the previously unknown role of NO as an indirect epigenetic regulator of histone and DNA methylation (5-mC) in the resistance of potato leaves to late blight.

**Keywords:** nitric oxide, late blight, histone methylation, 5-mC DNA, RdDM pathway



## Wykaz publikacji stanowiących podstawę postępowania w sprawie o nadanie stopnia naukowego doktora

Rozprawa doktorska została przygotowana na podstawie cyklu publikacji, w którego skład wchodzi następujące publikacje:

### Publikacja 1.

**Drozda, A.,** Kurpisz, B., Arasimowicz-Jelonek, M., Kuźnicki, D., Jagodzik, P., Guan, Y., Floryszak-Wieczorek, J., 2022. Nitric oxide implication in potato immunity to *Phytophthora infestans* via modifications of histone H3/H4 methylation patterns on defense genes. *Int. J. Mol. Sci.* 23, 4051.

DOI: <https://doi.org/10.3390/ijms23074051>

Punktacja według MEiN (2023): 140

IF=5.6

### Publikacja 2.

**Drozda, A.,** Kurpisz, B., Guan, Y., Arasimowicz-Jelonek, M., Plich, J., Jagodzik, P., Kuźnicki, D., Floryszak-Wieczorek, J., 2022. Insights into the expression of DNA (de)methylation genes responsive to nitric oxide signaling in potato resistance to late blight disease. *Front. Plant Sci.* 13.

DOI: <https://doi.org/10.3389/fpls.2022.1033699>

Punktacja według MEiN (2023): 140

IF=5.6

Sumaryczny IF: 11.2

## 1. WPROWADZENIE

Ziemniak jest trzecią najważniejszą uprawą rolniczą na świecie, po ryżu i pszenicy oraz kluczową rośliną w uprawach ogrodniczych (Devaux i in. 2014). Łączny obszar uprawy ziemniaka wynosi około 20 milionów hektarów na całym świecie, a produkcja przekracza nawet 366 milionów ton rocznie (Devaux i in. 2021). Jednym z najpoważniejszych zagrożeń w produkcji tej rośliny jest zaraza ziemniaka, której sprawcą jest *Phytophthora infestans* (Mont.) de Bary – grzybopodobny lęgniowiec, należący do rodziny *Pythiaceae*. Choroba ta przyczynia się do poważnych strat i spadków jakości zbiorów. W rezultacie globalne straty ekonomiczne spowodowane niszczyielskim działaniem *P. infestans* osiągają nawet 6 miliardów euro rocznie (Adolf i in. 2020). Rozwiązania polegające na stosowaniu chemicznych środków ochrony roślin, tj. fungicydy, nie są wystarczająco skuteczne w zwalczaniu *P. infestans* i mogą negatywnie wpływać na środowisko oraz zdrowie ludzi (Bassil i in. 2007; Forbes 2012; Stanley i in. 2015; Schulz i in. 2021). Z tego powodu Unia Europejska (UE) stopniowo ogranicza różnorodność i liczbę pestycydów, dostępnych w produkcji i ochronie roślin, na rzecz bardziej zrównoważonych i ekologicznych rozwiązań (Hillocks 2012; Junaid i in. 2013; Popp i in. 2013; Baker i in. 2020; Hashemi i in. 2022). Z kolei sceptycyzm wobec organizmów modyfikowanych genetycznie (ang. *genetically modified organisms*; GMOs), zwłaszcza w krajach UE, znacznie utrudnia wprowadzanie upraw roślin GMO o wzmocnionej odporności na różne czynniki stresogenne (Korbutowicz 2020; Tachikawa i Matsuo 2023). Wyzwania związane z bezpieczeństwem żywnościowym oraz zmiany klimatyczne zmuszają do poszukiwania nowych, skutecznych metod poprawiania wydajności i odporności upraw ziemniaka. Epigenetyka jest dziedziną biologii zajmującą się zmianami w ekspresji genów, które nie są związane ze zmianami sekwencji nukleotydów w DNA. Modyfikacje epigenetyczne dotyczą mechanizmów regulacji ekspresji genów, które wynikają ze zmian w strukturze i funkcjonowaniu chromatyny. Coraz więcej badań wskazuje, że regulacja epigenetyczna ma kluczowe znaczenie dla kształtowania odporności w trakcie interakcji roślin z mikroorganizmami. Poszerzenie wiedzy w tej dziedzinie może mieć kluczowe znaczenie w ramach strategii epi-hodowli, której celem jest wytworzenie roślin o zwiększonej odporności poprzez umiejętną manipulację procesami epigenetycznymi (Springer i Schmitz 2017; Varotto i in. 2020; Huang i Jin 2021; Zhi i Chang 2021).

W przeciwieństwie do zwierząt, rośliny nie mają możliwości ucieczki przed niekorzystnie zmieniającymi się warunkami środowiska lub czynnikami stresogennymi, tj.

patogeny. W odpowiedzi na te wyzwania rośliny wykształciły zaawansowane mechanizmy obronne (Jones i in. 2016; Arnold i in. 2019; Bakhtiari i in. 2019; Zhou i Zhang 2020; Huang i Jin 2021). W trakcie ataku patogenu dochodzi do szybkiego uruchamianie szlaków przekazywania sygnałów, które regulują późniejszy zakres reakcji obronnych (Vidhyasekaran 2016). Wzorce molekularne związane z patogenami, są następnie rozpoznawane przez receptory błonowe PRRs (ang. *pattern recognition receptors*), nazywane też w skrócie PAMPs (ang. *pathogen-associated molecular patterns*), które aktywują odporność PTI (ang. *PAMP-triggered immunity*); (Zipfel 2009). Przejawami tego typu odporności są m.in.: wybuch oksydacyjny, odkładanie kalozy w ścianach komórkowych roślin oraz aktywacja genów związanych z patogenezą (np. PR1, PR5); (Świątek i Śliwka 2011). Natomiast wykrycie przez roślinę-gospodarza czynników awirulencji patogenu (avr) – efektorów, wyzwala odporność typu ETI (ang. *effector-triggered immunity*); (Jones i Dangl 2006; Świątek i Śliwka 2011; Naveed i in. 2020).

W dzikich genotypach *Solanum* zidentyfikowano różne *R*-geny odporności na zarazę, które później skutecznie introdukowano do odmian uprawnych (Rodewald i Trognitz 2013). Większość posiadanych przez rośliny *R*-genów koduje wewnątrzkomórkową domenę wiążącą nukleotydy i receptory powtórzeń bogatych w leucynę (ang. *nucleotide-binding site, leucine-rich repeat*; NB-LRR); (Lozano i in. 2015; Paluchowska i in. 2022). Dzięki temu rozpoznają efekторы patogenów oraz indukują szybką i silną odporność ETI przeciwko patogenowi, obejmującą reakcję nadwrażliwości (ang. *hypersensitive response*; HR); (Jones i Dang 2006; Cui i in. 2015; Zhou i Zhang 2020). Ekspresja *R*-genów stanowi podstawę odporności typu ETI. Ich produkty, białka R, stanowią receptory wewnątrzkomórkowe oddziałujące z produktami genów awirulencji patogenów. W wyniku tego typu interakcji dochodzi do transdukcji sygnału, który inicjuje reakcję nadwrażliwości HR (Świątek i Śliwka 2011). Niestety odporność roślin oparta na *R*-genach może zostać przełamana przez niestabilny genom *P. infestans* oraz zdolność do rozmnażania płciowego za pomocą form kojarzeniowych A1 i A2. W konsekwencji, szybko pojawiają się nowe kombinacje genów i warianty genetyczne patogenu, co zmusza do ciągłego szukania skutecznych strategii obrony przed zarazą (Raffaele i in. 2010).

Tlenek azotu (NO) to endogenna bioaktywna molekula sygnałowa, zaangażowana w różne fizjologiczne i patofizjologiczne reakcje roślin (Del Castello i in. 2019; Kolbert i in. 2019). Jako cząsteczka sygnałowa typu *redoks*, czyli związana z reakcjami utleniania i redukcji, uczestniczy w wyzwalaniu zarówno odpornością PTI, jak i ETI (Mur i in. 2006; Trapet i in. 2015). Zazwyczaj działa lokalnie, wewnątrz kompartmentów komórkowych, co

wynika z kilkusekundowego okresu półtrwania tej molekuly. W ciągu pierwszych godzin po infekcji patogenem wybuch NO (ang. *NO burst*), stanowi impuls do uruchomienia reakcji obronnych w roślinie (Delledonne i in. 1998; Foissner i in. 2000; Tada i in. 2004; Floryszak-Wieczorek i in. 2007; Asai i in. 2008; Janus i in. 2013; Wendehenne i in. 2014). Cząsteczkę NO charakteryzuje niska masa cząsteczkowa, gazowa forma, hydrofobowość oraz wysoka reaktywność i zdolność do tworzenia związków pochodnych, tj. S-nitrozotioili (ang. *S-nitrosothiols*; SNOs). Te unikalne właściwości biochemiczne oraz okresowe zmiany poziomu NO, pozwalają na oddziaływanie z różnymi celami komórkowymi, tj. białka, kwasy tłuszczowe, cGMP, DNA i RNA, co z kolei przekłada się na zmiany w ekspresji genów (Thomas 2015; Sánchez-Vicente i in. 2019; Borrowman i in. 2023). S-nitrozyłacja jest procesem odwracalnym, zależnym od obecności NO i reakcji *redoks*, który skutkuje zmianą aktywności białek (Romero-Puertas i in. 2007; Zhan i in. 2018; Feng i in. 2019; Falak i in. 2021). Poprzez S-nitrozyłowane białka lub nitrozowane tiole o niskiej masie cząsteczkowej, takie jak S-nitrozoglutation (ang. *S-nitrosoglutathione*; GSNO), bioaktywność NO w drodze biernej dyfuzji może być przenoszona do jądra komórkowego (Wurm i Lindermayr 2021). Poziom GSNO i małych nitrozotioili w jądrze komórkowym, stanowiących odpowiednio magazyn i formę transportową NO, kontrolowany jest przez enzym reduktazę S-nitrozoglutationu (ang. *S-nitrosoglutathione reductase*; GSNOR); (Letierrier i in. 2011; Lindermayr i in. 2005; Tada i in. 2008; Kovacs i in. 2013; Huang i in. 2019). GSNOR ma zdolność katalizowania procesu uwalniania NO z GSNO zarówno wewnątrz komórek, jak i w przestrzeniach międzykomórkowych, co pośrednio wpływa na pulę S-nitrozyłowanych białek (Chaki i in. 2009). W modelowej roślinie *Arabidopsis* działanie AtGSNOR1 uznano za kluczowe dla uruchamiania mechanizmów obronnych przeciwko patogenom (Feechan i in. 2005). Jednak w dotychczas przeprowadzonych badaniach, skupiano się głównie na wpływie NO na nitrowanie tyrozyny lub S-nitrozyłację deacetylaz histonowych (ang. *histone deacetylases*; HDACs), których obniżenie wzmacnia acetylację i sprawia, że chromatyna jest dostępna dla czynników transkrypcyjnych (Chaki i in. 2015; Mengel i in. 2017). Według Rudolf i in. (2021), aktywność enzymu GSNOR1 może potencjalnie wpływać na dostępność chromatyny poprzez regulację procesu transmetylacji, niezbędnego dla utrzymywania właściwego poziomu metylacji DNA i znaczników epigenetycznych, tj. represyjny H3K9me2. Znaczniki epigenetyczne mogą zawierać oraz przechowywać informacje dotyczące przygotowania do obrony w przypadku wielokrotnych stresów. Tego typu forma zapisu molekularnego pozwala między innymi skutecznie regulować powtórna transkrypcję genów obronnych, których działanie zależy od

kwasu salicylowego (ang. *salicylic acid*; SA); (Pecinka i in. 2009; Jaskiewicz i in. 2011; Avramova 2015; Meller i in. 2018; Kuźnicki i in. 2019). Akumulacja SA stanowi jeden z kluczowych elementów szybkiej odpowiedzi roślin na wykryte zagrożenie. Zmiana poziomu SA aktywuje rozpad połączonego mostkami dwusiarczkowymi, nieaktywnego oligomeru NPR1 (ang. *non-expressor of pathogenesis-related genes 1*) w cytoplazmie (Malamy i in. 1990; Métraux i in. 1990; Dong 2004). Następnie, w formie monomeru, NPR1 translokowany jest do jądra komórkowego (Fu i Dong 2013), gdzie jako kofaktor transkrypcyjny, białko NPR1 może współdziałać z czynnikami transkrypcyjnymi (ang. *transcription factors*; TFs) tj. TGA oraz WRKY (identyfikuje element regulacyjny W-box), doprowadzając do uruchomienia transkrypcji genów związanych z patogenezą (ang. *pathogenesis-related*; PR) oraz ustanowienia stanu przygotowania na przyszły stres (Fu i Dong 2013). Czynnikiem transkrypcyjnym StWRKY1, należący do rodziny WRKY, został już powiązany z odpornością ziemniaka na *P. infestans*. Wyciszenie StWRKY1 spowodowało wzrost biomasy patogenu i osłabienie odporności roślin ziemniaka na zarazę (Yogendra i in. 2015).

W odpowiedzi na infekcję roślina generuje również inne cząsteczki *redoks*, które należą do reaktywnych form zarówno azotu (ang. *reactive nitrogen species*; RNS), jak i tlenu (ang. *reactive oxygen species*; ROS) oraz pełnią istotne funkcje w obronie organizmu przed stresem biotycznym (Scheler i in. 2013). W wyniku oddziaływań między NO a ROS takimi jak anionorodnik ponadtlenkowy ( $O_2^{\cdot-}$ ), może powstać nadtlenoazotyn ( $ONOO^-$ ).  $ONOO^-$  może prowadzić nie tylko do modyfikacji potranslacyjnych białek (ang. *post-translational modifications*; PTMs), ale także lipidów i kwasów nukleinowych (Izbiańska i in. 2018). Działa jako silny utleniacz i związek nitrujący (Beckman i in. 1990; Arasimowicz-Jelonek i Floryszak-Wieczorek 2011; Vandelle i Delledonne 2011; Arasimowicz-Jelonek i Floryszak-Wieczorek 2019). Interakcje NO i ROS mogą mieć poważne konsekwencje dla regulacji ekspresji genów w komórkach, szczególnie w czasie ataków patogenów (Floryszak-Wieczorek i in. 2012; Janus i in. 2013; Arasimowicz-Jelonek i Floryszak-Wieczorek 2014; Abramowski i in. 2015; Arasimowicz-Jelonek i in. 2016; Floryszak-Wieczorek i in. 2016; Mata-Pérez i in. 2016; Izbiańska i in. 2018; Saravana Kumar i in. 2020; Jedelská i in. 2021). NO wraz z  $ONOO^-$  umożliwia skuteczną transdukcję sygnałów wewnątrzkomórkowych, m.in. poprzez stymulację PTMs. Do PTMs zalicza się proces nitrozytacji reaktywnych grup tiolowych cysteiny (S-nitrozyłacja) oraz nitrowanie reszt tyrozynowych. Nitrowanie tyrozyn w białkach poprzez  $ONOO^-$  może mieć dwójaki charakter. W niższych stężeniach  $ONOO^-$  ma zdolność do modyfikowania aktywności

białek, natomiast w wyższych prowadzi do niespecyficznego i nieodwracalnego nitrowania tyrozyn w białkach, co skutkuje ich trwałą inhibicją (Montiero i in. 2008; Chaki i in. 2009; Arasimowicz-Jelonek i Floryszak-Wieczorek 2011; Corpas i in. 2013). W trakcie infekcji słonecznika (*Helianthus annuus* L.) przez patogen *Plasmopara halstedii*, zaobserwowano podwyższony poziom 3-nitrotyrozyny oraz tworzenie S-nitrozotioili. W ten sposób ujawniono potencjalna zaangażowanie ONOO<sup>-</sup> w ustanawianiu obydwu modyfikacji białkowych. Tak więc wzrost nitrowania tyrozyny w białkach można traktować jako ogólny wskaźnik stresu nitrozacyjnego u roślin narażonych na stres biotyczny (Chaki i in. 2009). Prócz S-nitrozylacji i nitrowania tyrozyn, na bioaktywność NO może mieć wpływ zdolność do tworzenia kowalencyjnych wiązań z żelazem hemowym w białkach lub kompleksów dinitrozylowych żelaza (ang. *dinitrosyl iron complexes*; DNICs); (Shumaev i in. 2016). Kompleksy DNICs regulują ilość reaktywnego żelaza wewnątrz komórek, co może mieć znaczenie podczas stresu. Białka enzymatyczne, które odpowiadają za demetylację DNA, posiadają motyw wiążący Fe-S – kofaktor niezbędny do katalizowania usuwania 5-metylocytozyny (5-mC) z DNA i jej wymiany na cytozynę w drodze naprawy przez wycinanie zasady (ang. *base excision repair*; BER). W warunkach stresu biotycznego różne cząsteczki *redoks*, w tym NO, mogą zakłócać funkcjonowanie klastra Fe-S, co prowadzi do zahamowania aktywności demetylaz (Vasudevan i in. 2016; Socco i in. 2017). Przez wiele lat badania prowadzone na ssakach dostarczały cennych informacji na temat potencjalnego udziału NO w hamowaniu aktywności enzymów, tj. demetylasy histonowej – Jumonji C (JMJC) i demetylasy DNA – TET (ang. *ten-eleven translocation*). Istnieje przypuszczenie, że opisany mechanizm opiera się na tworzeniu kompleksów NO-Fe w aktywnej kieszeni enzymu lub kompleksów DNICs, które zmniejszają dostępność kofaktora żelaza (Hickok i in. 2013; Cheng i in. 2014; Bovee i in. 2018; Palczewski i in. 2019). Niedawno opublikowane badania wskazują, że reaktywność NO może być również zaangażowana w procesy epigenetyczne u roślin, związane z modyfikacjami histonów i metylacją DNA (Mengel i in. 2017; Ageeva-Kieferle i in. 2021; Rudolf i in. 2021).

Mechanizmy epigenetyczne obejmują procesy metylacji histonów, metylacji DNA oraz szlak metylacji DNA zależny od RNA (ang. *RNA-directed DNA methylation*; RdDM); (Pikaard i Scheid 2014; Santos i in. 2017; Ageeva-Kieferle i in. 2019). Modyfikacje reszt lizyny i argininy w histonach, tj. mono- di- lub trimetylacja, odgrywają kluczową rolę w regulacji konformacji chromatyny, co prowadzi do aktywacji lub hamowania transkrypcji genów. Aby reszty lizyny w białkach histonowych miały kontrolowany poziom metylacji, kluczowe jest zrównoważone działania metylotransferaz (ang. *histone methyltransferases*;

HMT) i demetylaz (ang. *histone lysine demethylase*; KDM) histonowych. KDM usuwają grupy metylowe na białkach histonowych, natomiast HMT mogą je dodawać. Metylotransferazy, tj. supresor of variegation [SU(VAR)3-9], enhancer of zeste [E(z)] i trithorax [Trx], tworzą tzw. konserwatywną domenę białkową SET, charakterystyczną dla HMT. Białka z rodziny trithorax pośredniczą w aktywacji transkrypcji i katalizują di- lub trimetylację H3K4. Natomiast aktywna podjednostka polycomb repressor complex (PRC) – wzmacniacz enhancer of zeste, zawiera metylotransferazę curly leaf (CLF) i katalizuje di- i trimetylację H3K27, co prowadzi do hamowania ekspresji genów (Alvarez i in. 2010; Lafos i in. 2011; Pu i Sung 2015; Zhou i in. 2020).

W metylacji białka argininy pośredniczą wysoce konserwatywne, białkowe metylotransferazy argininowe – PRMTs (ang. *protein arginine methyltransferases*). Jedną z lepiej opisanych w roślinach jest PRMT5, która należy do metylotransferaz argininowych typu II i katalizuje symetryczną dimetylację argininy na histonie H4 (H4R3me2); (Bedford i Richard 2005; Wysocka i in. 2006). Coraz liczniej pojawiające się badania naukowe na temat PRMT5, podkreślają istotną rolę tej metylotransferazy w regulacji rozwoju i odpowiedzi na różne stresse abiotyczne (Pei i in. 2007; Wang i in. 2007; Schmitz i in. 2008; Deng i in. 2010; Zhang i in. 2011; Fan i in. 2014; Li i in. 2016). Z prac wymienionych autorów wynika, że PRMT5 odpowiada za metylację wielu docelowych substratów, tj. białek histonowych i niehistonowych. Powyższe białka kontrolują procesy ekspresji genów, wydłużanie RNA i składanie pre-mRNA oraz regulują aktywność białek i stabilność komórek. Przeprowadzona analiza mutantów PRMT5 wykazała, że niedobór AtPRMT5 powoduje fenotypy plejotropowe, w tym: zahamowanie wzrostu, ciemnozielone i zwinięte liście, opóźnione kwitnienie i zmniejszoną wrażliwość na proces wernalizacji, nadwrażliwość na stres zasolenia i suszę (Deng i in. 2010; Zhang i in. 2011; Fu i in. 2018).

Ekspresja *R*-genów jest regulowana w sposób precyzyjny i wielopłaszczyznowy na poziomie transkrypcyjnym i posttranskrypcyjnym lub przez małe niekodujące RNA. Małe RNA, w tym siRNAs (ang. *small interfering RNAs*; małe interferujące RNA) i miRNAs (ang. *microRNAs*; mikroRNA), biorą udział w kilku procesach biologicznych, w tym w regulacji ekspresji genów lub wyciszaniu elementów transpozycyjnych (ang. *Transposable Elements*; TEs); (Fuso i in. 2020).

MiRNAs mogą przemieszczać się na znaczne odległości w obrębie całej rośliny, powodując modyfikacje potranskrypcyjne oraz epigenetyczne (Molnar i in. 2010). Wyniki dotychczasowych badań eksperymentalnych wskazują, że miRNAs mogą ograniczać aktywność *R*-genów, jednak mechanizm ten wydaje się różnić w zależności od

analizowanego gatunku rośliny (Shivaprasad i in. 2012; Zhu i in. 2013; Ouyang i in. 2014; Wong i in. 2014; Fei i in. 2016). Ścisła kontrola ekspresji *R*-genów odporności może przyczynić się do ograniczania nakładów energetycznych oraz reakcji autoimmunologicznych, gdy ustępuje działanie czynnika stresogennego. Jednak w przypadku obecności agresora konieczna jest wczesna i szybka nadekspresja *R*-genów, co pozwala na bardziej efektywny przebieg reakcji obronnych. W pracy Kuźnicki i in. (2019) wskazano, że potencjalnym mechanizmem, który może modyfikować kinetykę ekspresji genu *R3a* w ziemniaku oraz zapewniać korzystną równowagę pomiędzy wyciszoną i aktywną transkrypcją tego genu jest metylacja DNA.

W trakcie prowadzonych analiz szczególną uwagę poświęcono zrozumieniu potencjalnego wpływu NO na aktywność *R*-genów regulowanych przez szlak RdDM. Zmiany warunków środowiskowych wymuszają modyfikacje w statusie wzorca 5-mC DNA, ustanawianego poprzez kooperację lub rywalizację metylotransferaz DNA i szlaku RdDM z mechanizmami demetylacji DNA. Metylację *de novo* DNA w kontekście sekwencyjnym CHG ustanawia chromometylaza 3 (ang. *chromomethylase 3*; CMT3), chromometylaza 2 (ang. *chromomethylase 2*; CMT2) wraz z metylotransferazą rearanzującą domeny 2 (ang. *domain rearranged methyltransferase 2*; DRM2), metylotransferazą DNA kierowaną przez RNA, odpowiadającą za asymetryczną metylację CHH (gdzie H odpowiada A, T lub C). Natomiast metylotransferaza 1 (ang. *methyltransferase 1*; MET1) jest niezbędna do utrzymania globalnej metylacji cytozyny w kontekście sekwencyjnym CG. Grupy metylowe mogą być również usuwane z DNA poprzez szlak naprawy, czyli przez wycinanie zasad (BER), w którym u *Arabidopsis* pośredniczą glikozylazy 5-mC DNA, takie jak repressor of silencing (ROS1), DEMETER (DME), DEMETER-LIKE 2 (DML2) oraz DML3 (Saze i in. 2012; Matzke i Mosher 2014; Zhang i in. 2018).

Podstawowym celem procesu *de novo* metylacji DNA w odporności roślin jest zabezpieczenie stabilności genomu przez zablokowanie ruchu TEs lub uniemożliwienie ich wiązania ze specyficznymi sekwencjami DNA zawierającymi 5-mC. W ten sposób rośliny unikają hamowania działania genów obronnych poprzez aktywację transkrypcji genów supresorowych, co stanowi kluczową strategię w wyciszaniu potencjalnie szkodliwych elementów genetycznych i ochronę integralności genomu (Dowen i in. 2012; Viggiano i de Pinto 2017; Falak i in. 2021; Huang i Jin 2021). Współdziałanie metylotransferazy DNA – CMT3 i histonowej metylotransferazy lizynowej – KYP/SUVH4 tworzy dodatnie sprzężenie zwrotne w represyjnej metylacji DNA, podczas gdy modyfikacje histonowe wpływają na siebie nawzajem, utrzymując określony stan epigenetyczny (Pikaard i Scheid



2014; West i in. 2014). Badania dotyczące mutacji genu *KYP* wykazały obniżenie metylacji w kontekście sekwencyjnym CHG, a mutant z nokautem *CMT3* ujawnił zmniejszoną metylację histonów (Du i in. 2015; Wendte i in. 2019; Nozawa i in. 2021). Oprócz bezpośredniego powiązania między *CMT3* i *KYP/SUVH4* udokumentowano także pośrednie powiązanie między *H3K9me2* odkładanym przez *SUVH4* a szlakiem RdDM (Gouil i Baulcombe 2016; Li i in. 2016).

Metylacja DNA wykazuje związek funkcjonalny z *H3K9me2* poprzez *CMT2/CMT3* lub *DRM2* – metylotransferazy zaangażowane w maszynę RdDM. Wykryto kilka istotnych enzymów szlaku RdDM, w tym Dicer-like 3 (*DCL3*; przetwarza dwuniciowy RNA i tworzy siRNAs o długości 24-26 nukleotydów), lub Argonaute 4 (*AGO4*). siRNAs wiążą się z białkiem *AGO4* i oddziałują z kompleksem Pol V (ang. *RNA polymerase V*), co prowadzi do przyłączenia metylotransferazy *DRM2*. W wyniku tego procesu zachodzi metylacja *de novo* DNA, obejmująca zarówno regiony CG, jak i homologiczne obszary genomowe, inne niż CG. Powyższy mechanizm ma istotny wpływ na regulację TEs oraz na wyciszanie genów transkrypcyjnych (Saze i in. 2012; Matzke i Mosher 2014; Zhang i in. 2018).

Metylacja jest bezpośrednio związana z S-adenozylometioniną (ang. *S-adenosylmethionine*; SAM) – uniwersalnym donorem grup metylowych ( $-CH_3$ ) w różnych procesach biologicznych (Chiang i in. 1996). Każde przeniesienie grupy funkcyjnej  $-CH_3$  do akceptora grup metylowych przez SAM, powoduje wytworzenie S-adenozylhomocysteiny (ang. *S-adenosylhomocysteine*; SAH). SAH jest konkurencyjnym inhibitorem metylotransferaz, który ulega rozszczepieniu do adozyny i homocysteiny (ang. *homocysteine*; Hcy). Hcy jest nieproteinogennym aminokwasem zawierający siarkę, którego metabolizm w roślinach jest podatny na zmiany w niekorzystnych warunkach środowiska. Ograniczenia techniczne związane z jej pomiarem sprawiają, że dostępne są tylko nieliczne badania obrazujące zmiany poziomu Hcy w komórkach roślinnych (Watanabe i in. 2021; Sobieszczuk-Nowicka i in. 2022). Pierwsze doniesienia o akumulacji Hcy i jej lokalizacji przedstawiono w badaniach Arasimowicz-Jelonek i in. (2013). Co ciekawe, nadekspresja genów zaangażowanych w biosyntezę Hcy, tj. *CBL* (ang. *cystathionine  $\beta$ -lyase*;  $\beta$ -liaza cystationinowa) i *SAHH* (ang. *S-adenosylhomocysteine hydrolase*; hydrolaza S-adenozylhomocysteiny), pozytywnie korelowała z okresową akumulacją tego aminokwasu podczas reakcji typu HR, w odporności ziemniaka na *P. infestans*. To prowadzi do przypuszczenia, że Hcy może wpływać na programowaną śmierć komórek (ang. *programmed cell death*; PCD) u roślin. W przyszłości, dzięki monitorowaniu Hcy,

prawdopodobnie będzie można scharakteryzować stopień podatności roślin na *P. infestans*. Jednak aby zweryfikować tę hipotezę, konieczne są bardziej szczegółowe badania (Arasimowicz-Jelonek i in. 2013). We wspomnianym wcześniej procesie dekompozycji SAH kluczową rolę odgrywa enzym hydrolaza S-adenozylhomocysteiny (SAHH), który katalizuje tę reakcję. Następnie homocysteina jest przekształcana przez metioninę w SAM, która jest ponownie włączana do cyklu metylacji. SAHH prawdopodobnie odpowiada za utrzymanie potencjału metylacyjnego, poprzez regulowanie stosunku SAM/SAH (m.in. w trakcie procesów metylacji DNA i H3K9me2, w warunkach fizjologicznych i patofizjologicznych (Palmer i Abeles 1979; Rahikainen i in. 2018; Saravana Kumar i in. 2020).

Aktywacja ekspresji niektórych genów obronnych wrażliwych na SA może nie wynikać bezpośrednio z metylacji DNA, lecz z zależnych od metylacji zmian w sieci transkrypcyjnej lub hierarchicznej kontroli metylacji DNA (Downen i in. 2012; Viggiano i de Pinto 2017). Współpraca pomiędzy ekspresją genów związanych ze stresem a konfiguracją histonów, może odgrywać istotną rolę w utrzymaniu nukleosomów w stanie gotowości oraz ułatwić szybką nadekspresję genów obronnych w trakcie stresu (Alvarez-Venegas i in. 2007; Zhu i in. 2015). W badaniach Meller i in. (2018) udokumentowano, że w początkowej fazie traktowania kwasem  $\beta$ -aminomasłowym (ang.  *$\beta$ -aminobutyric acid*; BABA), chemicznym induktorem nabytej odporności systemicznej (ang. *systemic acquired resistance*; SAR), geny *NPR1* i *PR1* wykazywały okresowy wzrost poziomu znacznika H3K4me2, który aktywuje transkrypcję tych genów. Następnie H3K4me2 został zastąpiony represyjnym znacznikiem H3K9me2 (lub H3K27me3), co prawdopodobnie wpłynęło na spadek ekspresji powyższych genów. Co ważne, po 48-godzinnym traktowaniu BABA, ekspresja genu *NPR1* była hamowana przez akumulację represyjnego znacznika H3K27me3. Jednocześnie zaobserwowano wzrost poziomu znacznika H3K4me2 i aktywną ekspresję genu *SNII* (ang. *suppressor of NPR1, inducible 1*), będącego negatywnym regulatorem SAR. Powyższy efekt został przekazany do pokolenia potomnego roślin indukowanych wcześniej BABA, co prawdopodobnie wpłynęło na bardziej efektywną odpowiedź obronną roślin potomnych po inokulacji *P. infestans* (Meller i in. 2018). Okresowa, przeciwstawna kombinacja różnych modyfikacji histonowych w *loci* genów *NPR1* i *SNII*, ustanawiana przez metylotransferazy (TrxG/SUVH4) i demetylazy (Jumonji706) histonowe, może być kluczowa dla utrwalenia międzypokoleniowego stanu nabywania odporności ziemniaka na *P. infestans*. Wywołane przez BABA, okresowe zmiany w statusie chromatyny z przeciwstawną transkrypcją *NPR1* i *SNII*, mogą

odpowiadać za przeprogramowanie transkrypcji genów *PR1* i *PR2* oraz nadawać kompetencje do przechowywania informacji w postaci pamięci transkrypcyjnej, związanej ze znacznikiem H3K4me2. Proponuje się, że wzór metylacji H3K9me2 może działać jako ważny element systemu immunologicznego ziemniaka, ściśle związany z innymi zmianami epigenetycznymi, takimi jak metylacja DNA. W badaniach [Kuźnicki i in. \(2019\)](#), w których zastosowano ten sam układ doświadczalny, wykazano, że traktowanie BABA spowodowało dynamiczne zmiany w metylacji DNA. Traktowanie roślin ziemniaka skutecznym induktorem SAR (BABA) wywołało szybkie zmiany w genach kodujących metylotransferazy DNA i glikozylazy DNA oraz doprowadziło do początkowego wzrostu globalnej metylacji DNA. Z czasem, metylacja DNA ulegała stopniowemu obniżeniu poniżej poziomu kontroli, a hipometylacja w promotorze genu *R3a*, została przekazana do następnego pokolenia i była pozytywnie skorelowana ze skuteczną odpowiedzią transkrypcyjną na infekcję ([Kuźnicki i in. 2019](#)).

Aktualnie dostępne są liczne badania dotyczące całego proteomu, które wykazały, że niektóre komponenty zaangażowane w cykl SAM/SAH poddawane są procesom S-nitrozylacji ([Lidermayr i in. 2005](#); [Abat i Deswal 2009](#); [Puyaubert i in. 2014](#); [Hu i in. 2015](#)) czy nitrowaniu tyrozyny ([Chaki i in. 2009](#); [Lozano-Juste i in. 2011](#); [Begara-Morales i in. 2013](#); [Arasimowicz-Jelonek i in. 2016](#)), co prowadzi do zmian w statusie metylacji komórek roślinnych. Dotychczas pojawiły się tylko nieliczne prace eksperymentalne dotyczące potencjalnego wpływu NO na procesy związane z metylacją DNA w roślinach. W efekcie traktowania sadzonek dwóch odmian *Oryza sativa* L. ssp. Japonica wysokimi stężeniami nitroprusydku sodu (ang. *sodium nitroprusside*; SNP) – egzogennym donorem NO, wykazano hipometylację (głównie w sekwencjach CHG) oraz zaburzenia transkrypcji genów remodelujących chromatynę ([Ou i in. 2015](#)). Natomiast u *Arabidopsis* z niedoborem reduktazy GSNO (*gsnor1-3*), stwierdzono m.in. podwyższony poziom NO, hipermetylację TEs oraz zaburzenia transkrypcji genów obronnych, w stosunku do typu *dzikiego* rzodkiewnika ([Rudolf i in. 2021](#)).

Przy takim stanie niedosytu wiedzy, dotyczącego fizjologicznych konsekwencji relacji między NO a stanem metylacji DNA w warunkach stresu biotycznego, istnieje uzasadniona i konieczna potrzeba kontynuacji badań w tym zakresie. Obecne dane eksperymentalne na temat roli NO w epigenetycznej regulacji reakcji roślin na stres biotyczny są ograniczone. Zainteresowanie potencjalnym wpływem NO na modyfikację aktywności *R*-genów o podłożu epigenetycznym wynika z potrzeby wyjaśnienia kwestii, uruchamiania tych genów po rozpoznaniu patogenu przez roślinę. W obliczu znacznych strat

finansowych na całym świecie, spowodowanych rokrocznie epidemią zarazy ziemniaka, wszelkie próby wyjaśnienia epigenetycznej kontroli kluczowych genów odporności na avr *P. infestans* są uzasadnione. Przedstawione w tej dysertacji badania, miały na celu ocenę potencjalnej roli NO w epigenetycznej kontroli odporności typu ETI ziemniaka (odmiana ‘Sarpo Mira’) na *P. infestans*. Badania obejmują nowatorskie aspekty, które miały na celu wyjaśnienie, czy NO uczestniczy w pośredniej kooperacji z genami obronnymi ziemniaka oraz, czy tego typu interakcje mają podłoże epigenetyczne w postaci targetowanej *de novo* metylacji/demetylacji chromatyny ziemniaka.

## **2. HIPOTEZA BADAWCZA**

Tlenek azotu pośredniczy w epigenetycznej kontroli odporności liści ziemniaka względem avr *Phytophthora infestans* (Mont.) de Bary.

### **3. CEL PRACY**

**Nadrzędnym celem niniejszej rozprawy doktorskiej była identyfikacja, wraz z analizą funkcjonalną biomolekuł modyfikowanych przez NO, o istotnym wpływie na rearanżację chromatyny i ekspresję genów związanych z odpornością.**

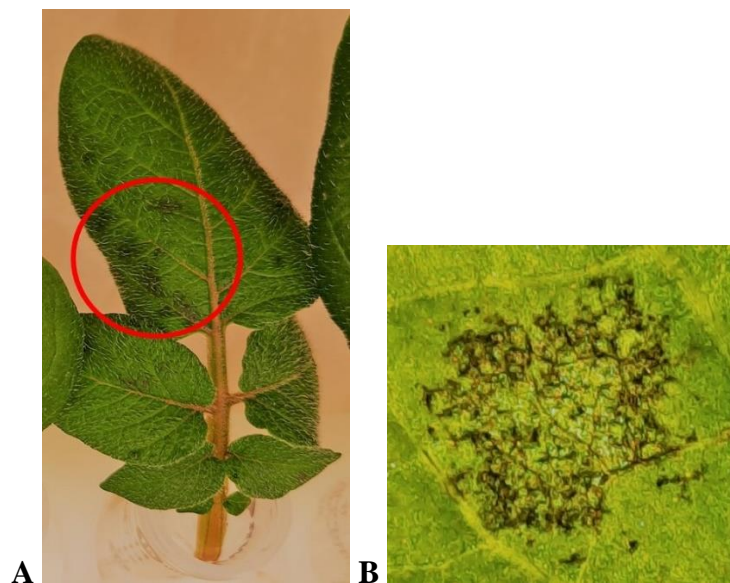
## 4. MATERIAŁY i METODY

### 4.1. Materiał roślinny

W przeprowadzonych doświadczeniach materiał roślinny stanowiły dwa genotypy ziemniaka (*Solanum tuberosum* L.), które otrzymano z Instytutu Hodowli i Aklimatyzacji Roślin – Państwowy Instytut Badawczy, tj. węgierska odmiana ‘Sarpó Mira’ (Bonin) oraz linia hodowlana TG 97-411 (Młochów). Badania prowadzono głównie na liściach ziemniaka odmiany ‘Sarpó Mira’, odznaczającej się wysokim stopniem odporności na *Phytophthora infestans* (Mont.) de Bary, dzięki tak zwanej piramidyzacji *R*-genów (to znaczy łączeniu różnych *R*-genów w obrębie jednej odmiany). *R*-geny dotychczas zidentyfikowane w odmianie ‘Sarpó Mira’ to: *R3a*, *R3b*, *R4*, *Rpi-Smira1* i *Rpi-Smira2*.

Linie hodowlaną TG 97-411 wykorzystano do porównywania niektórych efektów uzyskiwanych dla odmiany ‘Sarpó Mira’. Wysoką odporność tego genotypu ziemniaka, warunkuje gen odporności *Rpi-phu1* (Śliwka i in. 2006).

Odmiana ‘Sarpó Mira’ i hodowlana TG 97-411 w odpowiedzi na atak avr *P. infestans* wykazują odporność wywołaną efektohem, która przejawia się w roślinach jako HR, czyli programowana śmierć zainfekowanych komórek (Jones i Dangl 2006; Champouret 2010; Brylińska i Śliwka 2014). Typowe symptomy PCD obejmują między innymi występowanie na blaszkach liściowych ziemniaka ciemnych, punktowych i nierozrastających się plam, co zademonstrowano na **Rycinie 1** (Osowski i in. 2016).



**Rycina 1.** Liść ziemniaka z typowymi symptomami PCD: (A) ciemne plamy (miejsca infekcji; HR) zaznaczono czerwonym okręgiem, (B) pojedyncza plama występująca w obrębie tego samego liścia w przybliżeniu – zdjęcie pogładowe.

## 4.2. Materiał infekcyjny

Patogen *Phytophthora infestans* (Mont.) de Bary należy do rodziny *Pythiaceae* (grzybopodobnych lęgniowców). Stosowane izolaty patogenu pochodziły z kolekcji posiadanej przez Zakład Badań Zbiorów Instytutu Hodowli i Aklimatyzacji Roślin w Młochowie. W trakcie realizacji badań eksperymentalnych wykorzystywano izolaty zamieszczone w **Tabeli 1**.

**Tabela 1.** Lista izolatów *P. infestans* zastosowanych w badaniach eksperymentalnych do inokulacji liści wybranych genotypów ziemniaka.

Izolat	Typ kojarzeniowy	Rasa	Inokulowany genotyp ziemniaka
avr MP946	A1	1.3.4.7.10.11	Sarpo Mira
vr MP977	A1	1.2.3.4.5.6.7.10	Sarpo Mira
avr MP324	A1	1.2.3.4.5.6.7.8.10.11	TG 97-411

Awirulentny (ang. *avirulence*; avr) izolat MP946, koduje białko efektorowe AvrR3a, które w obecności odpowiedniego produktu genu *R3a* ('Sarpo Mira'), wywołuje odporność typu ETI. Podobnie jak avr izolat MP324 w obecności produktu genu *Rpi-phu1* (TG 97-411). Odpowiedź tego typu jest silnie związana ze wspomnianą wcześniej reakcją nadwrażliwości w roślinie żywicielskiej. HR pojawia się w miejscu infekcji, jeśli roślina-gospodarz posiada swoiste immunoreceptory R, które mają zdolność do rozpoznawania konkretnego białka Avr, co z kolei daje możliwość zapobiegania kolonizacji patogenu.

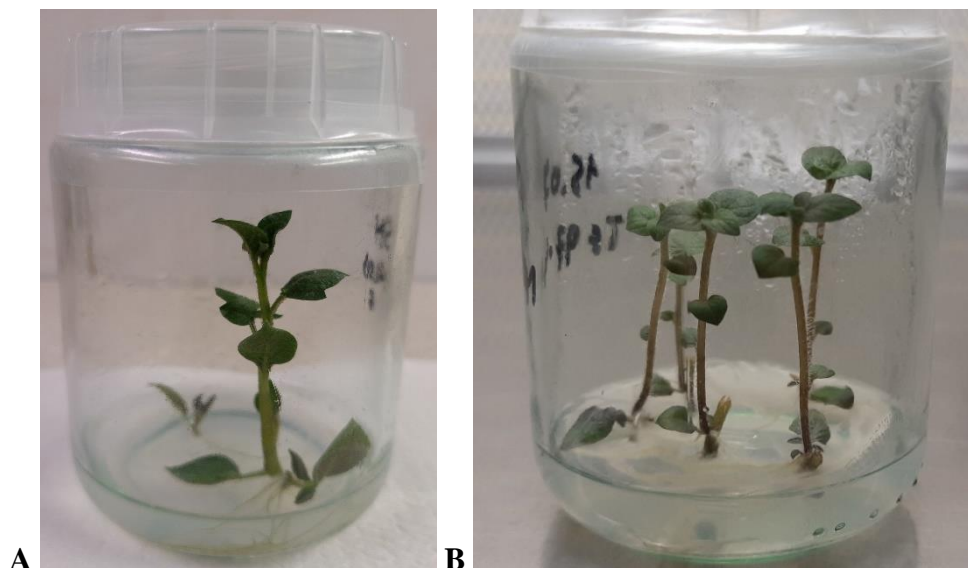
W niektórych doświadczeniach wykorzystano izolat wirulentny (ang. *virulence*; vr) *P. infestans* – MP977 w celu porównania uzyskanych wyników.

## 4.3. Mikrorozmnażanie ziemniaka w kulturach *in vitro*

Wykorzystanie metody mikrorozmnażania roślin w kulturach *in vitro* pozwoliło na uzyskanie w krótkim czasie sterylnych eksplantatów obu genotypów ziemniaka, tj. 'Sarpo Mira' oraz TG 97-411 (**Rycina 2**). Wyjściowo stosowano nieukorzone sadzonki pędowe, które na sterylnej pożywce agarowej (Murashige i Skoog 1962), ukorzeniały się i wzrastały przez okres ok. 4 tygodni, w kontrolowanych warunkach tzn.: fotoperiod światło/ciemność 16/8 godzin, intensywność oświetlania 60 W\*m<sup>-2</sup> PAR (275 μmol\*m<sup>-2</sup>\*s<sup>-1</sup> PAR; lampy NEONICA GROWY LED 218 60W), temperatura 22 ± 1°C. Pasażowanie wykonywano co



28 dni, w którego trakcie nowo pozyskane eksplantaty przenoszono na świeżą, wcześniej wysterylizowaną pożywkę.



**Rycina 2.** Kultury *in vitro* ziemniaka odmiany ‘Sarpo Mira’ (A); linii hodowlanej TG 97-411 (B).

Po ukorzenieniu część roślin przesadzano do wysterylizowanej 28 dni wcześniej gleby, którą stanowiło wystandaryzowane, uniwersalne podłoże kwiatowo-warzywne, składające się z torfu naturalnego (WOKAS S.A.; Łosice); (**Rycina 3**). Podłoże utrzymywano początkowo w warunkach o podwyższonej wilgotności (~90% RH), w temperaturze  $20 \pm 1^\circ\text{C}$ . Uprawa przebiegała w pokoju hodowlanym, w następujących warunkach: fotoperiod światło/ciemność 16/8 godzin, intensywność oświetlenia  $150 \text{ W}\cdot\text{m}^{-2}$  PAR ( $180 \mu\text{mol m}^{-2} \text{ s}^{-1}$ ; lampy FLUORA L18W /77 i L58W/77; OSRAM; Niemcy) w temperaturze  $18 \pm 2^\circ\text{C}$  i wilgotności 50-60% RH przez 4 tygodnie. Po okresie aklimatyzacji pod szklanymi osłonami, rośliny nawożono co 7 dni wystandaryzowanym preparatem Pokon<sup>®</sup> (Pokon Naturado B.V.; Holandia). Nie stosowano chemicznych środków ochrony roślin. Materiał roślinny (ścięte liście) do doświadczeń uzyskiwano z roślin będących w fazie wegetatywnego rozwoju, na etapie 8-10 liści złożonych (**Ryciny 4-5**).



**Rycina 3.** Rośliny ziemniaka po 7 dniach aklimatyzacji w glebie odmiana ‘Sarlo Mira’(A); linia hodowlana TG 97-411 (B).



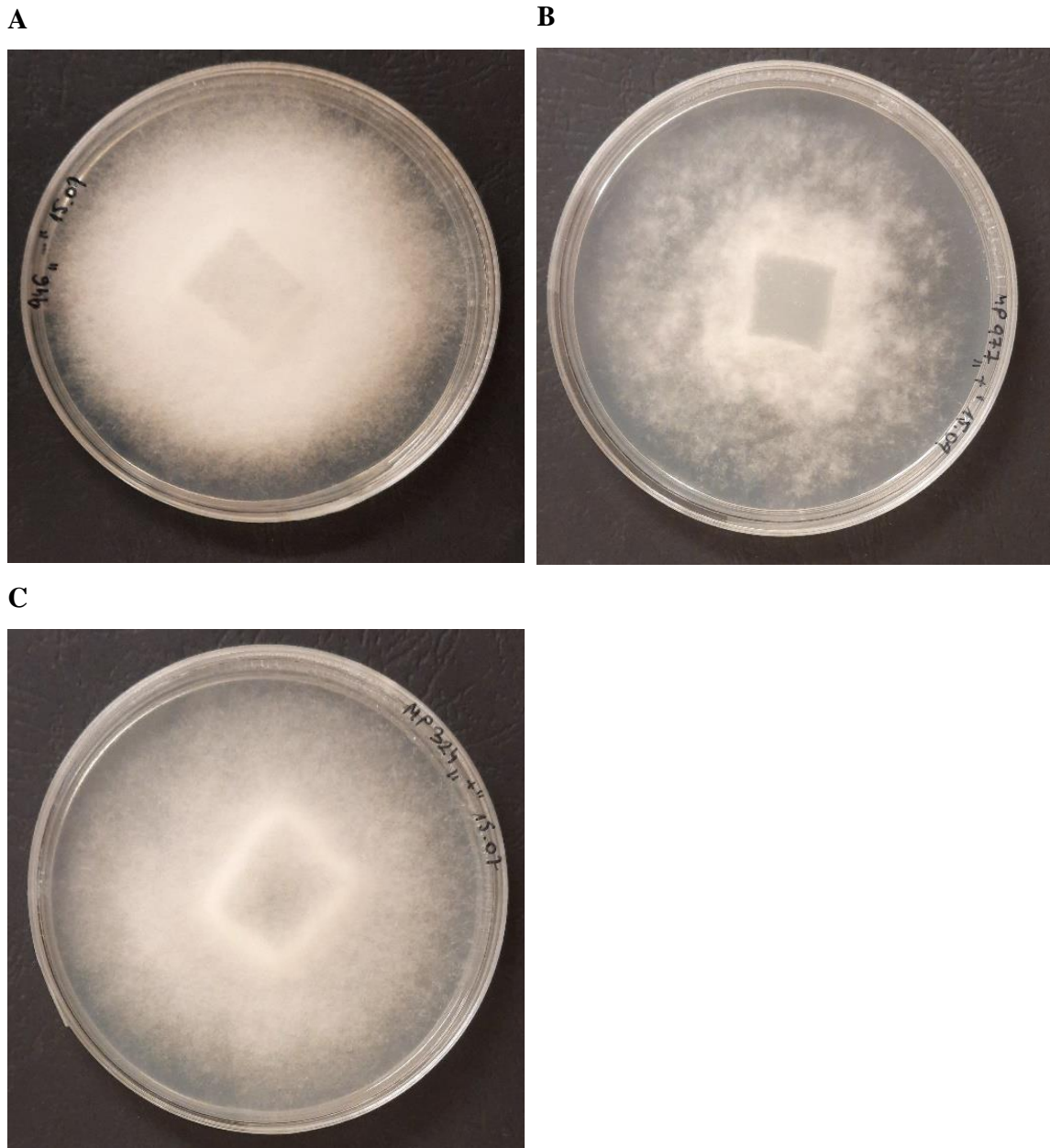
**Rycina 4.** Roślina ziemniaka odmiany ‘Sarlo Mira’ po 28-dniach uprawy w glebie.



**Rycina 5.** Rośliny ziemniaka, genotyp TG 97-411 po 28 dniach wzrostu w glebie. Zdjęcie wykonane w pokoju hodowlanym.

#### **4.4. Kultura patogenu i przygotowanie zawiesiny zarodników**

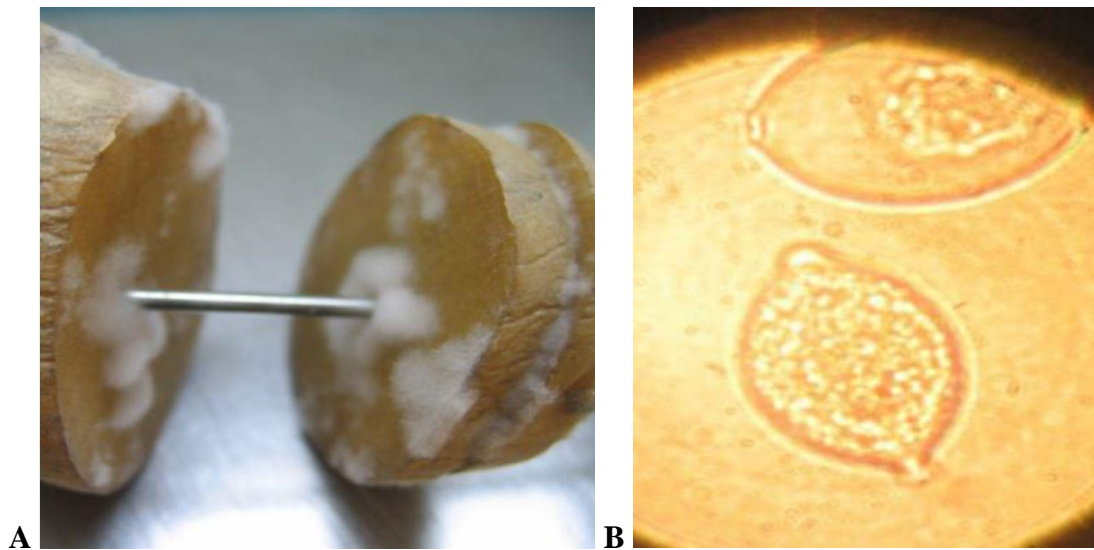
Wszystkie izolaty utrzymywano na szalkach Petriego, w temperaturze  $\pm 16^{\circ}\text{C}$ , w zacienionych komorach termostatowanych. Po minimum trzech tygodniach wzrostu na zestalonej pożywce groszkowej pH = 6,1 (**Rycina 6**), kulturę odnawiano poprzez pasażowanie na szalki ze świeżą pożywką.



**Rycina 6.** Izolaty *P. infestans* po 25 dniach wzrostu na pożywce grozkowej (pH = 6,1) avr MP946 (A); vr MP977 (B); avr MP324 (C).

Przed każdą właściwą inokulacją liści, patogen pasażowano, co najmniej 2-krotnie przez bulwy ziemniaka, inkubując je w hermetycznych plastikowych pudełkach przez 7-14 dni w ciemności w  $\pm 16^{\circ}\text{C}$ . Z zainfekowanych plastrów zbierano strzępki powietrzne (**Rycina 7A**) i umieszczano w sterylnej wodzie dejonizowanej w temperaturze  $4^{\circ}\text{C}$  przez 1 godzinę. Całość mieszano jednocześnie na mieszadle magnetycznym, w celu uwolnienia ze sporangiów zarodników pływkowych. Uzyskany w ten sposób materiał biologiczny filtrowano przez sito o wielkości porów  $40\ \mu\text{m}$ . Określenie stężenia pozyskanych zarodników wykonywano przy pomocy komory Thoma (**Rycina 7B**). Przygotowany

roztwór rozcieńczano sterylną wodą dejonizowaną do momentu uzyskania stężenia  $2,5 \times 10^5$  zarodni na 1 ml wody.



**Rycina 7.** Zainfekowane plastry bulw ziemniaka z białymi strzępkami powietrznymi po 7 dniach wzrostu (A); obraz mikroskopowy sporangiów patogenu (powiększenie  $400 \times$ ) zebranych z zainfekowanych bulw, wewnątrz zarodni widoczne zarodniki pływkowe (B).

#### 4.5. Traktowanie roślin

Do doświadczeń wykorzystywano ścięte liście ziemniaka, których ogonki liściowe umieszczano w sterylnych falkonach wypełnionych wodą destylowaną (15 ml). Falkony z liśćmi przekładano na statywy i przenoszono do wysterylizowanych, szczelnie zamkniętych plastikowych pudełek o pojemności  $10 \text{ dm}^3$ . Wilgotność utrzymywano na poziomie 90-95%. Całość przechowywano w temperaturze  $\pm 18^\circ\text{C}$  (Rycina 8).



**Rycina 8.** Ścięte liście ziemniaka w falkonach z wodą destylowaną, przygotowane do traktowania odpowiednimi roztworami (odmiana ‘Sarpo Mira’).

- **Traktowanie liści ziemniaka roztworami donorów i zmiataczy NO oraz ONOO-**

Złożone liście ziemniaka traktowano niezależnie 5 ml następujących roztworów: GSH (250  $\mu$ M), GSNO (250  $\mu$ M), cPTIO (200  $\mu$ M) oraz Ebselenu (50  $\mu$ M); (**Tabela uzupełniająca 1**), które aplikowano przy użyciu atomizera, spryskując górną stronę blaszki liściowej. Kontrolę stanowiły liście potraktowane taką samą objętością wody destylowanej.

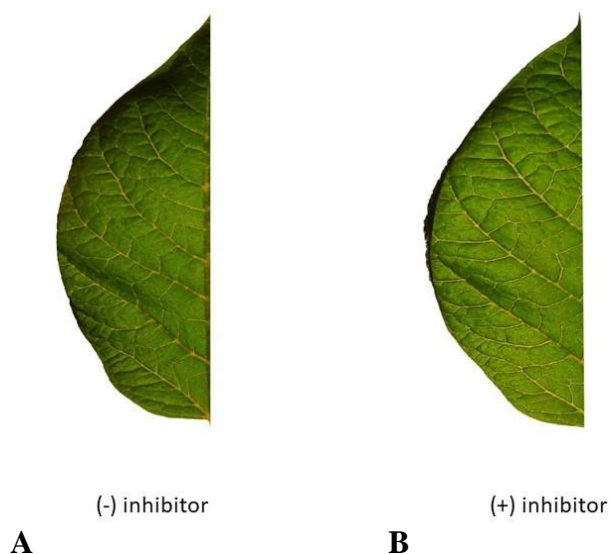
W doświadczeniu związanym z nitrowaniem tyrozyn SAHH część liści ziemniaka spryskiwano zmiataczem nadtlenoazotynu – Ebselenem i/lub traktowano zawiesiną zarodników avr *P. infestans* (szczegóły opisano w rozdziale: Inokulacja roślin zarodnikami *P. infestans* po zastosowaniu zmiatacza nadtlenoazotynu).

Zebrane próby bezpośrednio analizowano bądź zamrażano w ciekłym azocie, a następnie przechowywano w temperaturze  $-80^{\circ}\text{C}$ .

- **Traktowanie roztworem inhibitora PRMT5**

GSK3326595/EPZ015938 (inhibitor PRMT5) to silny i odwracalny inhibitor białka PRMT5 (**Tabela uzupełniająca 2**). Stężenia 50, 100 i 200  $\mu$ M wyznaczono wstępnie na podstawie danych dostępnych w literaturze oraz uzyskanych doświadczalnie. Jako optymalne stężenia inhibitora PRMT5 wybrano 200  $\mu$ M (szczegółowy opis w rozdziale: Inokulacja roślin zarodnikami *P. infestans* po zastosowaniu inhibitora PRMT5), ponieważ nie miało

ono widocznego wpływu na zmiany destrukcyjne blaszki liściowej (**Rycina 9**).



**Rycina 9.** Wpływ traktowania liści ziemniaka (odmiana ‘Sarpó Mira’) roztworem inhibitora GSK3326595 o stężeniu 200 µM – brak zmian po upływie 72 godzin (A), w stosunku do liści kontrolnych (-) inhibitor (B).

- **Inokulacja roślin zarodnikami *P. infestans***

Ścięte liście ziemniaka, przeniesiono do falkonów z wodą destylowaną i umieszczano w szczelnych plastikowych kuwetach o pojemności 10 dm<sup>3</sup> (**Rycina 8**). Następnie blaszki liściowe ziemniaka spryskiwano zawiesiną zoospor i przechowywano w warunkach 90-95% wilgotności, temperaturze ± 18°C w fitokomorze. Próby zbierano w 1, 3, 6, 24, 48 i 72 godzinie po inokulacji *P. infestans*. Zebrane próby analizowano bezpośrednio lub zamrażano w ciekłym azocie i przechowywano w -80°C.

- **Inokulacja roślin zarodnikami *P. infestans* po zastosowaniu inhibitora PRMT5**

Na górną powierzchnię odciętego liścia nanoszono 5 ml roztworu inhibitora GSK3326595 (w 1% DMSO) o stężeniu 50, 100 i 200 µM lub taką samą ilością 1% DMSO (kontrola). Spryskane liście utrzymywano w komorze inkubacyjnej w warunkach 90-95% wilgotności, temperatura ± 18°C. Po 12-godzinnej inkubacji z inhibitorem, liście osuszano i inokulowano poprzez spryskanie zawiesiną zoospor *P. infestans*.

W eksperymencie z inokulacją punktową, po 12 godzinach od momentu zastosowaniu inhibitora PRMT5, na osuszoną, odosiową powierzchnię liścia nanoszono kroplę zawiesiny zoospor o objętości 20 µl (izolaty: avr MP946 oraz vr MP977). Następnie liście umieszczono w komorze inkubacyjnej (wilgotność 90-95%).

Średnice zmian chorobowych (mm<sup>2</sup>) mierzono po 72 godzinach od inokulacji liści ziemniaka. Analizowano 12 miejsc infekcji z 3 niezależnych powtórzeń biologicznych. Średnią powierzchnię plamy chorobowej na badanych liściach obliczono w stosunku do powierzchni plamy na liściach kontrolnych (bez dodatku inhibitora).

Próby zebrane w wybranym punkcie czasowym, analizowano bezpośrednio lub zamrażano w ciekłym azocie i przechowywano w temperaturze -80°C.

- **Inokulacja roślin zarodnikami *P. infestans* po zastosowaniu zmiatacza nadtlenoazotynu**

Ścięte liście ziemniaka odmiany ‘Sarpo Mira’ spryskano 50 µM wodnym roztworem Ebselenu i inkubowano przez 5 godzin. Następnie próby osuszano i inokulowano zawiesiną zarodników avr *P. infestans* (izolat MP946).

#### **4.6. Stosowane metody analityczne i statystyczne**

W **Tabeli 2** zestawiono metody analityczne wykorzystywane na poszczególnych etapach realizacji zadań badawczych.



**Tabela 2.** Etapy realizacji zadań badawczych z uwzględnieniem zaplanowanych metod analitycznych.

Nr /zadanie badawcze	Analizowane geny	Dodatkowe kontrole oprócz H <sub>2</sub> O	Donory NO	Czas [godz.]	Metoda
I. Ocena generowania NO		<ul style="list-style-type: none"> <li>cPTIO-zniatacz NO</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>GSNO</li> <li>avr <i>P. infestans</i> (MP946)</li> </ul>	1-48	<ul style="list-style-type: none"> <li>Elektrochemiczna</li> <li>Fluorescencyjna</li> <li>Spektrofotometryczna</li> <li>Chemiluminescencyjna</li> </ul>
I. Badanie aktywności enzymu GSNOR					
II. Analiza ekspresji genów związanych z odpowiedziami obronnymi	<i>NPR1, WRKY1, PRL, R3a, Rpi-phu1</i> (TG 97-411)		<ul style="list-style-type: none"> <li>GSNO</li> <li>avr <i>P. infestans</i> + avr MP324 /TG 97-411</li> </ul>		Spektrofotometryczna
III-IV. Analiza osadzenia znaczników histonowych na promotorach wybranych genów związanych z odpornością ziemniaka	<b>Promotory genów:</b> <ul style="list-style-type: none"> <li><i>NPR1, WRKY1, PRL, R3a</i></li> <li><i>NPR1, WRKY1, PRL, R3a</i></li> <li><i>NPR1, WRKY1, PRL, R3a, HSR203J</i></li> <li><i>R3a</i></li> </ul>		<ul style="list-style-type: none"> <li>GSNO</li> <li>avr <i>P. infestans</i></li> </ul>	3-24	ChIP-qPCR z przeciwciałami i starterami zaprojektowanymi dla każdego promotora analizowanych genów
III. Oznaczenie aktywności białka metylotransferazy argininy po zastosowaniu inhibitora PRMT5 (GSK3326595)		<ul style="list-style-type: none"> <li>1%DMSO</li> <li>(-) inhibitor</li> <li>(+) inhibitor</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>avr <i>P. infestans</i> (+) i (-) inhibitor</li> </ul>	6	test ELISA
III. Analiza ekspresji genu związanego z PCD	<i>HSR203J</i>	<ul style="list-style-type: none"> <li>GSH</li> <li>cPTIO</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>GSNO</li> <li>avr <i>P. infestans</i></li> </ul>	1-48	RT-qPCR
III. Analiza wpływu inhibitora PRMT5 na rozwój infekcji i ekspresję genów obronnych	<i>Pti1</i>	<ul style="list-style-type: none"> <li>1%DMSO</li> <li>(-) inhibitor</li> <li>(+) inhibitor</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>avr <i>P. infestans</i>: + vr MP977 (+) i (-) inhibitor</li> </ul>	72	RT-qPCR
	<i>HSR203J, R3a</i>		<ul style="list-style-type: none"> <li>avr <i>P. infestans</i> (+) i (-) inhibitor</li> </ul>	6	RT-qPCR + test TUNEL

**Tabela 2.** Etapy realizacji zadań badawczych z uwzględnieniem zaplanowanych metod analitycznych c.d.

IV. Ocena globalnej metylacji DNA								test ELISA
IV. Analiza ekspresji genów związanych z (de) metylacją histonów i DNA	<i>CLF, TrxG, PRMT5 SUVH4 CMT3, DRM2 Jumonji706 SAHH AGO4, DCL3</i>		<ul style="list-style-type: none"> <li>• GSH</li> <li>• cPTIO</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>• GSNO</li> <li>• avr <i>P. infestans</i> + avr <b>MP324</b> /TG 97-411</li> </ul>	1-48		RT-qPCR	
IV. Nitrowanie hydrolazy SAHH		Przeciwciało poliklonalne przeciwko hydrolazie SAHH	<ul style="list-style-type: none"> <li>• (-) ebselen-zmiatacz ONOO<sup>-</sup></li> <li>• (+) ebselen</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>• avr <i>P. infestans</i> (-) ebselen</li> <li>• avr <i>P. infestans</i> (+) ebselen</li> </ul>	1-6		SDS-PAGE i Western blot immunoprecypitowanych białek zawierających nitroIyrr	
IV. Analiza ekspresji mikroRNA	<i>miR482e/R3a miR6026/Rpi-phu1</i> (w TG 97-411)		<ul style="list-style-type: none"> <li>• cPTIO</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>• GSNO</li> <li>• avr <i>P. infestans</i> + avr <b>MP324</b> /TG 97-411</li> </ul>	3-24		RT-qPCR	

## 5. ZADANIA BADAWCZE

W celu weryfikacji hipotezy przyjętej w ramach niniejszej rozprawy postawiono następujące zadania badawcze, w których liście ziemniaka dwóch odmian odpornych ('Sarpo Mira' lub TG 97-411) były inokulowane awirulentnym izolatem *P. infestans* lub traktowane donorem NO (GSNO):

### I. Ocena generowania tlenu azotu

1. Analiza kinetyki generowania NO w liściach ziemniaka po infekcji.
2. Badanie aktywności enzymu GSNOR, który odpowiada za regulowanie wewnątrzkomórkowych zasobów GSNO w interakcji ziemniaka z avr *P. infestans*.
3. Porównaniu poinfekcyjnego przebiegu generowania NO z tempem uwalniania NO z GSNO.

### II. Analiza ekspresji kluczowych genów strategii obronnej *NPR1*, *WRKY1*, *PRI* oraz *R*-genów odporności, tj. *R3a* i *Rpi-phu1*

### III. Oszacowanie pośredniego wpływu NO na procesy (de)metylacji histonów. Badanie ekspresji metylotransferaz lizyny histonu H3, tj.: *CLF* i *TrxG* oraz metylotransferazy argininy histonu H4, tj.: *PRMT5*

1. Analiza profilu transkrypcji metylotransferaz lizynowych histonu H3 tzn., *CLF* oraz *TrxG*, których białko deponuje odpowiednio znacznik H3K27me3 (hamuje transkrypcję) i H3K4me3 (aktywuje transkrypcję) na promotorze genów *NPR1*, *WRKY1*, *PRI* i *R3a*. Ponadto zaplanowano badanie poziomu znaczników histonowych H3K27me3/*CLF* i H3K4me3/*TrxG* na promotorze wymienionych wyżej genów.
2. Analiza ekspresji metylotransferazy argininowej. Ponadto zaplanowano badanie aktywności białka PRMT5 oraz ocenę poziomu supresyjnego znacznika H4R3sme2/*PRMT5* na promotorze genów obronnych.
3. Ocena zaangażowania PRMT5 w programowaną śmierć komórek (typu HR) po infekcji. Zaplanowano następujące zadania badawcze:
  - Oznaczenie aktywności białka metylotransferazy argininowej po zastosowaniu inhibitora PRMT5.
  - Analiza ekspresji genu *HSR203J* (kluczowy marker HR) oraz badanie poziomu osadzania znacznika H4R3sme2, na promotorze tego genu. Ocena

wpływu inhibitora PRMT5 na rozwój zarazy ziemniaka oraz ilościowa analiza biomasy patogenu poprzez analizę ekspresji *Pitef1* – czynnik elongacji translacji 1 $\alpha$  *P. infestans*.

- Ocena wpływu inhibitora PRMT5 na odporność ziemniaka poprzez analizę ekspresji genu *HSR203J* i *R3a*. Weryfikacja uzyskanych wyników przy pomocy testu TUNEL – aktywnego zamierania jąder komórkowych.

#### IV. Ocena pośredniego wpływu NO na *de novo* metylację DNA

1. Ocena globalnej metylacji – badanie poziomu 5-mC DNA w dwóch odmianach odpornych ziemniaka.
  - Analiza ekspresji genów metylotransferaz DNA zaangażowanych w *de novo* metylację DNA tj. *CMT3* oraz *DRM2*.
2. Oszacowanie udziału metylotransferazy histonowej SUVH4 w metylacji DNA.
  - Analiza ekspresji *SUVH4*, którego białko odpowiada za akumulację supresyjnego znacznika H3K9me2.
  - Określenie poziomu znacznika H3K9me2 na promotorze genu *R3a*.
  - Analiza ekspresji demetylazy histonowej *Jumonji706* (pośrednio odpowiedzialnej za usuwanie supresyjnego znacznika H3K9me2 z promotora genu *R3a*).
3. Określenie wpływu NO na nitrowanie hydrolazy SAHH, odpowiedzialnej za utrzymanie potencjału metylacyjnego w genomie liści ziemniaka.
  - Analiza ekspresji genu *SAHH* oraz określenie wpływu avr *P. infestans* na nitrowanie tyrozyny białka SAHH.
4. Ocena udziału istotnych komponentów szlaku metylacji DNA zależnego od RNA (RdDM), tj., *AGO4*, *DCL3* oraz powiązanej z tym szlakiem metylotransferazy DNA – *DRM2*, w odpowiedzi na zmiany statusu *redoks*.
5. Analiza pośredniego wpływu NO na ekspresję wybranych *miRNAs* oraz powiązanych z nimi określonych *R*-genów odporności, w obu odmianach odpornych ziemniaka.
  - Porównanie profilu transkrypcji *R3a* oraz powiązanego z nim *miR482e*.
  - Porównanie profilu transkrypcji genu odporności *Rpi-phu1* oraz powiązanego z nim *miR6026*.

6. Określenie wpływu NO na proces demetylacji DNA, poprzez analizę ekspresji glikozylaz DNA, tj. *StDME (DEMETER)*, *DML2 (DEMETER-LIKE 2)* i *ROS1 (repressor of silencing 1)*.

**V. Walidacja wpływu NO na zmianę wzorca metylacji chromatyny, tak histonów, jak i DNA, w immunnej odpowiedzi ziemniaka na zarazę**

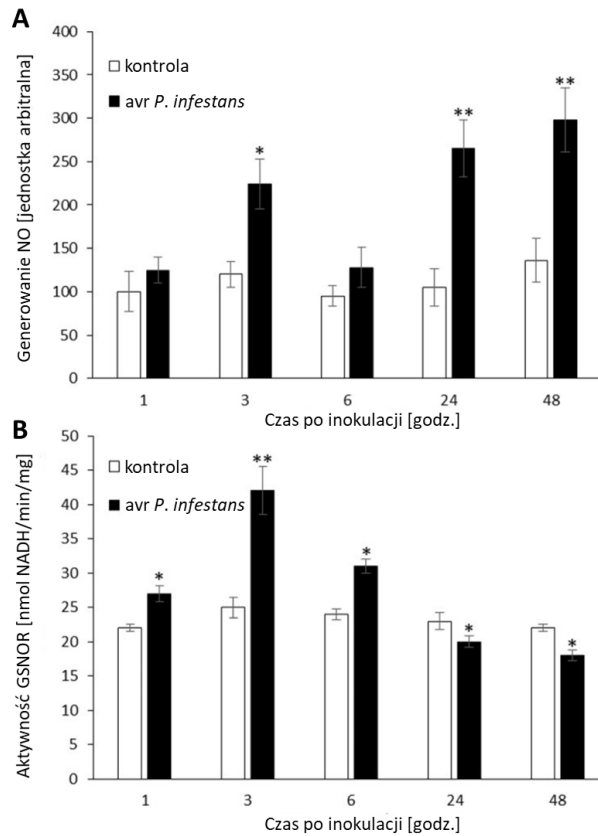
## 6. WYNIKI I ICH OMÓWIENIE

Badania dotyczące identyfikacji i analizy funkcjonalnej biomolekuł modyfikowanych *via* NO, mających wpływ na metylację chromatyny i ekspresję genów związanych z odpornością liści ziemniaka na zarazę, prowadzono w dwóch etapach. Pierwszy etap badań obejmował analizy związane z metylacją histonów, pod wpływem inokulacji liści ziemniaka 'Sarpo Mira' avr izolatem *P. infestans* i niezależnie, w efekcie traktowania liści donorem NO (GSNO). Poniżej zamieszczono wyniki uzyskane w ramach realizacji tego problemu badawczego.

### Publikacja 1.

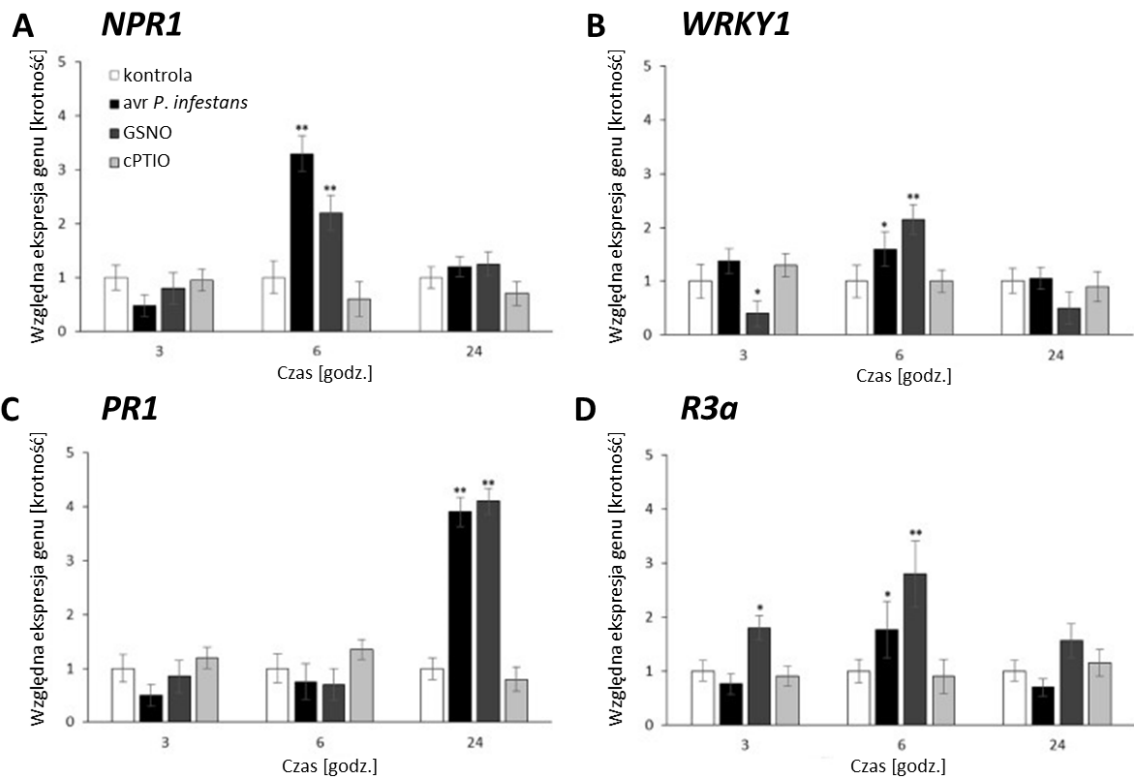
**Droзда, A.,** Kurpisz, B., Arasimowicz-Jelonek, M., Kuźnicki, D., Jagodzik, P., Guan, Y., Floryszak-Wieczorek, J., 2022. Nitric Oxide Implication in Potato Immunity to *Phytophthora infestans* via Modifications of Histone H3/H4 Methylation Patterns on Defense Genes. *Int. J. Mol. Sci.* 23, 4051, (p.1-23).

1. Wykazano, dwufazowe generowanie NO w liściach odpornej odmiany ziemniaka inokulowanych avr *P. infestans*. Na poinfekcyjny dwufalowy profil syntezy NO składały się początkowy, gwałtowny wzrost w 3 godzinie, następnie okresowy spadek 6 godzinie oraz ponowny wzrost generowania w 24-48 godzinie (**Rycina 10A**).
2. Pierwszej fazie nadprodukcji NO, towarzyszył okresowy wzrost aktywności enzymu GSNOR w 3 godzinie, dzięki któremu poziom NO uległ okresowemu obniżeniu w kolejnej 6 godzinie po inokulacji (**Ryciny 10A-B**).



**Rycina 10.** Generowanie NO (**A**) i aktywność reduktazy GSNOR (**B**) po inokulacji liści ziemniaka avr *P. infestans*.

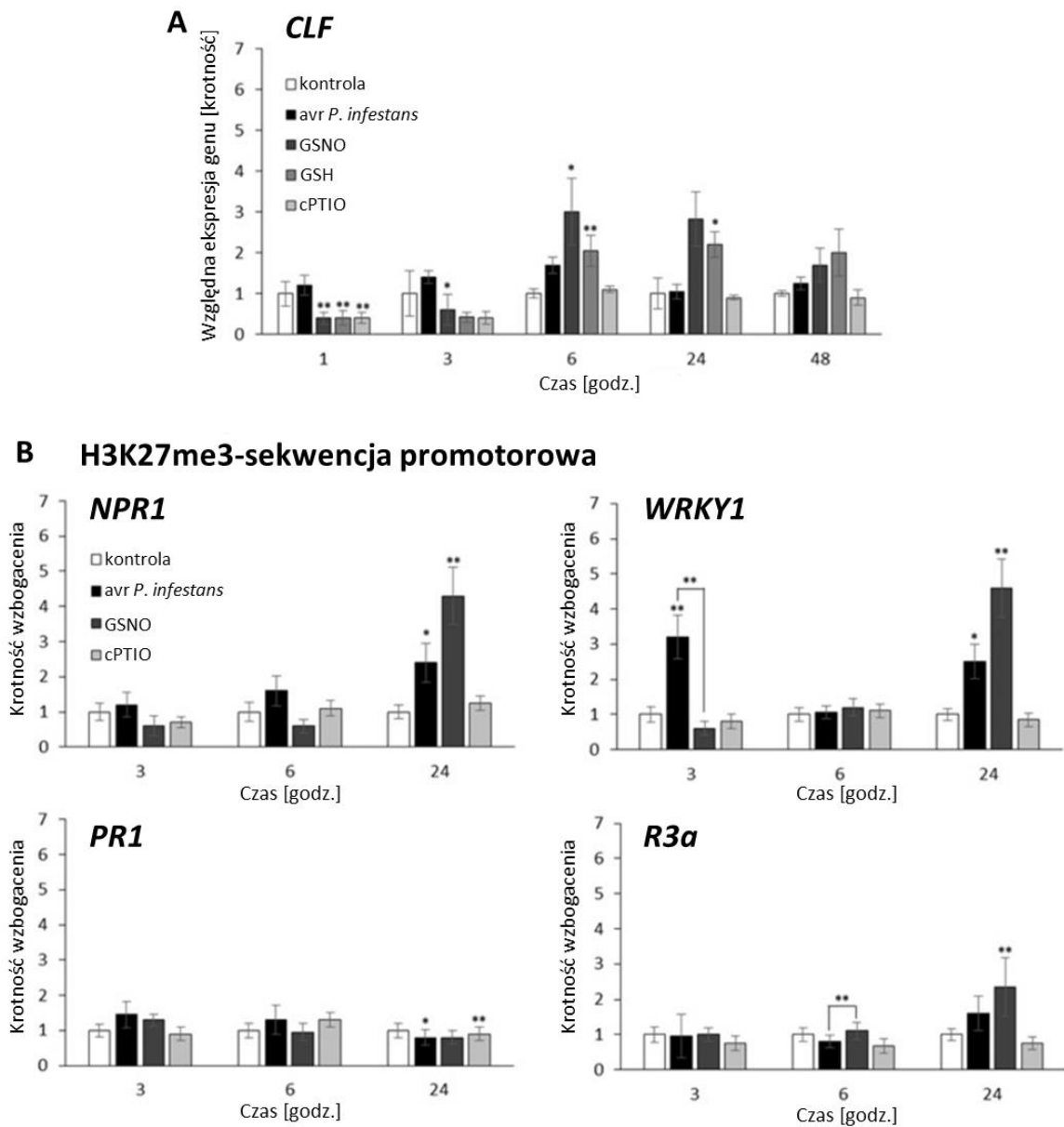
3. Analiza wzoru transkrypcji podstawowych genów obronnych ujawniła, że geny *NPRI*, *WRKY1* i *R3a* osiągały najwyższy poziom ekspresji w 6 godzinie po inokulacji avr *P. infestans* lub GSNO (**Ryciny 11A-B, 11D**). Z kolei aktywność genu *PR1* (regulowana przez *NPRI*) wzrastała w późniejszym terminie, tj. w 24 godzinie po inokulacji lub traktowaniu GSNO (**Rycina 11C**).



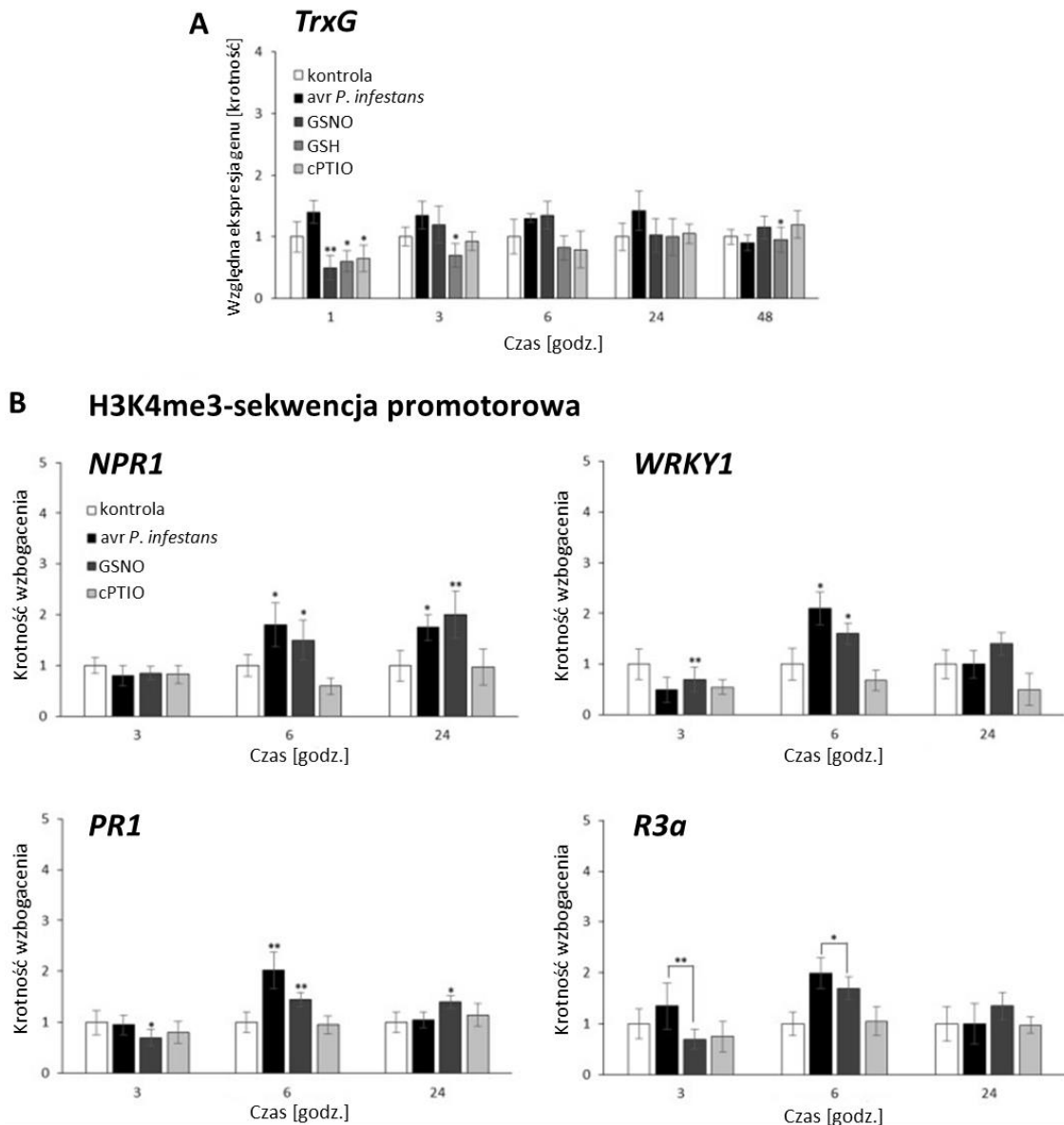
**Rycina 11.** Wpływ avr *P. infestans* i GSNO na transkrypcję genów obronnych ziemniaka – analiza ekspresji genów *NPR1* (A), *WRKY1* (B), *PR1* (C) i *R3a* (D).

4. Stwierdzono opóźniony w czasie wzrost (w 6-24 godzinie) transkrypcji genów metylotransferaz lizynowych *CLF* i nieznacznie podwyższony *TrxG*, bezpośrednio po infekcji avr *P. infestans* lub traktowaniu GSNO (**Ryciny 12A, 13A**). Wzmoczone osadzanie supresyjnego znacznika H3K27me3/*CLF* na promotorze genów *NPR1*, *WRKY1*, *R3a* zasadniczo stwierdzono dopiero w terminach późniejszych, tj. po 24 godzinie (**Rycina 12B**).





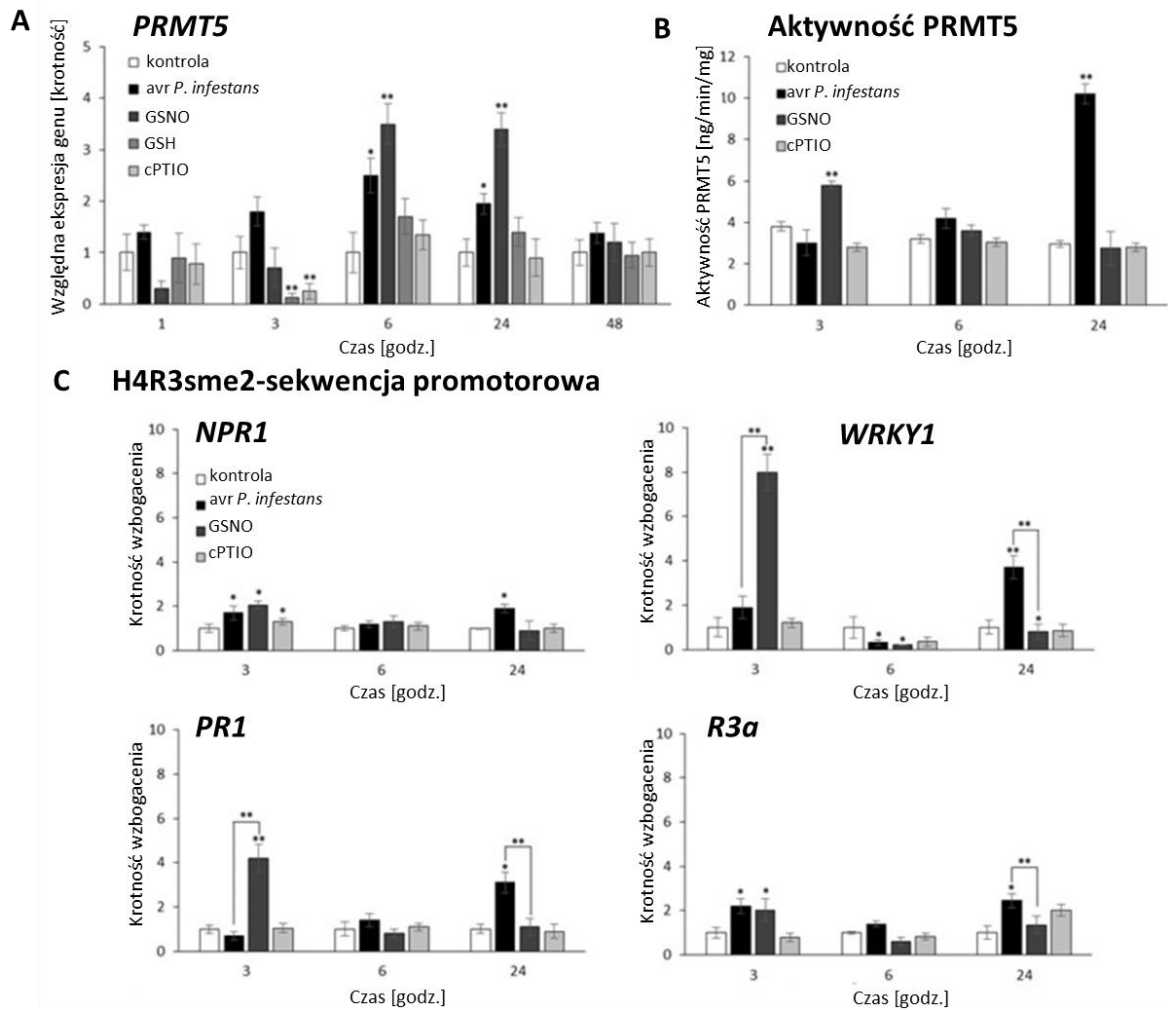
**Rycina 12.** Profil ekspresji metylotransferazy *CLF* (A) i poziomy dystrybucji supresyjnego znacznika H3K27me3 na promotorze wymienionych genów (B).



**Rycina 13.** Profil ekspresji metylotransferazy *TrxG* (A) i poziomy dystrybucji aktywnego znacznika H3K4me3 na promotorze wymienionych genów (B).

- Z kolei, odnotowany wzrost poziomu aktywnego znacznika H3K4me3/*TrxG* na promotorze genów obronnych w 6 godzinie, korelował ze wzrostem ekspresji tych genów, w tym samym przedziale czasowym (**Ryciny 11A-B, 11D, 13B**).
5. Zarówno patogen, jak i donor NO wpływał na wzrost ekspresji *PRMT5*, co ujawniło się szczególnie w 6-24 godzinie po traktowaniu (**Rycina 14A**).
- Nie stwierdzono bezpośredniej korelacji czasowej pomiędzy kinetyką ekspresji genu a aktywnością białka PRMT5. Wzrostowi ekspresji genu *PRMT5* w 6 godzinie towarzyszył raczej spadek lub brak zmian w aktywności PRMT5 w analogicznym przedziale czasowym (**Ryciny 14A-B**).

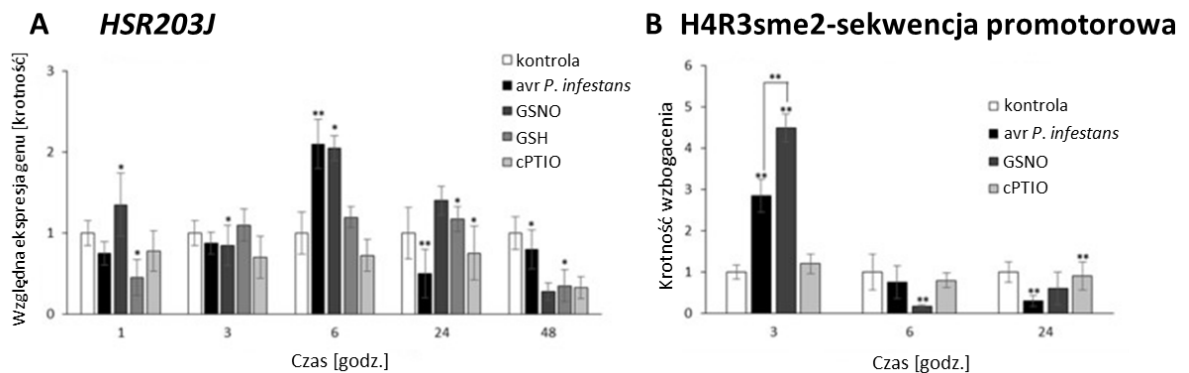
- Stwierdzono zwiększoną akumulację znacznika H4R3sme2/PRMT5 na promotorze genów: *NPR1* (2-krotny wzrost), *WRKY1* (8-krotny wzrost) i *PR1* (4-krotny wzrost) w 3 godzinie po traktowaniu GSNO oraz *R3a* (2-krotny wzrost) po infekcji patogenem (**Rycina 14C**). Co ważne, dysocjacja tego supresyjnego znacznika na promotorze wszystkich wymienionych powyżej genów w 6 godzinie, prawdopodobnie sprzyjała wzrostowi ich aktywności transkrypcyjnej (**Ryciny 14C, 11A-B, 11D**).



**Rycina 14.** Zależne od NO zmiany w metylacji arginyiny histonu H4. Ekspresja *PRMT5* (**A**), aktywność białka *PRMT5* (**B**) i poziom dystrybucji supresyjnego znacznika H4R3sme2 na promotorze wymienionych genów (**C**).

- Podobnie jak w przypadku genów strategii obronnej, okresowy spadek poziomu znacznika H4R3sme2 na promotorze ważnego genu aktywnego zamierania –

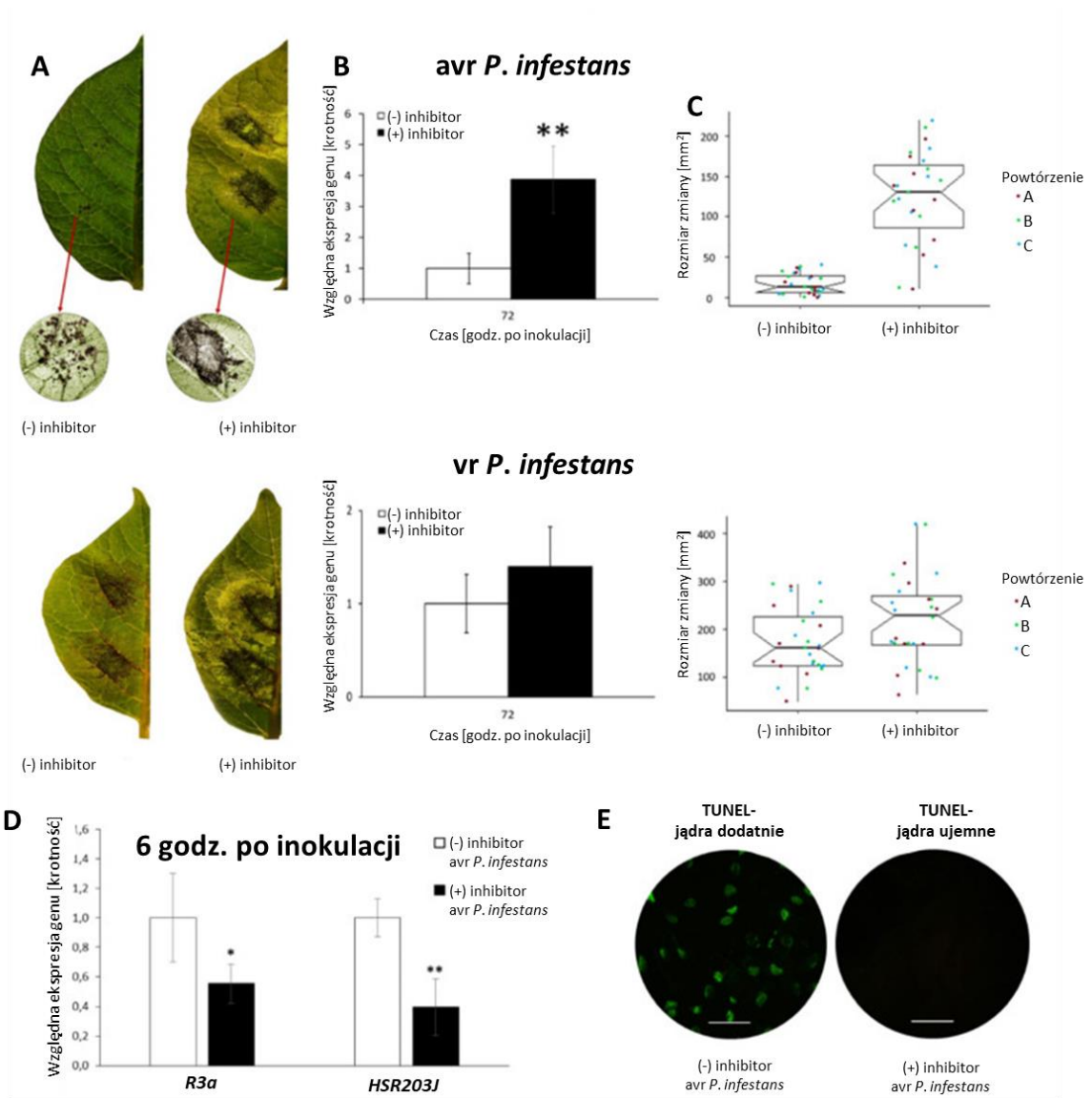
HR, tj. *HSR203J* współgrał ze wzrostem transkrypcji tego genu w 6 godzinie po infekcji lub GSNO (**Ryciny 15A-B**).



**Rycina 15.** Analiza ekspresji genu *HSR203J* (A) oraz poziom dystrybucji supresyjnego znacznika H4R3sme2 na promotorze tego genu (B).

- Zastosowany inhibitor PRMT5 znacznie ograniczał ekspresję genów *R3a* i *HSR203J*, a także osłabiał HR, co potwierdził negatywny wynik testu aktywnego zamierania jąder komórkowych (**Ryciny 16A, 16D-E**). Również analiza ekspresji genu *Pitef1* ujawniła znaczny wzrost biomasy avr *P. infestans*, w odniesieniu do liści ziemniaka bez dodatku inhibitora (**Rycina 16B**).
- Przeprowadzone analizy prowadzą do konkluzji, że PRMT5 ma ważny wpływ na odporności liści ziemniaka na zarazę. Wykazano, że poinfekcyjny spadek poziomu znacznika H4R3sme2/PRMT5 (hamującego transkrypcję) prawdopodobnie odegrał istotną rolę w regulowaniu odpowiedzi obronnych i aktywacji HR.

Uzyskane w ramach pierwszego etapu badań wyniki, wskazują na istnienie pośredniego związku pomiędzy przejściowym spadkiem generowania NO (wskutek aktywności GSNOR) w 6 godzinie a epigenetyczną modyfikacją ekspresji genów strategii obronnej i *R3a*. Obniżenie poziomu represyjnego znacznika H4R3sme2/PRMT5 oraz wzrost poziomu aktywnego transkrypcyjnie znacznika H3K4me3/*TrxG* na promotorze wyżej wspomnianych genów (w 6 godzinie), sprzyjały ich ekspresji. Powyższa zależność dokumentuje związek funkcjonalny pomiędzy procesami metylacji histonów H3 i H4.



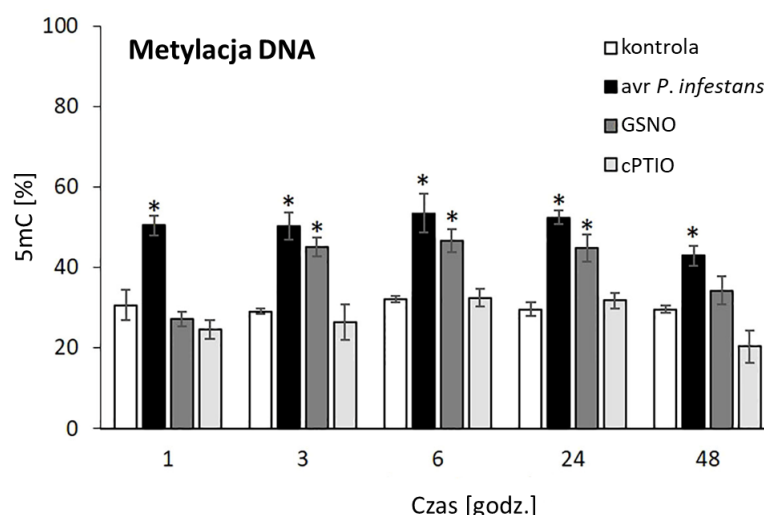
**Rycina 16.** Wykazanie, że aktywność PRMT5 jest ważna w odporności ziemniaka na avr *P. infestans*. Powierzchnia liści ziemniaka (z inhibitorem lub pozbawiona inhibitora PRMT5) z objawami zarazy ziemniaka (A), ekspresja genu *Pitef1* (B) i pomiar wielkości uszkodzeń w 72 godzinie po inokulacji avr lub vr *P. infestans* (MP977); (C). Ekspresja genów *R3a* i *HSR203J* (D) oraz test TUNEL w 6 godzinie po inokulacji avr *P. infestans* (E).

Kontynuacja badań w ramach przedstawianej dysertacji uwzględniała również analizę zmian w statusie metylacji DNA liści ziemniaka ‘Sarp Mira’ pod wpływem infekcji i traktowania GSNO. Poniżej zamieszczono wyniki uzyskane w ramach realizacji kolejnego problemu badawczego.

## Publikacja 2.

**Drozda, A., Kurpisz, B., Guan, Y., Arasimowicz-Jelonek, M., Plich, J., Jagodzick, P., Kuźnicki, D., Floryszak-Wieczorek, J., 2022.** Insights into the expression of DNA (de)methylation genes responsive to nitric oxide signaling in potato resistance to late blight disease. *Front. Plant Sci.* 13:1033699, (p.1-20).

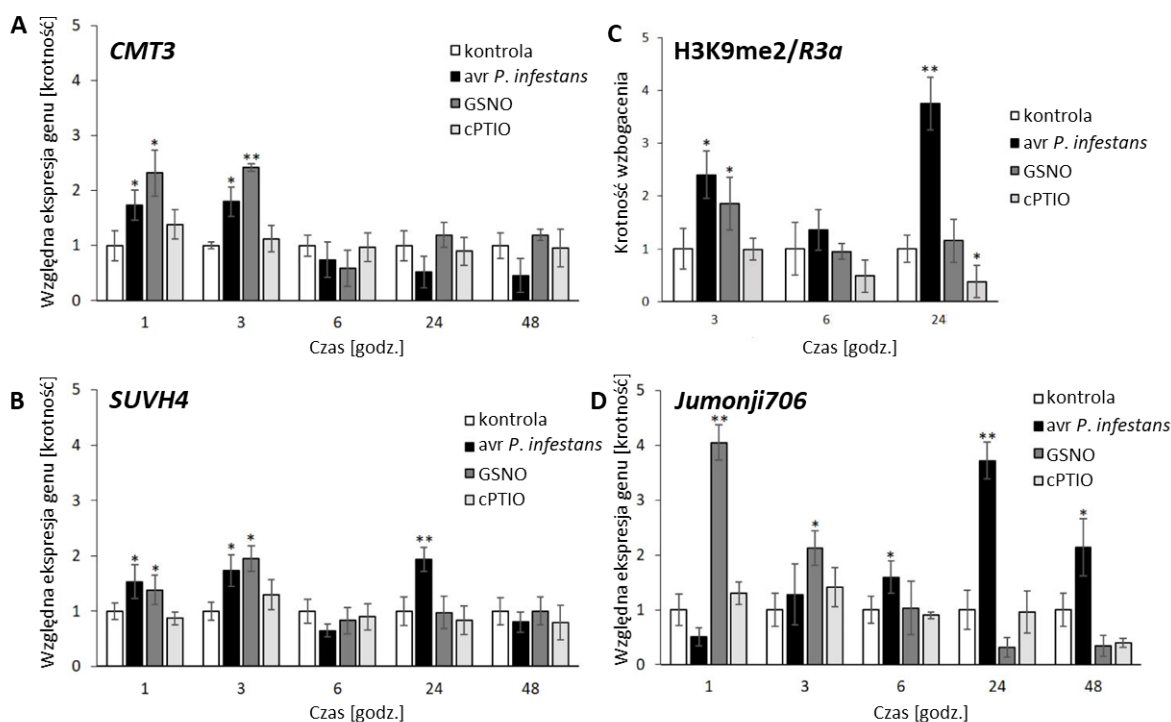
1. W liściach obu genotypów ziemniaka (zarówno w ‘Sarp Mira’ jak i linii TG 97-411) po inokulacji avr *P. infestans* lub traktowaniu GSNO stwierdzono, wzrost (około 2-krotny) poziomu metylacji (5-mC) DNA (**Rycina 17; Rycina uzupełniająca 1**).



**Rycina 17.** Wpływ avr *P. infestans* lub GSNO na globalną metylację DNA w liściach ziemniaka (‘Sarp Mira’).

2. Wykazano, podobny wzrost (ok. 2-krotny) transkrypcji metylotransferazy histonowej – *SUVH4* i metylotransferazy DNA – *CMT3* we wczesnych godzinach po infekcji lub GSNO (w 1-3 godzinie).
  - Z kolei, hamowaniu ekspresji genów *SUVH4* i *CMT3* w 6 godzinie, odpowiadał spadek akumulacji supresyjnego znacznika H3K9me2/*SUVH4* na promotorze

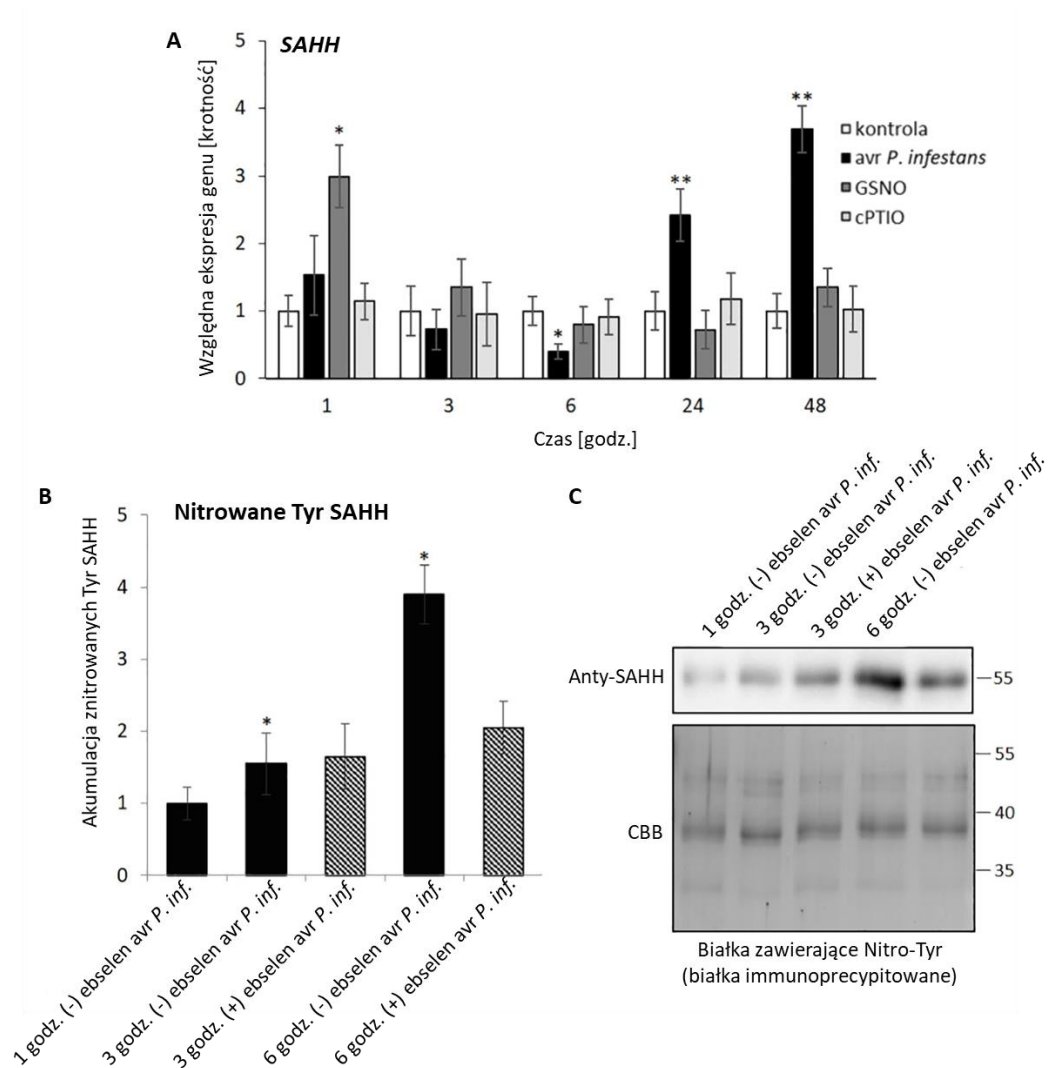
genu *R3a* (co sprzyjało transkrypcji *R3a*) i korelowało z okresowym spadkiem NO/GSNOR (**Rycina 18**).



**Rycina 18.** Związek funkcjonalny pomiędzy metylacją histonu a metylacją DNA po inokulacji liści ziemniaka avr *P. infestans* lub GSNO. Profil ekspresji metylotransferazy DNA – *CMT3* (**A**), metylotransferazy histonowej – *SUVH4* (**B**), status dystrybucji znacznika H3K9me2/*SUVH4* na promotorze genu *R3a* (**C**), profil ekspresji demetylazy histonowej *Jumonji706* (**D**).

3. Stwierdzono silne nitrowanie tyrozyny SAHH (ważnego komponentu cyklu metylacji SAM/SAHH) w odpowiedzi na avr *P. infestans* (**Rycina 19B**).

- Jednocześnie wykazano drastyczne hamowanie transkrypcji genu *SAHH* w 6 godzinie (**Rycina 19A**), któremu odpowiadał spadek ekspresji genu *CMT3* – wysoce wrażliwego na zaburzenia cyklu metylacji SAM/SAHH (**Rycina 18A**). Późniejszemu wzrostowi ekspresji genu *SAHH* oraz demetylazy histonowej *Jumonji706* (w 24 godzinie po inokulacji), odpowiadało ponowne osadzenie supresyjnego transkrypcyjnie znacznika H3K9me2 na promotorze genu *R3a* (**Ryciny 19A; 18C-D**).

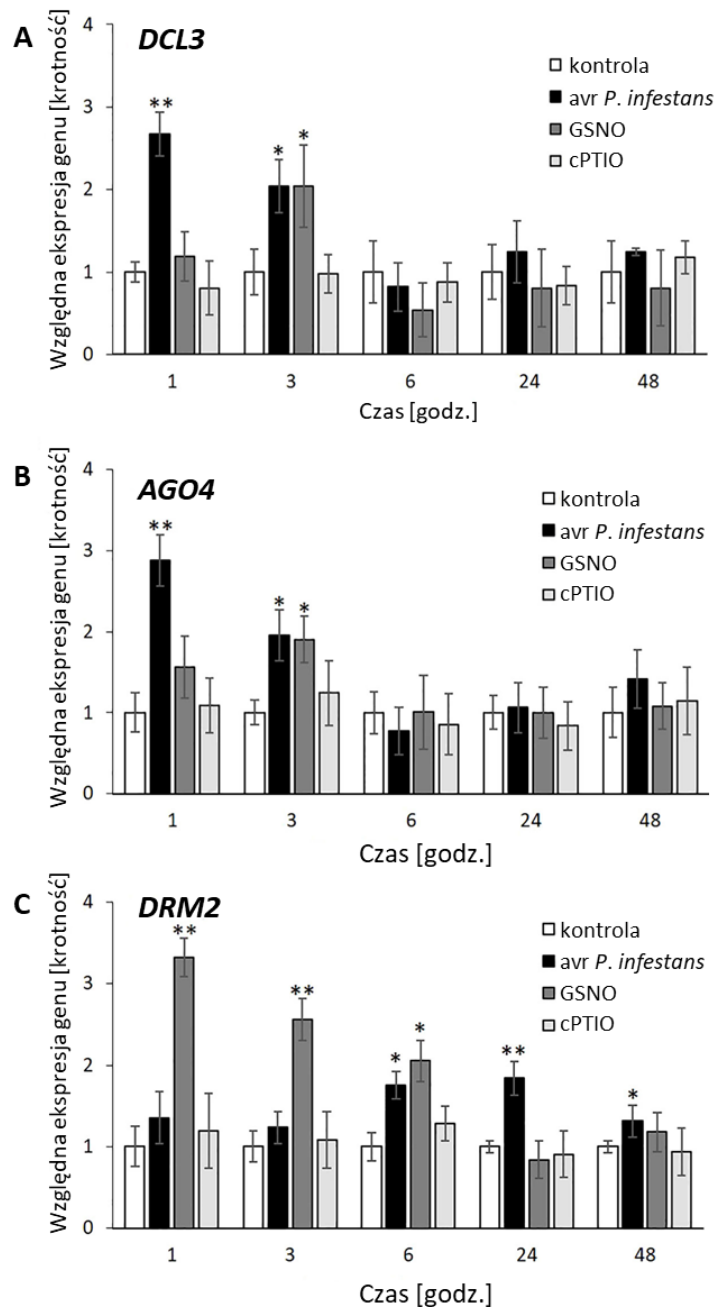


**Rycina 19.** Profil ekspresji hydrolazy *SAHH* (A) i nitrowanie Tyr *SAHH* w liściach ziemniaka (B; C).

4. Zmiany profilu transkrypcji genów *DCL3*, *AGO4* i *DRM2*, analizowano w odniesieniu do kinetyki generowania NO (**Ryciny 20A-C**).

- Zarówno *DCL3*, jak i *AGO4* wykazywały podobną tendencję zmian w ekspresji genu, w postaci silnego i okresowego wzrostu, w pierwszych trzech godzinach po inokulacji lub traktowaniu GSNO.
- Pozostająca w związku ze szlakiem RdDM metylotransferaza *DRM2* (odpowiada za *de novo* metylację DNA) ulegała podobnej ekspresji (maksymalny wzrost w 1-3 godzinie), zwłaszcza pod wpływem GSNO (**Rycina 20C**).



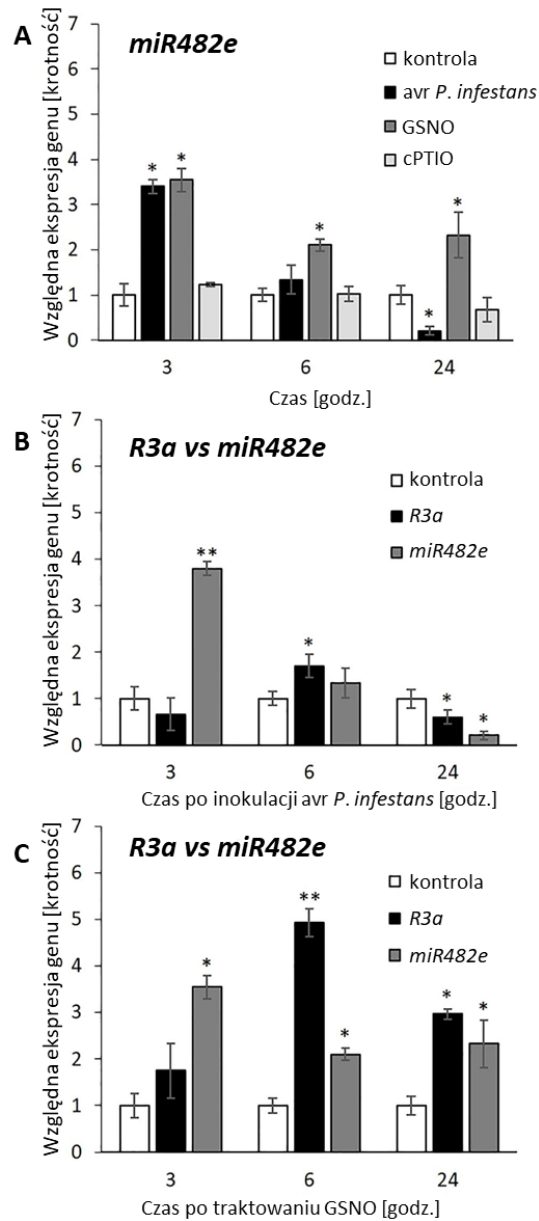


**Rycina 20.** Wpływ avr *P. infestans* lub GSNO na szlak RdDM. Analiza ekspresji genów *DCL3* (A), *AGO4* (B), *DRM2* (C).

5. Wykazano, pośredni wpływ NO na ekspresję wybranych miRNAs związanych z regulacją ekspresji *R*-genów odporności w obu odmianach odpornych ziemniaka (Rycina 21A-C; Rycina uzupełniająca 2).

- Okresowemu wzrostowi ekspresji *R3a* w 6 godzinie, towarzyszył spadek regulującego go *miR482e* w tym samym punkcie czasowym. Podobną negatywną

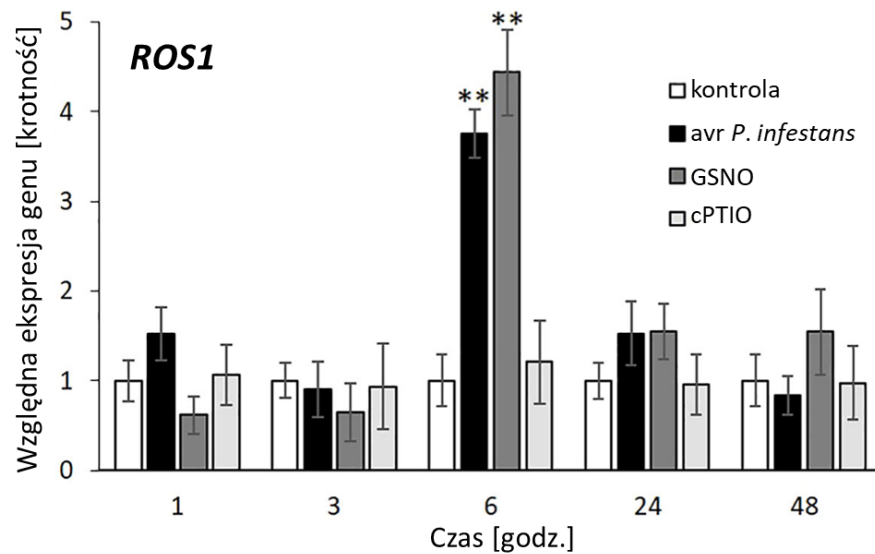
korelację stwierdzono między ekspresją genu odporności *Rpi-phu1* i *miR6026* w linii hodowlanej TG 97-411 (**Ryciny 21A-B; Rycina uzupełniająca 2**).



**Rycina 21.** Profil ekspresji *miR482e* i jego celu, genu *R3a* po traktowaniu avr *P. infestans* lub GSNO. Analiza ekspresji *miR482e* (A), *miR482e* w porównaniu z *R3a* po infekcji (B) lub GSNO (C).

- O zaangażowaniu szlaku RdDM świadczyły również dane dotyczące wzorca transkrypcji genu demetylazy *ROS1*. Najwyższy poziom ekspresji tego genu (około 4-krotny), wykazano w 6 godzinie po infekcji lub GSNO (**Rycina 22**). *ROS1* prawdopodobnie mógł okresowo osłabiać *de novo* metylację DNA, aby

zapobiec wyciszeniu genu *R3a* w ziemniaku inokulowanym avr *P. infestans* lub traktowanym GSNO.



**Rycina 22.** Ekspresja genu *ROS1* – demetylasy DNA zaangażowanej w szlak RdDM.

W efekcie przeprowadzonych eksperymentów w ramach drugiego etapu badań wykazano, że pierwsza faza wzmózonego generowania NO sprzyjała metylacji DNA i ekspresji genów szlaku RdDM (*DCL3*, *AGO4*, *DRM2* i *miR482e*), ograniczając transkrypcję genu *R3a* (z wysokim poziomem H3K9me2 na promotorze). Indukowany przez wzmózoną aktywność GSNOR, okresowy spadek poziomu NO (w 6 godzinie), skutkował obniżeniem hamującego oddziaływania *miR482e* wobec genu *R3a* (z wysokim poziomem H3K4me3 na promotorze). W konsekwencji wzrost aktywności genu *R3a* sprzyjał odporności ‘Sarpo Mira’ względem avr patogenu.

## 7. DYSKUSJA

Infekcja patogenem może zaburzać homeostazę NO w komórkach roślinnych i przyczynić się do jego nadprodukcji, znanej powszechnie jako wyrzut NO. Badania w ramach przedstawianej rozprawy doktorskiej potwierdziły dwufazową kinetykę generowania NO w liściach ziemniaka inokulowanych avr *P. infestans*, zależną od aktywności reduktazy GSNOR. Poinfekcyjny wzrost aktywności GSNOR, w pierwszej fazie nadprodukcji NO, wpływał na obniżenia poziomu NO w kolejnym punkcie czasowym, tj. w 6 godzinie po inokulacji. Okresowy spadek poziomu NO był kluczowy dla epigenetycznej regulacji aktywności genu odporności *R3a* oraz genów strategii obronnej – *NPR1*, *WRKY1* i *PR1* po infekcji patogenem lub traktowaniu GSNO.

Szybka aktywacja bądź wyciszenie genów po ataku patogenu wymaga swoistej koordynacji stanu chwiejnej równowagi pomiędzy aktywnym H3K4me3 i hamującym transkrypcję H3K27me3 – znaczników histonowych na promotorach tych genów. Stwierdzona w tej pracy okresowa akumulacja znacznika H3K4me3 kierowana przez TrxG, na promotorze genów *NPR1*, *WRKY1*, *PR1* i *R3a*, sprzyjała transkrypcji wymienionych genów. Niezależnie, analizowany poziom represyjnego znacznika H3K27me3/*CLF* nie powodował hamowania osadzania aktywnego znacznika H3K4me3/*TrxG* na tych samych regionach promotora. Uzyskane dane zdają się zgodne z wynikami badań [Liu i in. \(2014\)](#), w których wysoki poziom supresyjnego znacznika H3K27me3 na genach związanych ze stresem odwodnienia, nie hamował osadzania aktywnego znacznika H3K4me3 i nie zakłócał wzmożonej transkrypcji wspomnianych genów. Wyniki badań innych autorów dowodzą, że modyfikacje histonowe w warunkach stresowych, mogą czasami zachodzić niezależnie od statusu transkrypcji genów ([Sani i in. 2013](#); [Sneppen i Ringrose 2019](#); [Kim 2021](#)).

Metylacja reszt argininy katalizowana przez PRMT5 uznawana jest za bardziej stabilną modyfikacją potranslacyjną histonu niż metylacja lizyny ([Vasudevan i in. 2015](#)). [Fan i in. \(2014\)](#) postulowali, że PRMT5, znany również jako SKB1, ustanawia represyjny znacznik H4R3me2 i uczestniczy w wykrywaniu sygnałów środowiskowych. Analiza genomu mutantów typu dzikiego i *prmt5* nie potwierdziła jednak tej tezy ([Hernando i in. 2015](#)). Z kolei, [Hu i in. \(2017\)](#) wykazali, że NO pozytywnie reguluje aktywność PRMT5 poprzez S-nitrozylację na Cys-125 w odpowiedzi na stres solny. Jak dotąd nie wyjaśniono jednak, w jaki sposób regulowana jest aktywność tej metylotransferazy podczas ataku patogenu. Warto zauważyć, że w przeprowadzonych w ramach dysertacji badaniach, spadek poziomu represyjnego znacznika H4R3me2/*PRMT5*, wystąpił jednocześnie ze

zwiększonym poziomem aktywnego H3K4me3/*TrxG* w tych samych regionach promotora. Obniżenie poziomu NO (dzięki aktywności GSNOR) w 6 godzinie, korelowało z potencjalnym dialogiem między metylotransferazami lizyny (*TrxG*) i argininy (*PRMT5*), co skutkowało przełączeniem znaczników histonowych na promotorach analizowanych genów.

Szybkie obumieranie komórek rośliny-gospodarza w miejscach, w których doszło do infekcji patogenem, jest charakterystyczną cechą odporności typu ETI (Balint-Kurti 2019). Z uzyskanych danych wynika, że inhibitor *PRMT5* ograniczył ekspresję genu odporności *R3a* i reakcje typu HR, co potwierdzono negatywnym testem TUNEL – czyli brakiem aktywnego zamierania jąder. Co ważne, nietraktowane inhibitorem *PRMT5* liście ziemniaka po inokulacji, wykazywały początkowo wysoki poziom H4R3sme2/*PRMT5* na promotorze *HSR203J*, który uległ jednak drastycznemu obniżeniu w kolejnym punkcie czasowym (w 6 godzinie), co sprzyjało transkrypcji genu *HSR203J* oraz pozytywnej reakcji HR.

Pozostaje niejasne, czy osadzanie znacznika H4R3sme2/*PRMT5*, bezpośrednio reguluje aktywność transkrypcyjną *HSR203J* w odpowiedzi na HR po inokulacji patogenem. Wyniki badań innych autorów potwierdzają, że *HSR203J* może być celem dla *WRKY1* lub innych czynników transkrypcyjnych rozpoznających regulatorową sekwencję W-box obecną w promotorze różnych genów zaangażowanych w stres biotyczny (Pontier i in. 1998; Pontier i in. 2001). Wyniki uzyskane w ramach badań przedstawianej rozprawy doktorskiej, wskazują na możliwość istnienia podobnego związku pomiędzy *StWRKY1* a *HSR203J* w liściach ziemniaka inokulowanych avr *P. infestans*.

Co ciekawe, inni badacze wcześniej wskazywali, że *StWRKY1* bierze udział w różnych mechanizmach obronnych, włączając regulację ekspresji genów związanych z metabolitami fenylopropanoidowymi, które odpowiadają za wzmocnienie struktury wtórnej ściany komórkowej, a także zwiększanie odporności ziemniaka na infekcję *P. infestans* (Yogendra i in. 2015; Chacón-Cerdas i in. 2020). Modyfikacja struktury ściany komórkowej rośliny-gospodarza w kierunku integracji z błoną komórkową jest kluczowa dla wykrywania oraz inicjowania kilku wzajemnie powiązanych, jak i niezależnych elementów sygnalizacji obronnej, takich jak wybuch ROS/NO i śmierć komórki. (Naveed i in. 2020). Dalsze badania podjęte w ramach dysertacji miały na celu wyjaśnić rolę NO w regulacji procesu metylacji DNA w trakcie infekcji ziemniaka avr *P. infestans*.

Utrzymanie stabilności genomu zależy od metylacji *de novo* DNA, która zapobiega przemieszczaniu się TEs lub blokowanie ich wiązania ze specyficznymi sekwencjami 5-mC DNA. Dzięki temu nie dochodzi do aktywacji transkrypcji genów supresorowych, które

mogłyby zahamować ekspresję genów obronnych (Dowen i in. 2012; Viggiano i de Pinto 2017; Huang i Jin 2021). W pracy badano udział egzo- i endogennego NO w procesie metylacji *de novo* DNA, która pozostaje w dialogu z metylacją histonów. Inokulacja liści ziemniaka avr *P. infestans* oraz traktowanie GSNO sprowokowały około 2-krotny wzrost poziomu metylacji 5-mC DNA w genomie obu genotypów ziemniaka ('Sarp Mira' i TG 97-411). Dla porównania Fan i in. (2012) zastosowali w swoich badaniach 50  $\mu$ M SNP (alternatywny donor NO) i wykazali wzrost wskaźnika demetylacji metylowanych regionów genomowego DNA, co ostatecznie wzmocniło odporność *Dendrobium huoshanense* na stres suszy. Z kolei, u sadzonek dwóch genotypów ryżu, identyczne stężenie SNP powodowało hipermetylację DNA (Ou i in. 2015). Natomiast Rudolf i in. (2021) wskazują, że na aktywność transmetylacji powiązaną z TEs i ekspresją genów związanych ze stresem, może wpływać aktywność GSNOR1. Wzrost metylacji DNA wykazywały mutanty *Arabidopsis*, z niedoborem reduktazy GSNO (*gsnor1-3*) i wysokim poziomem NO. Co ważne, jednocześnie odnotowano zmniejszoną ekspresję TEs i genów reagujących na stres w porównaniu z typem *dzikim*. Nie można zatem wykluczyć, że stwierdzony w dysertacji szybki wzrost poziomu 5-mC DNA, w pierwszych godzinach po infekcji ziemniaka avr *P. infestans* był prawdopodobnie związany z hamowaniem TEs oraz supresorów genów obronnych.

Wyniki badań wielu autorów wskazują na fakt, że kluczowe komponenty cyklu metylacji SAM/SAH podlegają nitrowaniu w stresie (Chaki i in. 2009; Lozano-Juste i in. 2011; Begara-Morales i in. 2013; Arasimowicz-Jelonek i in. 2016). Wcześniej odkryto, że nitrowaniu ulega tyrozyna w białku SAHH w słoneczniku (Chaki i in. 2009) i ziemniaku (Arasimowicz-Jelonek i in. 2016). W prezentowanej pracy stwierdzono silne nitrowanie Tyr SAHH, któremu towarzyszyło hamowanie transkrypcji genu tego enzymu.

Eksperyment badający wpływ szlaku metylacji *de novo* za pośrednictwem RdDM na rozwój infekcji ujawnił negatywną korelację pomiędzy *miRNAs* a transkrypcją docelowych *R*-genów. Przejściowy spadek poziomu NO (w 6 godzinie po inokulacji) i obniżenie poziomów ekspresji *DCL3* i *AGO4* zmniejszyły ekspresję genu *miR482e*, co umożliwiło wzrost transkrypcji genu *R3a*. Warto zauważyć, że *miR6026* wykazał podobny efekt wobec *Rpi-phul*, co z pewnością pozytywnie wpłynęło również na aktywizację odpowiedzi obronnych w linii TG 97-411 względem avr *P. infestans*. Co ważne, podobny efekt negatywnej korelacji pomiędzy *miRNAs* a *R*-genami uzyskano w obu odmianach ziemniaka po traktowaniu liści donorem NO.

Zhao i in. (2019) wykazali ostatnio, że egzogenny NO (SNP) może uruchamiać

miRNAs w roślinach *Medicago sativa* poddanych stresowi suszy. Niektóre z egzogennych miRNAs reagujących na NO były ukierunkowane na geny reagujące na stres o przeciwnych profilach ekspresji. Indukowana przez SNP obniżona ekspresja miR156 lub miR399 zwiększała tolerancję lucerny na stres suszy (Zhao i in. 2019).

Uzyskane dane ujawniły, że geny *DCL3*, *AGO4* i *DRM2*, główne składniki szlaku RdDM, wykazywały podobną kinetykę zmian w aktywności transkrypcyjnej skorelowaną z przeciwną ekspresją genów *miRNAs/R* co sprzyjało odporności na *P. infestans*.

U *Arabidopsis thaliana* wyciszenie *AGO4* prowadzi do zwiększonej podatności na zjadliwy patogen bakteryjny *Pseudomonas syringae* (Agorio i Vera 2007; Yu i in. 2013). Również inne mutanty RdDM, w tym *nrpe1*, *nrpd2*, *ago4*, *drd1* i *rdr2*, wykazywały zmniejszoną oporność na *P. syringae* (López i in. 2011), co wskazuje na krytyczne znaczenie szlaku RdDM i TEs ukierunkowanych specjalnie na metylację DNA w regulacji odporności roślin.

Dynamiczne zmiany poziomu NO miały wpływ na regulację genów związanych z obroną *NPRI*, *WRKY1*, *PRI* i *R3a* oraz inicjowały inne reakcje obronne, takie jak gwałtowne zamieranie komórek.

W podsumowaniu dyskusji dotyczącej wyników otrzymanych w ramach niniejszej dysertacji wyciągnięto najważniejsze wnioski końcowe, przedstawione poniżej.

## 8. WNIOSKI

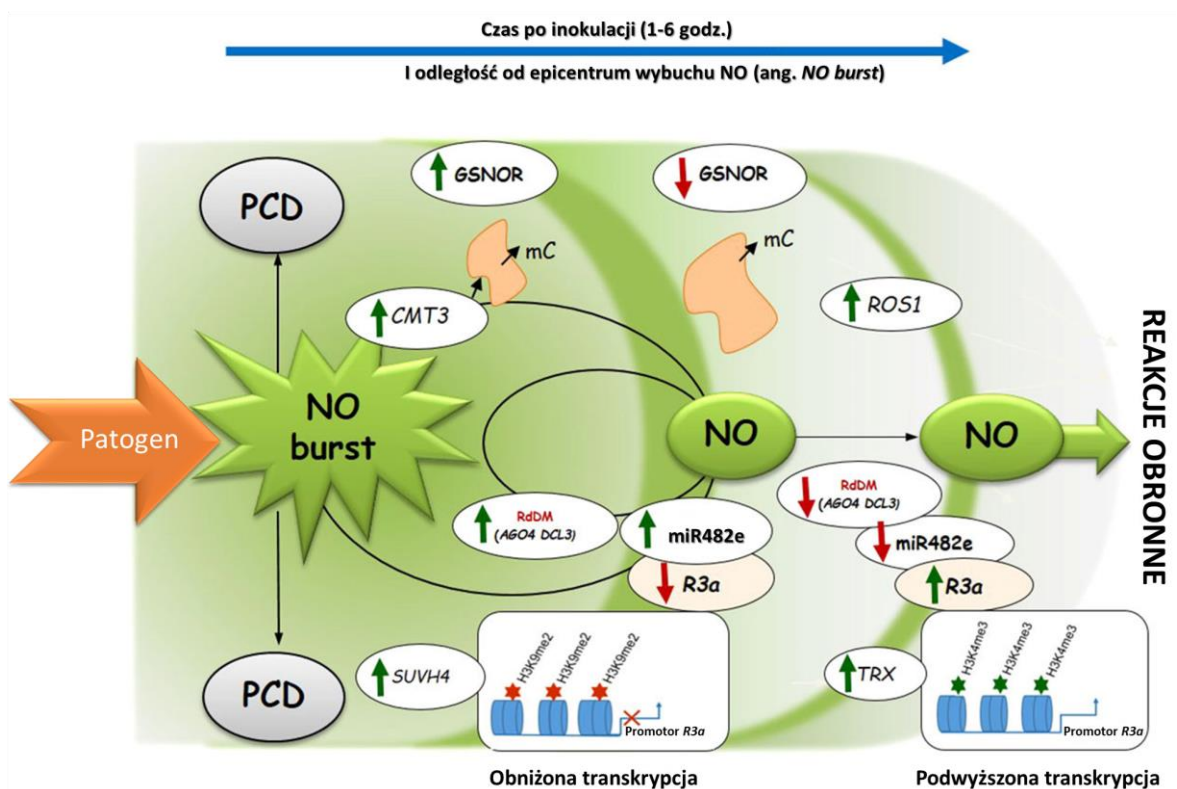
- 1) Uzyskane wyniki wskazują na pośredni związek NO z odpornością liści ziemniaka na zarazę o podłożu epigenetycznym. W liściach ziemniaka inokulowanych avr *P. infestans* wykazano zależny od czasu i statusu *redoks* komórki, związek funkcjonalny pomiędzy metylotransferazami lizyny i argininy histonu H3 i H4, w przeprogramowaniu aktywności genów obronnego reagowania.
- 2) W efekcie poinfekcyjnego wybuchu NO, stwierdzono ścisłą zależność pomiędzy kontrolowanym przez reduktazę GSNOR poziomem NO a epigenetyczną regulacją aktywności genu *R3a* oraz genów strategii obronnej – *NPR1*, *WRKY1* i *PR1*.
- 3) Kierowana pośrednio przez metylotransferazę lizyny *TrxG* okresowa akumulacja znacznika H3K4me3 na sekwencjach promotorowych *NPR1*, *WRKY1*, *PR1* i *R3a*, sprzyjała wzmożonej ekspresji tych genów.
- 4) Na podstawie analizy ekspresji genu, aktywności białka i z zastosowaniem inhibitora, udokumentowano istotny udział metylotransferazy argininy – PRMT5 osadzającej supresyjne znaczniki transkrypcji – H4R3sme2, bezpośrednio po inokulacji patogenu. Późniejsza dysocjacja tych znaczników (w 6 godzinie) na promotorach genów strategii obronnej oraz *HSR203J*, sprzyjała aktywnemu zamieraniu komórek i ograniczaniu rozwoju zarazy ziemniaka.
- 5) Stwierdzony uprzednio, w tym samym czasie (w 6 godzinie), wzrost poziomu znaczników H3K4me3 (aktywnych transkrypcyjnie) na promotorach genów obronnych, wskazuje na możliwość wystąpienia międzyhistonowego (H3/H4) dialogu pomiędzy metylotransferazami lizyny i argininy. Faza obniżonego poziomu NO dzięki aktywności GSNOR (w 6 godzinie) i zależna od NO droga sygnałowa, może stanowić czynnik indukujący wymianę znaczników i tym samym odpowiadać za wzrost aktywności genów obronnych.
- 6) W obu odpornych odmianach ziemniaka, stwierdzono okresowy wzrost globalnej *de novo* metylacji 5-mC DNA, bezpośrednio po inokulacji oraz traktowaniu liści donorem NO.
- 7) Metylacji DNA towarzyszył okresowy wzrost ekspresji *SUVH4* (osadzającej supresyjne znaczniki H3K9me2) oraz kluczowych genów szlaku RdDM (*DCL3*, *AGO4* i *DRM2*), co przy wysokim poziomie generowania NO i silnej metylacji hamowało początkowo transkrypcje genów strategii obronnej (w 1-3 godzinie).



- 8) Udokumentowano negatywną korelację ekspresji *miRNAs* na korzyść targetowanych *R*-genów (w 6 godzinie), co sprzyjało późniejszej aktywacji *R*-genów i wzmacniało odporność w obu odmianach ziemniaka.
- 9) Wykazano, że po infekcji avr *P. infestans*, pod wpływem NO/ONOO<sup>-</sup> tyrozyna hydrolazy SAHH ulegała nitrowaniu, co prawdopodobnie rzutowało na hamowanie ekspresji *SAHH*.

## PODSUMOWANIE

Uzyskane wyniki w ramach zrealizowanej rozprawy doktorskiej udokumentowały nową funkcję sygnałową tlenu azotu, jako pośredniego regulatora metylacji histonów i DNA, zależnego od aktywności reduktazy GSNOR, która kontrolując poinfekcyjny poziom NO w liściach ziemniaka, pośrednio wpływała na wzorzec ekspresji genów obronnych regulowanych epigenetycznie.



**Rycina 23.** Na podstawie uzyskanych wyników stworzono schemat, który przedstawia wpływ dwufazowego generowania NO na geny regulujące (de)metylację DNA, pozostającą w dialogu z metylacją histonów, w odpowiedzi obronnej liści ziemniaka na avr *P. infestans*. Atak patogenu inicjował w liściach silne generowanie NO w 1-3 godzinie, które ze wzrostem odległości od epicentrum wybuchu NO oraz w kolejnych godzinach po inokulacji ulegało

okresowemu obniżeniu. Indukowana przez patogen pierwsza faza nadprodukcji NO (w 3 godzinie po inokulacji) sprzyjała metylacji DNA i wzmożonej ekspresji genów szlaku RdDM (*DCL3*, *AGO4*, *DRM2* i *miR482e*), hamując jednocześnie ekspresję genu *R3a* (posiadającego wysoki poziom represyjnego znacznika H3K9me2 na swoim promotorze). Spadek biodostępności NO (w 6 godzinie po inokulacji), na skutek wzmożonej aktywności reduktazy GSNOR, skutkowało ograniczeniem hamującego działania *miR482e* na odpowiadający mu gen *R3a*, co sprzyjało odporności ziemniaka na avr *P. infestans*.

## 9. SPIS LITERATURY

- Abat, J. K., Deswal, R. (2009). Differential modulation of S-nitrosoproteome of *Brassica juncea* by low temperature: Change in S-nitrosylation of Rubisco is responsible for the inactivation of its carboxylase activity. *PROTEOMICS* 9, 4368–4380. doi: [10.1002/pmic.200800985](https://doi.org/10.1002/pmic.200800985).
- Abramowski, D., Arasimowicz-Jelonek, M., Izbiańska, K., Billert, H., Floryszak-Wieczorek, J. (2015). Nitric oxide modulates redox-mediated defense in potato challenged with *Phytophthora infestans*. *Eur. J. Plant Pathol.* 143, 237–260. doi: [10.1007/s10658-015-0677-9](https://doi.org/10.1007/s10658-015-0677-9).
- Adolf, B., Andrade-Piedra, J., Bittara Molina, F., Przetakiewicz, J., Hausladen, H. i in. (2020). “Fungal, Oomycete, and Plasmodiophorid Diseases of Potato”, w *The Potato Crop: Its Agricultural, Nutritional and Social Contribution to Humankind*, eds. H. Campos i O. Ortiz (Cham: Springer), 307–350. doi: [10.1007/978-3-030-28683-5\\_9](https://doi.org/10.1007/978-3-030-28683-5_9).
- Ageeva-Kieferle, A., Georgii, E., Winkler, B., Ghirardo, A., Albert, A. i in. (2021). Nitric oxide coordinates growth, development, and stress response *via* histone modification and gene expression. *Plant Physiol.* 187, 336–360. doi: [10.1093/plphys/kiab222](https://doi.org/10.1093/plphys/kiab222).
- Ageeva-Kieferle, A., Rudolf, E. E., Lindermayr, C. (2019). Redox-Dependent Chromatin Remodeling: a New Function of Nitric Oxide as Architect of Chromatin Structure in Plants. *Front. Plant Sci.* 10, 625. doi: [10.3389/fpls.2019.00625](https://doi.org/10.3389/fpls.2019.00625).
- Agorio, A., Vera, P. (2007). ARGONAUTE4 Is Required for Resistance to *Pseudomonas syringae* in *Arabidopsis*. *Plant Cell* 19, 3778–3790. doi: [10.1105/tpc.107.054494](https://doi.org/10.1105/tpc.107.054494).
- Alvarez, M. E., Nota, F., Cambiagno, D. A. (2010). Epigenetic control of plant immunity. *Mol. Plant Pathol.* 11, 563–576. doi: [10.1111/j.1364-3703.2010.00621.x](https://doi.org/10.1111/j.1364-3703.2010.00621.x).
- Arasimowicz-Jelonek, M., Floryszak-Wieczorek, J. (2011). Understanding the fate of peroxynitrite in plant cells – From physiology to pathophysiology. *Phytochemistry* 72, 681–688. doi: [10.1016/j.phytochem.2011.02.025](https://doi.org/10.1016/j.phytochem.2011.02.025).
- Arasimowicz-Jelonek, M., Floryszak-Wieczorek, J. (2014). Nitric oxide: an effective weapon of the plant or the pathogen? *Mol. Plant Pathol.* 15, 406–416. doi: [10.1111/mpp.12095](https://doi.org/10.1111/mpp.12095).
- Arasimowicz-Jelonek, M., Floryszak-Wieczorek, J. (2019). A physiological perspective on targets of nitration in NO-based signaling networks in plants. *J. Exp. Bot.* 70, 4379–4389. doi: [10.1093/jxb/erz300](https://doi.org/10.1093/jxb/erz300).
- Arasimowicz-Jelonek, M., Floryszak-Wieczorek, J., Gzyl, J., Chmielowska-Bąk, J. (2013).

- Homocysteine over-accumulation as the effect of potato leaves exposure to biotic stress. *Plant Physiol. Biochem.* 63, 177–184. doi: [10.1016/j.plaphy.2012.11.025](https://doi.org/10.1016/j.plaphy.2012.11.025).
- Arasimowicz-Jelonek, M., Floryszak-Wieczorek, J., Izbiańska, K., Gzyl, J., Jelonek, T. (2016). Implication of peroxyxynitrite in defence responses of potato to *Phytophthora infestans*. *Plant Pathol.* 65, 754–766. doi: [10.1111/ppa.12471](https://doi.org/10.1111/ppa.12471).
- Arnold, P. A., Kruuk, L. E. B., Nicotra, A. B. (2019). How to analyse plant phenotypic plasticity in response to a changing climate. *New Phytol.* 222, 1235–1241. doi: [10.1111/nph.15656](https://doi.org/10.1111/nph.15656).
- Asai, S., Ohta, K., Yoshioka, H. (2008). MAPK Signaling Regulates Nitric Oxide and NADPH Oxidase-Dependent Oxidative Bursts in *Nicotiana benthamiana*. *Plant Cell* 20, 1390–1406. doi: [10.1105/tpc.107.055855](https://doi.org/10.1105/tpc.107.055855).
- Avramova, Z. (2015). Transcriptional ‘memory’ of a stress: transient chromatin and memory (epigenetic) marks at stress-response genes. *Plant J.* 83, 149–159. doi: [10.1111/tbj.12832](https://doi.org/10.1111/tbj.12832).
- Baker, B. P., Green, T. A., Loker, A. J. (2020). Biological Control and Integrated Pest Management in Organic and Conventional Systems. *Biol. Control* 140, 104095. doi: [10.1016/j.biocontrol.2019.104095](https://doi.org/10.1016/j.biocontrol.2019.104095).
- Bakhtiari, M., Formenti, L., Caggia, V., Glauser, G., Rasmann, S. (2019). Variable effects on growth and defense traits for plant ecotypic differentiation and phenotypic plasticity along elevation gradients. *Ecol. Evol.* 9, 3740–3755. doi: [10.1002/ece3.4999](https://doi.org/10.1002/ece3.4999).
- Balint-Kurti, P. (2019). The plant hypersensitive response: concepts, control and consequences. *Mol. Plant Pathol.* 20, 1163–1178. doi: [10.1111/mpp.12821](https://doi.org/10.1111/mpp.12821).
- Bassil, K. L., Vakil, C., Sanborn, M., Cole, D. C., Kaur, J. S. i in. (2007). Cancer Health Effects of Pesticides: Systematic Review. *Can. Fam. Physician* 53, 1704–1711.
- Beckman, J. S., Beckman, T. W., Chen, J., Marshall, P. A., Freeman, B. A. (1990). Apparent hydroxyl radical production by peroxyxynitrite: implications for endothelial injury from nitric oxide and superoxide. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 87, 1620–1624. doi: [10.1073/pnas.87.4.1620](https://doi.org/10.1073/pnas.87.4.1620).
- Bedford, M. T., Richard, S. (2005). Arginine Methylation: An Emerging Regulator of Protein Function. *Mol. Cell* 18, 263–272. doi: [10.1016/j.molcel.2005.04.003](https://doi.org/10.1016/j.molcel.2005.04.003).
- Begara-Morales, J. C., Chaki, M., Sánchez-Calvo, B., Mata-Pérez, C., Leterrier, M. i in. (2013). Protein tyrosine nitration in pea roots during development and senescence. *J. Exp. Bot.* 64, 1121–1134. doi: [10.1093/jxb/ert006](https://doi.org/10.1093/jxb/ert006).

- Borrowman, S., Kapuganti, J. G., Loake, G. J. (2023). Expanding roles for S-nitrosylation in the regulation of plant immunity. *Free Radic. Biol. Med.* 194, 357–368. doi: [10.1016/j.freeradbiomed.2022.12.009](https://doi.org/10.1016/j.freeradbiomed.2022.12.009).
- Bovee, R., Pham, V., Fernandez, J., Tretyakova, N., Thomas, D. D. (2018). P-228 - Nitric oxide is an epigenetic regulator of gene expression by directly controlling DNA methylation patterns. *Free Radic. Biol. Med.* 120, S114. doi: [10.1016/j.freeradbiomed.2018.04.375](https://doi.org/10.1016/j.freeradbiomed.2018.04.375).
- Brylińska, M., Śliwka, J. (2014). Efektory – Kluczowe Białka w Interakcji Ziemniak – *Phytophthora infestans*. *Biul. Inst. Hod. Aklim. Rośl.*, 109–118. doi: [10.37317/biul-2014-0045](https://doi.org/10.37317/biul-2014-0045).
- Chacón-Cerdas, R., Barboza-Barquero, L., Albertazzi, F. J., Rivera-Méndez, W. (2020). Transcription Factors Controlling Biotic Stress Response in Potato Plants. *Physiol. Mol. Plant Pathol.* 112, 101527. doi: [10.1016/j.pmpp.2020.101527](https://doi.org/10.1016/j.pmpp.2020.101527).
- Chaki, M., Shekariesfahlan, A., Ageeva, A., Mengel, A., von Toerne, C. i in. (2015). Identification of nuclear target proteins for S-nitrosylation in pathogen-treated *Arabidopsis thaliana* cell cultures. *Plant Sci.* 238, 115–126. doi: [10.1016/j.plantsci.2015.06.011](https://doi.org/10.1016/j.plantsci.2015.06.011).
- Chaki, M., Valderrama, R., Fernández-Ocaña, A. M., Carreras, A., López-Jaramillo, J. i in. (2009). Protein Targets of Tyrosine Nitration in Sunflower (*Helianthus annuus* L.) Hypocotyls. *J. Exp. Bot.* 60, 4221–4234. doi: [10.1093/jxb/erp263](https://doi.org/10.1093/jxb/erp263).
- Champouret, N. (2010). Functional Genomics of *Phytophthora infestans* Effectors and *Solanum* Resistance Genes. Praca doktorska, Wageningen University, Wageningen.
- Cheng, Z., Cheung, P., Kuo, A. J., Yukl, E. T., Wilmot, C. M. i in. (2014). A molecular threading mechanism underlies Jumonji lysine demethylase KDM2A regulation of methylated H3K36. *Genes Dev.* 28, 1758–1771. doi: [10.1101/gad.246561.114](https://doi.org/10.1101/gad.246561.114).
- Chiang, P. K., Gordon, R. K., Tal, J., Zeng, G. C., Doctor, B. P. i in. (1996). S-Adenosylmethionine and methylation. *FASEB J.* 10, 471–480.
- Corpas, F., Palma, J., del Río, L., Barroso, J. (2013). Protein tyrosine nitration in higher plants grown under natural and stress conditions. *Front. Plant Sci.* 4, 29. doi: [10.3389/fpls.2013.00029](https://doi.org/10.3389/fpls.2013.00029).
- Cui, H., Tsuda, K., Parker, J. E. (2015). Effector-Triggered Immunity: From Pathogen Perception to Robust Defense. *Annu. Rev. Plant Biol.* 66, 487–511. doi: [10.1146/annurev-arplant-050213-040012](https://doi.org/10.1146/annurev-arplant-050213-040012).
- Del Castello, F., Nejamkin, A., Cassia, R., Correa-Aragunde, N., Fernández, B. i in. (2019).

- The Era of Nitric Oxide in Plant Biology: Twenty Years Tying Up Loose Ends. *Nitric Oxide* 85, 17–27. doi: [10.1016/j.niox.2019.01.013](https://doi.org/10.1016/j.niox.2019.01.013).
- Delledonne, M., Xia, Y., Dixon, R. A., Lamb, C. (1998). Nitric Oxide Functions as a Signal in Plant Disease Resistance. *Nature* 394, 585–588. doi: [10.1038/29087](https://doi.org/10.1038/29087).
- Deng, X., Gu, L., Liu, C., Lu, T., Lu, F. i in. (2010). Arginine Methylation Mediated by the *Arabidopsis* Homolog of PRMT5 is Essential for Proper pre-mRNA Splicing. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 107, 19114–19119. doi: [10.1073/pnas.1009669107](https://doi.org/10.1073/pnas.1009669107).
- Devaux, A., Goffart, J.-P., Kromann, P., Andrade-Piedra, J., Polar, V. i in. (2021). The Potato of the Future: Opportunities and Challenges in Sustainable Agri-Food Systems. *Potato Res.* 64, 681–720. doi: [10.1007/s11540-021-09501-4](https://doi.org/10.1007/s11540-021-09501-4).
- Devaux, A., Kromann, P., Ortiz, O. (2014). Potatoes for Sustainable Global Food Security. *Potato Res.* 57, 185–199. doi: [10.1007/s11540-014-9265-1](https://doi.org/10.1007/s11540-014-9265-1).
- Dong, X. (2004). NPR1, all things considered. *Curr. Opin. Plant Biol.* 7, 547–552. doi: [10.1016/j.pbi.2004.07.005](https://doi.org/10.1016/j.pbi.2004.07.005).
- Downen, R. H., Pelizzola, M., Schmitz, R. J., Lister, R., Downen, J. M. i in. (2012). Widespread Dynamic DNA Methylation in Response to Biotic Stress. *Proc. Natl. Acad. Sci.* 109, E2183–E2191. doi: [10.1073/pnas.1209329109](https://doi.org/10.1073/pnas.1209329109).
- Drozda, A., Kurpisz, B., Arasimowicz-Jelonek, M., Kuźnicki, D., Jagodzki, P. i in. (2022a). Nitric Oxide Implication in Potato Immunity to *Phytophthora infestans* via Modifications of Histone H3/H4 Methylation Patterns on Defense Genes. *Int. J. Mol. Sci.* 23, 4051. doi: [10.3390/ijms23074051](https://doi.org/10.3390/ijms23074051).
- Drozda, A., Kurpisz, B., Guan, Y., Arasimowicz-Jelonek, M., Plich, J. i in. (2022b). Insights Into the Expression of DNA (De)Methylation Genes Responsive to Nitric Oxide Signaling in Potato Resistance to Late Blight Disease. *Front. Plant Sci.* 13, 1033699. doi: [10.3389/fpls.2022.1033699](https://doi.org/10.3389/fpls.2022.1033699).
- Du, J., Johnson, L. M., Jacobsen, S. E., Patel, D. J. (2015). DNA methylation pathways and their crosstalk with histone methylation. *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* 16, 519–532. doi: [10.1038/nrm4043](https://doi.org/10.1038/nrm4043).
- Falak, N., Imran, Q. M., Hussain, A., Yun, B.-W. (2021). Transcription Factors as the “Blitzkrieg” of Plant Defense: A Pragmatic View of Nitric Oxide’s Role in Gene Regulation. *Int. J. Mol. Sci.* 22, 522. doi: [10.3390/ijms22020522](https://doi.org/10.3390/ijms22020522).
- Fan, H., Li, T., Guan, L., Li, Z., Guo, N. i in. (2012). Effects of exogenous nitric oxide on antioxidation and DNA methylation of *Dendrobium huoshanense* grown under drought stress. *Plant Cell Tiss. Organ Cult.* 109, 307–314. doi: [10.1007/s11240-011-](https://doi.org/10.1007/s11240-011-)

[0096-3](#).

- Fan, H., Zhang, Z., Wang, N., Cui, Y., Sun, H. i in. (2014). SKB1/PRMT5-Mediated Histone H4R3 Dimethylation of Ib Subgroup bHLH Genes Negatively Regulates Iron Homeostasis in *Arabidopsis thaliana*. *Plant J.* 77, 209–221. doi: [10.1111/tpj.12380](#).
- Feechan, A., Kwon, E., Yun, B.-W., Wang, Y., Pallas, J. A. i in. (2005). A central role for S-nitrosothiols in plant disease resistance. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 102, 8054–8059. doi: [10.1073/pnas.0501456102](#).
- Fei, Q., Zhang, Y., Xia, R., Meyers, B. C. (2016). Small RNAs Add Zing to the Zig-Zag-Zig Model of Plant Defenses. *MPMI* 29, 165–169. doi: [10.1094/MPMI-09-15-0212-FI](#).
- Feng, J., Chen, L., Zuo, J. (2019). Protein S-Nitrosylation in plants: Current progresses and challenges. *J. Integr. Plant Biol.* 61, 1206–1223. doi: [10.1111/jipb.12780](#).
- Floryszak-Wieczorek, J., Arasimowicz, M., Milczarek, G., Jelen, H., Jackowiak, H. (2007). Only an Early Nitric Oxide Burst and the Following Wave of Secondary Nitric Oxide Generation Enhanced Effective Defence Responses of *Pelargonium* to a Necrotrophic Pathogen. *New Phytol.* 175, 718–730. doi: [10.1111/j.1469-8137.2007.02142.x](#).
- Floryszak-Wieczorek, J., Arasimowicz-Jelonek, M., Izbiańska, K. (2016). The combined nitrate reductase and nitrite-dependent route of NO synthesis in potato immunity to *Phytophthora infestans*. *Plant Physiol. Biochem.* 108, 468–477. doi: [10.1016/j.plaphy.2016.08.009](#).
- Floryszak-Wieczorek, J., Arasimowicz-Jelonek, M., Milczarek, G., Janus, L., Pawlak-Sprada, S. i in. (2012). Nitric Oxide-Mediated Stress Imprint in Potato as an Effect of Exposure to a Priming Agent. *MPMI* 25, 1469–1477. doi: [10.1094/MPMI-02-12-0044-R](#).
- Foissner, I., Wendehenne, D., Langebartels, C., Durner, J. (2000). *In Vivo* Imaging of an Elicitor-Induced Nitric Oxide Burst in Tobacco. *Plant J.* 23, 817–824. doi: [10.1046/j.1365-313x.2000.00835.x](#).
- Forbes, G. A. (2012). Using Host Resistance to Manage Potato Late Blight with Particular Reference to Developing Countries. *Potato Res.* 55, 205–216. doi: [10.1007/s11540-012-9222-9](#).
- Fu, Y., Ma, H., Chen, S., Gu, T., Gong, J. (2018). Control of Proline Accumulation Under Drought *via* a Novel Pathway Comprising the Histone Methylase CAU1 and the Transcription Factor ANAC055. *J. Exp. Bot.* 69, 579–588. doi: [10.1093/jxb/erx419](#).

- Fu, Z. Q., Dong, X. (2013). Systemic acquired resistance: turning local infection into global defense. *Annu. Rev. Plant Biol.* 64, 839–863. doi: [10.1146/annurev-arplant-042811-105606](https://doi.org/10.1146/annurev-arplant-042811-105606).
- Fuso, A., Raia, T., Orticello, M., Lucarelli, M. (2020). The Complex Interplay Between DNA Methylation and miRNAs in Gene Expression Regulation. *Biochimie* 173, 12–16. doi: [10.1016/j.biochi.2020.02.006](https://doi.org/10.1016/j.biochi.2020.02.006).
- Gouil, Q., Baulcombe, D. C. (2016). DNA Methylation Signatures of the Plant Chromomethyltransferases. *PLOS Genet.* 12, e1006526. doi: [10.1371/journal.pgen.1006526](https://doi.org/10.1371/journal.pgen.1006526).
- Hashemi, M., Tabet, D., Sandroni, M., Benavent-Celma, C., Seematti, J. i in. (2022). The Hunt for Sustainable Biocontrol of *Oomycete* Plant Pathogens, a Case Study of *Phytophthora infestans*. *Fungal Biol. Rev.* 40, 53–69. doi: <https://doi.org/10.1016/j.fbr.2021.11.003>.
- Hernando, C. E., Sanchez, S. E., Mancini, E., Yanovsky, M. J. (2015). Genome wide comparative analysis of the effects of PRMT5 and PRMT4/CARM1 arginine methyltransferases on the *Arabidopsis thaliana* transcriptome. *BMC Genomics* 16, 192. doi: [10.1186/s12864-015-1399-2](https://doi.org/10.1186/s12864-015-1399-2).
- Hickok, J. R., Vasudevan, D., Antholine, W. E., Thomas, D. D. (2013). Nitric Oxide Modifies Global Histone Methylation by Inhibiting Jumonji C Domain-containing Demethylases \*. *J. Biol. Chem.* 288, 16004–16015. doi: [10.1074/jbc.M112.432294](https://doi.org/10.1074/jbc.M112.432294).
- Hillocks, R. J. (2012). Farming with Fewer Pesticides: EU Pesticide Review and Resulting Challenges for UK Agriculture. *Crop Prot.* 31, 85–93. doi: [10.1016/j.cropro.2011.08.008](https://doi.org/10.1016/j.cropro.2011.08.008).
- Hu, J., Huang, X., Chen, L., Sun, X., Lu, C. i in. (2015). Site-Specific Nitrosoproteomic Identification of Endogenously S-Nitrosylated Proteins in *Arabidopsis*. *Plant Physiol.* 167, 1731–1746. doi: [10.1104/pp.15.00026](https://doi.org/10.1104/pp.15.00026).
- Hu, J., Yang, H., Mu, J., Lu, T., Peng, J. i in. (2017). Nitric Oxide Regulates Protein Methylation during Stress Responses in Plants. *Mol. Cell* 67, 702–710.e4. doi: [10.1016/j.molcel.2017.06.031](https://doi.org/10.1016/j.molcel.2017.06.031).
- Huang, C.-Y., Jin, H. (2021). Coordinated Epigenetic Regulation in Plants: a Potent Managerial Tool to Conquer Biotic Stress. *Front. Plant. Sci.* 12, 795274. doi: [10.3389/fpls.2021.795274](https://doi.org/10.3389/fpls.2021.795274).
- Huang, C.-Y., Wang, H., Hu, P., Hamby, R., Jin, H. (2019). Small RNAs - Big Players in Plant-Microbe Interactions. *Cell Host Microbe* 26, 173–182. doi:



[10.1016/j.chom.2019.07.021](https://doi.org/10.1016/j.chom.2019.07.021).

- Izbiańska, K., Floryszak-Wieczorek, J., Gajewska, J., Meller, B., Kuźnicki, D. i in. (2018). RNA and mRNA Nitration as a Novel Metabolic Link in Potato Immune Response to *Phytophthora infestans*. *Front. Plant Sci.* 9, 672. doi: [10.3389/fpls.2018.00672](https://doi.org/10.3389/fpls.2018.00672).
- Janus, Ł., Milczarek, G., Arasimowicz-Jelonek, M., Abramowski, D., Billert, H. i in. (2013). Normoergic NO-dependent changes, triggered by a SAR inducer in potato, create more potent defense responses to *Phytophthora infestans*. *Plant Sci.* 211, 23–34. doi: [10.1016/j.plantsci.2013.06.007](https://doi.org/10.1016/j.plantsci.2013.06.007).
- Jaskiewicz, M., Peterhansel, C., Conrath, U. (2011). Detection of Histone Modifications in Plant Leaves. *J. Vis. Exp.*, 3096. doi: [10.3791/3096](https://doi.org/10.3791/3096).
- Jedelská, T., Luhová, L., Petřivalský, M. (2021). Nitric oxide signalling in plant interactions with pathogenic fungi and oomycetes. *J. Exp. Bot.* 72, 848–863. doi: [10.1093/jxb/eraa596](https://doi.org/10.1093/jxb/eraa596).
- Jones, J. D. G., Dangl, J. L. (2006). The Plant Immune System. *Nature* 444, 323–329. doi: [10.1038/nature05286](https://doi.org/10.1038/nature05286).
- Jones, J. D. G., Vance, R. E., Dangl, J. L. (2016). Intracellular innate immune surveillance devices in plants and animals. *Sci.* 354, aaf6395. doi: [10.1126/science.aaf6395](https://doi.org/10.1126/science.aaf6395).
- Junaid, J. M., Dar, N. A., Bhat, T. A., Bhat, A. H., Bhat, M. A. (2013). Commercial Biocontrol Agents and Their Mechanism of Action in the Management of Plant Pathogens. *Int. J. Mod. Plant Anim. Sci.* 1, 39–57.
- Kim, J.-H. (2021). Multifaceted Chromatin Structure and Transcription Changes in Plant Stress Response. *Int. J. Mol. Sci.* 22, 2013. doi: [10.3390/ijms22042013](https://doi.org/10.3390/ijms22042013).
- Kolbert, Z., Barroso, J. B., Brouquisse, R., Corpas, F. J., Gupta, K. J. i in. (2019). A Forty Year Journey: The Generation and Roles of NO in Plants. *Nitric Oxide* 93, 53–70. doi: [10.1016/j.niox.2019.09.006](https://doi.org/10.1016/j.niox.2019.09.006).
- Korbutowicz, T. (2020). Organizmy Transgeniczne w Unii Europejskiej. *PAd 102060 II*. <https://repozytorium.uni.wroc.pl/dlibra/publication/121394/edition/110406> [Dostęp: 12.09.2023 r.].
- Kovacs, I., Wirtz, M., Lindermayr, C. (2013). Function of S-nitrosoglutathione in NPR1-dependent defence response. *J. Biotechnol. Comput. Biol. Bionanotechnol.* 94, 2.
- Kuźnicki, D., Meller, B., Arasimowicz-Jelonek, M., Braszewska-Zalewska, A., Drozda, A. i in. (2019). BABA-Induced DNA Methylome Adjustment to Intergenerational Defense Priming in Potato to *Phytophthora infestans*. *Front. Plant Sci.* 10, 650. doi: [10.3389/fpls.2019.00650](https://doi.org/10.3389/fpls.2019.00650).

- Lafos, M., Kröll, P., Hohenstatt, M. L., Thorpe, F. L., Clarenz, O. i in. (2011). Dynamic Regulation of H3K27 Trimethylation during *Arabidopsis* Differentiation. *PLOS Genet.* 7, e1002040. doi: [10.1371/journal.pgen.1002040](https://doi.org/10.1371/journal.pgen.1002040).
- Leterrier, M., Chaki, M., Airaki, M., Valderrama, R., Palma, J. M. i in. (2011). Function of S-nitrosogluthathione reductase (GSNOR) in plant development and under biotic/abiotic stress. *Plant Signal. Behav.* 6, 789–793. doi: [10.4161/psb.6.6.15161](https://doi.org/10.4161/psb.6.6.15161).
- Li, Q., Zhao, Y., Yue, M., Xue, Y., Bao, S. (2016). The Protein Arginine Methylase 5 (PRMT5/SKB1) Gene Is Required for the Maintenance of Root Stem Cells in Response to DNA Damage. *J. Genet. Genomics* 43, 187–197. doi: [10.1016/j.jgg.2016.02.007](https://doi.org/10.1016/j.jgg.2016.02.007).
- Li, S., Liu, L., Li, S., Gao, L., Zhao, Y. i in. (2016). SUVH1, a Su(var)3–9 family member, promotes the expression of genes targeted by DNA methylation. *Nucleic Acids Res.* 44, 608–620. doi: [10.1093/nar/gkv958](https://doi.org/10.1093/nar/gkv958).
- Lindermayr, C., Saalbach, G., Durner, J. (2005). Proteomic Identification of S-Nitrosylated Proteins in *Arabidopsis*. *Plant Physiol.* 137, 921–930. doi: [10.1104/pp.104.058719](https://doi.org/10.1104/pp.104.058719).
- Liu, N., Fromm, M., Avramova, Z. (2014). H3K27me3 and H3K4me3 chromatin environment at super-induced dehydration stress memory genes of *Arabidopsis thaliana*. *Mol. Plant* 7, 502–513. doi: [10.1093/mp/ssu001](https://doi.org/10.1093/mp/ssu001).
- López, A., Ramírez, V., García-Andrade, J., Flors, V., Vera, P. (2011). The RNA Silencing Enzyme RNA Polymerase V Is Required for Plant Immunity. *PLOS Genet.* 7, e1002434. doi: [10.1371/journal.pgen.1002434](https://doi.org/10.1371/journal.pgen.1002434).
- Lozano, R., Hamblin, M. T., Prochnik, S., Jannink, J. L. (2015). Identification and Distribution of the NBS-LRR Gene Family in the *Cassava* genome. *BMC Genom* 16:360. <https://doi.org/10.1186/s12864-015-1554-9>.
- Lozano-Juste, J., Colom-Moreno, R., León, J. (2011). *In vivo* protein tyrosine nitration in *Arabidopsis thaliana*. *J. Exp. Bot.* 62, 3501–3517. doi: [10.1093/jxb/err042](https://doi.org/10.1093/jxb/err042).
- Malamy, J., Carr, J. P., Klessig, D. F., Raskin, I. (1990). Salicylic Acid: a likely endogenous signal in the resistance response of tobacco to viral infection. *Sci.* 250, 1002–1004. doi: [10.1126/science.250.4983.1002](https://doi.org/10.1126/science.250.4983.1002).
- Mata-Pérez, C., Begara-Morales, J. C., Chaki, M., Sánchez-Calvo, B., Valderrama, R. i in. (2016). Protein Tyrosine Nitration during Development and Abiotic Stress Response in Plants. *Front. Plant Sci.* 7, 1699. doi: [10.3389/fpls.2016.01699](https://doi.org/10.3389/fpls.2016.01699).
- Matzke, M. A., Mosher, R. A. (2014). RNA-directed DNA methylation: an epigenetic pathway of increasing complexity. *Nat. Rev. Genet.* 15, 394–408. doi:

[10.1038/nrg3683](https://doi.org/10.1038/nrg3683).

- Meller, B., Kuźnicki, D., Arasimowicz-Jelonek, M., Deckert, J., Floryszak-Wieczorek, J. (2018). BABA-Primed Histone Modifications in Potato for Intergenerational Resistance to *Phytophthora infestans*. *Front. Plant Sci.* 9, 1228. doi: [10.3389/fpls.2018.01228](https://doi.org/10.3389/fpls.2018.01228).
- Mengel, A., Ageeva, A., Georgii, E., Bernhardt, J., Wu, K. i in. (2017). Nitric Oxide Modulates Histone Acetylation at Stress Genes by Inhibition of Histone Deacetylases. *Plant Physiol.* 173, 1434–1452. doi: [10.1104/pp.16.01734](https://doi.org/10.1104/pp.16.01734).
- Métraux, J. P., Signer, H., Ryals, J., Ward, E., Wyss-Benz, M. i in. (1990). Increase in salicylic Acid at the onset of systemic acquired resistance in cucumber. *Sci.* 250, 1004–1006. doi: [10.1126/science.250.4983.1004](https://doi.org/10.1126/science.250.4983.1004).
- Molnar, A., Melnyk, C. W., Bassett, A., Hardcastle, T. J. i in. (2010). Small Silencing RNAs in Plants Are Mobile and Direct Epigenetic Modification in Recipient Cells. *Science* 328, 872–875. doi: [10.1126/science.1187959](https://doi.org/10.1126/science.1187959).
- Monteiro, H. P., Arai, R. J., Travassos, L. R. (2008). Protein tyrosine phosphorylation and protein tyrosine nitration in redox signaling. *Antioxid. Redox Signal.* 10, 843–889. doi: [10.1089/ars.2007.1853](https://doi.org/10.1089/ars.2007.1853).
- Mur, L. A. J., Carver, T. L. W., Prats, E. (2006). NO Way to Live; The Various Roles of Nitric Oxide in Plant–Pathogen Interactions. *J. Exp. Bot.* 57, 489–505. doi: [10.1093/jxb/erj052](https://doi.org/10.1093/jxb/erj052).
- Murashige, T., Skoog, F. (1962). A Revised Medium for Rapid Growth and Bio Assays with Tobacco Tissue Cultures. *Physiol. Plant.* 15, 473–497. doi: [10.1111/j.1399-3054.1962.tb08052.x](https://doi.org/10.1111/j.1399-3054.1962.tb08052.x).
- Naveed, Z. A., Wei, X., Chen, J., Mubeen, H., Ali, G. S. (2020). The PTI to ETI Continuum in *Phytophthora*-Plant Interactions. *Front. Plant Sci.* 11, 2030. doi: [10.3389/fpls.2020.593905](https://doi.org/10.3389/fpls.2020.593905).
- Nozawa, K., Chen, J., Jiang, J., Leichter, S. M., Yamada, M. i in. (2021). DNA methyltransferase CHROMOMETHYLASE3 prevents ONSEN transposon silencing under heat stress. *PLOS Genet.* 17, e1009710. doi: [10.1371/journal.pgen.1009710](https://doi.org/10.1371/journal.pgen.1009710).
- Oowski, J., Gawinska-Urbanowicz, H., Lozowska, A. (2016). Plamistości Liści Ziemniaka Spowodowane przez Czynniki Biotyczne. *Ziemniak Polski* 26. Dostęp w: <http://agro.icm.edu.pl/agro/element/bwmeta1.element.agro-835ff64a-6877-497c-a1d4-41cec5960dfa> [Dostęp 16.07.2022].
- Ou, X., Zhuang, T., Yin, W., Miao, Y., Wang, B. i in. (2015). DNA Methylation Changes

- Induced in Rice by Exposure to High Concentrations of the Nitric Oxide Modulator, Sodium Nitroprusside. *Plant Mol. Biol. Rep.* 33, 1428–1440. doi: [10.1007/s11105-014-0843-9](https://doi.org/10.1007/s11105-014-0843-9).
- Ouyang, S., Park, G., Atamian, H. S., Han, C. S., Stajich, J. E. i in. (2014). MicroRNAs Suppress NB Domain Genes in Tomato That Confer Resistance to *Fusarium oxysporum*. *PLOS Pathog.* 10, e1004464. doi: [10.1371/journal.ppat.1004464](https://doi.org/10.1371/journal.ppat.1004464).
- Palczewski, M. B., Petraitis, H., Thomas, D. D. (2019). Nitric oxide is an epigenetic regulator of histone post-translational modifications in cancer. *Curr. Opin. Physiol.* 9, 94–99. doi: [10.1016/j.cophys.2019.05.006](https://doi.org/10.1016/j.cophys.2019.05.006).
- Palmer, J. L., Abeles, R. H. (1979). The mechanism of action of S-adenosylhomocysteinase. *J. Biol. Chem.* 254, 1217–1226. doi: [10.1016/S0021-9258\(17\)34190-X](https://doi.org/10.1016/S0021-9258(17)34190-X).
- Paluchowska, P., Śliwka, J., Yin, Z. (2022). Late Blight Resistance Genes in Potato Breeding. *Planta* 255, 127. doi: [10.1007/s00425-022-03910-6](https://doi.org/10.1007/s00425-022-03910-6).
- Pecinka, A., Mittelsten Scheid, O. (2012). Stress-Induced Chromatin Changes: a Critical View on Their Heritability. *Plant Cell Physiol*, 53, 801–808. doi: [10.1093/pcp/pcs044](https://doi.org/10.1093/pcp/pcs044).
- Pei, Y., Niu, L., Lu, F., Liu, C., Zhai, J. i in. (2007). Mutations in the Type II Protein Arginine Methyltransferase AtPRMT5 Result in Pleiotropic Developmental Defects in *Arabidopsis*. *Plant Physiol.* 144, 1913–1923. doi: [10.1104/pp.107.099531](https://doi.org/10.1104/pp.107.099531).
- Pikaard, C. S., Scheid, O. M. (2014). Epigenetic Regulation in Plants. *Cold Spring Harb. Perspect. Biol.* 6, a019315. doi: [10.1101/cshperspect.a019315](https://doi.org/10.1101/cshperspect.a019315).
- Pontier, D., Balagué, C., Bezombes-Marion, I., Tronchet, M., Deslandes, L., Roby, D. (2001). Identification of a novel pathogen-responsive element in the promoter of the tobacco gene HSR203J, a molecular marker of the hypersensitive response. *Plant J.* 26, 495–507. doi: [10.1046/j.1365-313x.2001.01049.x](https://doi.org/10.1046/j.1365-313x.2001.01049.x).
- Pontier, D., Tronchet, M., Rogowsky, P., Lam, E., Roby, D. (1998). Activation of hsr203, a plant gene expressed during incompatible plant-pathogen interactions, is correlated with programmed cell death. *Mol. Plant Microbe Interact.* 11, 544–554. doi: [10.1094/MPMI.1998.11.6.544](https://doi.org/10.1094/MPMI.1998.11.6.544).
- Popp, J., Pető, K., Nagy, J. (2013). Pesticide Productivity and Food Security. A review. *Agron. Sustain. Dev.* 33, 243–255. doi: [10.1007/s13593-012-0105-x](https://doi.org/10.1007/s13593-012-0105-x).
- Pu, L., Sung, Z. R. (2015). PcG and trxG in plants – friends or foes. *Trends Genet.* 31, 252–262. doi: [10.1016/j.tig.2015.03.004](https://doi.org/10.1016/j.tig.2015.03.004).
- Puyaubert, J., Fares, A., Rézé, N., Peltier, J.-B., Baudouin, E. (2014). Identification of

- endogenously S-nitrosylated proteins in *Arabidopsis* plantlets: Effect of cold stress on cysteine nitrosylation level. *Plant Sci.* 215–216, 150–156. doi: [10.1016/j.plantsci.2013.10.014](https://doi.org/10.1016/j.plantsci.2013.10.014).
- Raffaele, S., Farrer, R. A., Cano, L. M., Studholme, D. J., MacLean, D. i in. (2010). Genome Evolution Following Host Jumps in the Irish Potato Famine Pathogen Lineage. *Sci.* 330, 1540–1543. doi: [10.1126/science.1193070](https://doi.org/10.1126/science.1193070).
- Rahikainen, M., Alegre, S., Trotta, A., Pascual, J., Kangasjärvi, S. (2018). Trans-methylation reactions in plants: focus on the activated methyl cycle. *Physiol. Plant.* 162, 162–176. doi: [10.1111/ppl.12619](https://doi.org/10.1111/ppl.12619).
- Rodewald, J., Trognitz, B. (2013). *Solanum* Resistance Genes Against *Phytophthora infestans* and Their Corresponding Avirulence Genes. *Mol. Plant Pathol.* 14, 740–757. doi: [10.1111/mpp.12036](https://doi.org/10.1111/mpp.12036).
- Romero-Puertas, M. C., Laxa, M., Mattè, A., Zaninotto, F., Finkemeier, I. i in. (2007). S-Nitrosylation of Peroxiredoxin II E Promotes Peroxynitrite-Mediated Tyrosine Nitration. *Plant Cell* 19, 4120–4130. doi: [10.1105/tpc.107.055061](https://doi.org/10.1105/tpc.107.055061).
- Rudolf, E. E., Hüther, P., Forné, I., Georgii, E., Han, Y. i in. (2021). GSNOR Contributes to Demethylation and Expression of Transposable Elements and Stress-Responsive Genes. *Antioxidants* 10, 1128. doi: [10.3390/antiox10071128](https://doi.org/10.3390/antiox10071128).
- Sánchez-Vicente, I., Fernández-Espinosa, M. G., Lorenzo, O. (2019). Nitric Oxide Molecular Targets: Reprogramming Plant Development Upon Stress. *J. Exp. Bot.* 70, 4441–4460. doi: [10.1093/jxb/erz339](https://doi.org/10.1093/jxb/erz339).
- Sani, E., Herzyk, P., Perrella, G., Colot, V., Amtmann, A. (2013). Hyperosmotic priming of *Arabidopsis* seedlings establishes a long-term somatic memory accompanied by specific changes of the epigenome. *Genome Biol.* 14, R59. doi: [10.1186/gb-2013-14-6-r59](https://doi.org/10.1186/gb-2013-14-6-r59).
- Santos, A. P., Ferreira, L. J., Oliveira, M. M. (2017). Concerted Flexibility of Chromatin Structure, Methylome, and Histone Modifications along with Plant Stress Responses. *Biology* 6, 3. doi: [10.3390/biology6010003](https://doi.org/10.3390/biology6010003).
- Saravana Kumar, R. M., K., Wang, Y., Zhang, X., Cheng, H., Sun, L. i in. (2020). Redox Components: Key Regulators of Epigenetic Modifications in Plants. *Int. J. Mol. Sci.* 21, 1419. doi: [10.3390/ijms21041419](https://doi.org/10.3390/ijms21041419).
- Saze, H., Tsugane, K., Kanno, T., Nishimura, T. (2012). DNA Methylation in Plants: Relationship to Small RNAs and Histone Modifications, and Functions in Transposon Inactivation. *Plant Cell Physiol.* 53, 766–784. doi: [10.1093/pcp/pcs008](https://doi.org/10.1093/pcp/pcs008).

- Scheler, C., Durner, J., Astier, J. (2013). Nitric Oxide and Reactive Oxygen Species in Plant Biotic Interactions. *Curr. Opin. Plant Biol.* 16, 534–539. doi: [10.1016/j.pbi.2013.06.020](https://doi.org/10.1016/j.pbi.2013.06.020).
- Schmitz, R. J., Sung, S., Amasino, R. M. (2008). Histone Arginine Methylation Is Required for Vernalization-Induced Epigenetic Silencing of FLC in Winter-Annual *Arabidopsis thaliana*. *Proc. Natl. Acad. Sci.* 105, 411–416. doi: [10.1073/pnas.0710423104](https://doi.org/10.1073/pnas.0710423104).
- Schulz, R., Bub, S., Petschick, L. L., Stehle, S., Wolfram, J. (2021). Applied Pesticide Toxicity Shifts Toward Plants and Invertebrates, Even in GM Crops. *Sci.* 372, 81–84. doi: [10.1126/science.abe1148](https://doi.org/10.1126/science.abe1148).
- Shivaprasad, P. V., Chen, H.-M., Patel, K., Bond, D. M., Santos, B. A. C. M. i in. (2012). A MicroRNA Superfamily Regulates Nucleotide Binding Site–Leucine-Rich Repeats and Other mRNAs. *Plant Cell* 24, 859–874. doi: [10.1105/tpc.111.095380](https://doi.org/10.1105/tpc.111.095380).
- Shumayev, K. B., Kosmachevskaya, O. V., Chumikina, L. V., Topunov, A. F. (2016). Dinitrosyl Iron Complexes and other Physiological Metabolites of Nitric Oxide: Multifarious Role in Plants. *Nat. Prod. Commun.* 11, 1189–1192.
- Śliwka, J., Jakuczun, H., Lebecka, R., Marczewski, W., Gebhardt, C. i in. (2006). The novel, major locus Rpi-phu1 for late blight resistance maps to potato chromosome IX and is not correlated with long vegetation period. *Theor. Appl. Genet.* 113, 685–695. doi: [10.1007/s00122-006-0336-9](https://doi.org/10.1007/s00122-006-0336-9).
- Sneppen, K., Ringrose, L. (2019). Theoretical analysis of Polycomb-Trithorax systems predicts that poised chromatin is bistable and not bivalent. *Nat. Commun.* 10, 2133. doi: [10.1038/s41467-019-10130-2](https://doi.org/10.1038/s41467-019-10130-2).
- Sobieszczuk-Nowicka, E., Arasimowicz-Jelonek, M., Tanwar, U. K., Floryszak-Wieczorek, J. (2022). Plant homocysteine, a methionine precursor and plant’s hallmark of metabolic disorders. *Front. Plant Sci.* 13, 1044944. doi: [10.3389/fpls.2022.1044944](https://doi.org/10.3389/fpls.2022.1044944).
- Socco, S., Bovee, R. C., Palczewski, M. B., Hickok, J. R., Thomas, D. D. (2017). Epigenetics: The third pillar of nitric oxide signaling. *Pharmacol. Res.* 121, 52–58. doi: [10.1016/j.phrs.2017.04.011](https://doi.org/10.1016/j.phrs.2017.04.011).
- Springer, N. M., Schmitz, R. J. (2017). Exploiting Induced and Natural Epigenetic Variation for Crop Improvement. *Nat. Rev. Genet.* 18, 563–575. doi: [10.1038/nrg.2017.45](https://doi.org/10.1038/nrg.2017.45).
- Stanley, D. A., Garratt, M. P. D., Wickens, J. B., Wickens, V. J., Potts, S. G. i in. (2015). Neonicotinoid Pesticide Exposure Impairs Crop Pollination Services Provided by Bumblebees. *Nature* 528, 548–550. doi: [10.1038/nature16167](https://doi.org/10.1038/nature16167).

- Świątek, M., Śliwka, J. (2011). Przegląd Badań nad Regulacją Ekspresji Genów Głównych Odporności Roślin na Patogeny. *Biul. Inst. Hod. Aklim. Rośl.* 262, 89-101.
- Tachikawa, M., Matsuo, M. (2023). Divergence and Convergence in International Regulatory Policies Regarding Genome-Edited Food: How to Find a Middle Ground. *Front. Plant Sci.* 14. doi: [10.3389/fpls.2023.1105426](https://doi.org/10.3389/fpls.2023.1105426).
- Tada, Y., Mori, T., Shinogi, T., Yao, N., Takahashi, S. i in. (2004). Nitric Oxide and Reactive Oxygen Species Do Not Elicit Hypersensitive Cell Death but Induce Apoptosis in the Adjacent Cells During the Defense Response of Oat. *MPMI* 17, 245–253. doi: [10.1094/MPMI.2004.17.3.245](https://doi.org/10.1094/MPMI.2004.17.3.245).
- Tada, Y., Spoel, S. H., Pajerowska-Mukhtar, K., Mou, Z., Song, J. i in. (2008). Plant Immunity Requires Conformational Changes of NPR1 via S-Nitrosylation and Thioredoxins. *Sci.* 321, 952–956. doi: [10.1126/science.1156970](https://doi.org/10.1126/science.1156970).
- Thomas, D. D. (2015). Breathing New Life Into Nitric Oxide Signaling: A Brief Overview of the Interplay Between Oxygen and Nitric Oxide. *Redox Biol.* 5, 225–233. doi: [10.1016/j.redox.2015.05.002](https://doi.org/10.1016/j.redox.2015.05.002).
- Trapet, P., Kulik, A., Lamotte, O., Jeandroz, S., Bourque, S. i in. (2015). NO Signaling in Plant Immunity: A Tale of Messengers. *Phytochem.* 112, 72–79. doi: [10.1016/j.phytochem.2014.03.015](https://doi.org/10.1016/j.phytochem.2014.03.015).
- Vandelle, E., Delledonne, M. (2011). Peroxynitrite formation and function in plants. *Plant Sci.* 181, 534–539. doi: [10.1016/j.plantsci.2011.05.002](https://doi.org/10.1016/j.plantsci.2011.05.002).
- Varotto, S., Tani, E., Abraham, E., Krugman, T., Kapazoglou, A. i in. (2020). Epigenetics: Possible Applications in Climate-Smart Crop Breeding. *J. Exp. Bot.* 71, 5223–5236. doi: [10.1093/jxb/eraa188](https://doi.org/10.1093/jxb/eraa188).
- Vasudevan, D., Bovee, R. C., Thomas, D. D. (2016). Nitric oxide, the new architect of epigenetic landscapes. *Nitric Oxide* 59, 54–62. doi: [10.1016/j.niox.2016.08.002](https://doi.org/10.1016/j.niox.2016.08.002).
- Vasudevan, D., Hickok, J. R., Bovee, R. C., Pham, V., Mantell, L. L. i in. (2015). Nitric Oxide Regulates Gene Expression in Cancers by Controlling Histone Posttranslational Modifications. *Cancer Res.* 75, 5299–5308. doi: [10.1158/0008-5472.CAN-15-1582](https://doi.org/10.1158/0008-5472.CAN-15-1582).
- Vidhyasekaran, P. (2016). “Role of Plant Immune Signals and Signaling Systems in Plant Pathogenesis,” w *Switching on Plant Innate Immunity Signaling Systems: Bioengineering and Molecular Manipulation of PAMP-PIMP-PRR Signaling Complex* Signaling and Communication in Plants., ed. P. Vidhyasekaran (Cham: Springer), 27–90. doi: [10.1007/978-3-319-26118-8\\_2](https://doi.org/10.1007/978-3-319-26118-8_2).

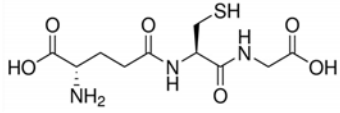
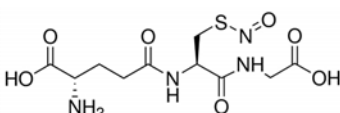
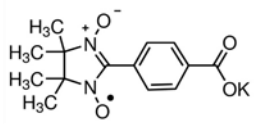
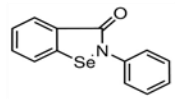
- Viggiano, L., de Pinto, M. C. (2017). “Dynamic DNA Methylation Patterns in Stress Response,” w *Plant Epigenetics RNA Technologies.*, eds. N. Rajewsky, S. Jurga, i J. Barciszewski (Cham: Springer), 281–302. doi: [10.1007/978-3-319-55520-1\\_15](https://doi.org/10.1007/978-3-319-55520-1_15).
- Wang, X., Zhang, Y., Ma, Q., Zhang, Z., Xue, Y. i in. (2007). SKB1-Mediated Symmetric Dimethylation of Histone H4R3 Controls Flowering Time in *Arabidopsis*. *EMBO J.* 26, 1934–1941. doi: [10.1038/sj.emboj.7601647](https://doi.org/10.1038/sj.emboj.7601647).
- Wendehenne, D., Gao, Q.-M., Kachroo, A., Kachroo, P. (2014). Free Radical-Mediated Systemic Immunity in Plants. *Curr. Opin. Plant Biol.* 20, 127–134. doi: [10.1016/j.pbi.2014.05.012](https://doi.org/10.1016/j.pbi.2014.05.012).
- Wendte, J. M., Zhang, Y., Ji, L., Shi, X., Hazarika, R. R. i in. (2019). Epimutations are associated with CHROMOMETHYLASE 3-induced *de novo* DNA methylation. *eLife* 8, e47891. doi: [10.7554/eLife.47891](https://doi.org/10.7554/eLife.47891).
- West, P. T., Li, Q., Ji, L., Eichten, S. R., Song, J. i in. (2014). Genomic Distribution of H3K9me2 and DNA Methylation in a Maize Genome. *PLOS ONE* 9, e105267. doi: [10.1371/journal.pone.0105267](https://doi.org/10.1371/journal.pone.0105267).
- Wong, J., Gao, L., Yang, Y., Zhai, J., Arikiti, S. i in. (2014). Roles of small RNAs in soybean defense against *Phytophthora sojae* infection. *Plant J.* 79, 928–940. doi: [10.1111/tpj.12590](https://doi.org/10.1111/tpj.12590).
- Wurm, C. J., Lindermayr, C. (2021). Nitric oxide signaling in the plant nucleus: the function of nitric oxide in chromatin modulation and transcription. *J. Exp. Bot.* 72, 808–818. doi: [10.1093/jxb/eraa404](https://doi.org/10.1093/jxb/eraa404).
- Wysocka, J., Allis, C. D., Coonrod, S. (2006). Histone Arginine Methylation and Its Dynamic Regulation. *Front. Biosci.* 11, 344–355. doi: [10.2741/1802](https://doi.org/10.2741/1802).
- Yogendra, K. N., Kumar, A., Sarkar, K., Li, Y., Pushpa, D. i in. (2015). Transcription Factor StWRKY1 Regulates Phenylpropanoid Metabolites Conferring Late Blight Resistance in Potato. *J. Exp. Bot.* 66, 7377–7389. doi: [10.1093/jxb/erv434](https://doi.org/10.1093/jxb/erv434).
- Yu, A., Lepère, G., Jay, F., Wang, J., Bapaume, L. i in. (2013). Dynamics and biological relevance of DNA demethylation in *Arabidopsis* antibacterial defense. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 110, 2389–2394. doi: [10.1073/pnas.1211757110](https://doi.org/10.1073/pnas.1211757110).
- Zhan, N., Wang, C., Chen, L., Yang, H., Feng, J. i in. (2018). S-Nitrosylation Targets GSNO Reductase for Selective Autophagy during Hypoxia Responses in Plants. *Mol. Cell* 71, 142-154.e6. doi: [10.1016/j.molcel.2018.05.024](https://doi.org/10.1016/j.molcel.2018.05.024).
- Zhang, H., Lang, Z., Zhu, J.-K. (2018). Dynamics and function of DNA methylation in plants. *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* 19, 489–506. doi: [10.1038/s41580-018-0016-z](https://doi.org/10.1038/s41580-018-0016-z).



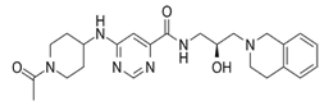
- Zhang, Z., Zhang, S., Zhang, Y., Wang, X., Li, D. i in. (2011). *Arabidopsis* Floral Initiator SKB1 Confers High Salt Tolerance by Regulating Transcription and pre-mRNA Splicing Through Altering Histone H4R3 and Small Nuclear Ribonucleoprotein LSM4 Methylation. *Plant Cell* 23, 396–411. doi: [10.1105/tpc.110.081356](https://doi.org/10.1105/tpc.110.081356).
- Zhao, Y., Ma, W., Wei, X., Long, Y., Zhao, Y. i in. (2019). Identification of Exogenous Nitric Oxide-Responsive miRNAs from Alfalfa (*Medicago sativa* L.) under Drought Stress by High-Throughput Sequencing. *Genes (Basel)* 11, 30. doi: [10.3390/genes11010030](https://doi.org/10.3390/genes11010030).
- Zhi, P., Chang, C. (2021). Exploiting Epigenetic Variations for Crop Disease Resistance Improvement. *Front. Plant. Sci.* 12, 692328. doi: [10.3389/fpls.2021.692328](https://doi.org/10.3389/fpls.2021.692328).
- Zhou, H., Liu, Y., Liang, Y., Zhou, D., Li, S. i in. (2020). The function of histone lysine methylation related SET domain group proteins in plants. *Protein Sci.* 29, 1120–1137. doi: [10.1002/pro.3849](https://doi.org/10.1002/pro.3849).
- Zhou, J.-M., Zhang, Y. (2020). Plant Immunity: Danger Perception and Signaling. *Cell* 181, 978–989. doi: [10.1016/j.cell.2020.04.028](https://doi.org/10.1016/j.cell.2020.04.028).
- Zhu, Q.-H., Fan, L., Liu, Y., Xu, H., Llewellyn, D. i in. (2013). miR482 Regulation of NBS-LRR Defense Genes during Fungal Pathogen Infection in Cotton. *PLoS One* 8, e84390. doi: [10.1371/journal.pone.0084390](https://doi.org/10.1371/journal.pone.0084390).
- Zipfel, C. (2009). Early molecular events in PAMP-triggered immunity. *Curr. Opin. Plant Biol.* 12, 414–420. doi: [10.1016/j.pbi.2009.06.003](https://doi.org/10.1016/j.pbi.2009.06.003).

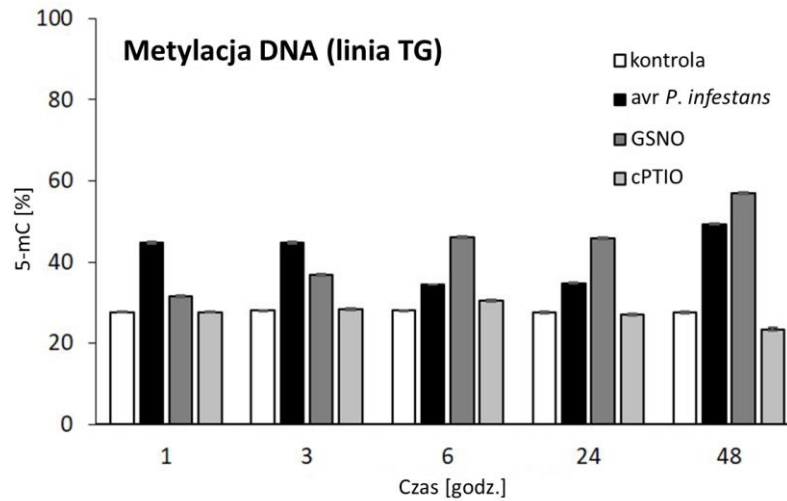
## 10. Aneks

**Tabela uzupełniająca 1.** Lista odczynników chemicznych stosowanych jako donor i zmiatacz tlenku azotu (NO) oraz zmiatacz nadtlenoazotynu (ONOO<sup>-</sup>).

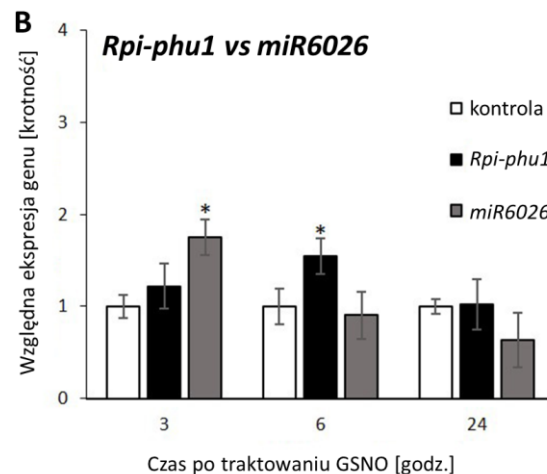
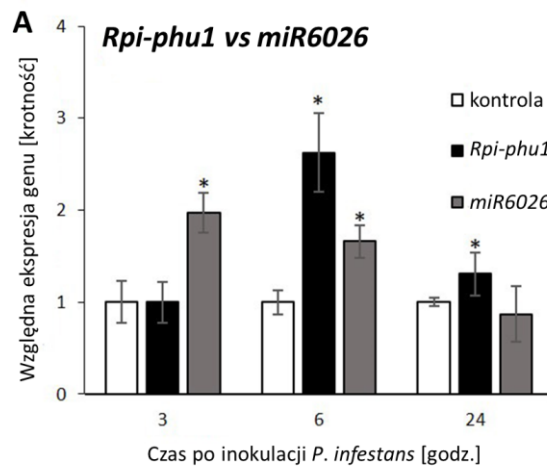
Odczynnik	Stosowane stężenie [μM]	Firma (Numer katalogowy)	Wzór chemiczny
<b>Kontrola</b>			
Zredukowany glutation (GSH)	250	Sigma-Aldrich (G4251)	
<b>Donor i zmiatacz NO</b>			
S-nitrozoglutation (GSNO)	250	Sigma-Aldrich (N4148)	
carboxy-PTIO (cPTIO)	200	Sigma-Aldrich (C221)	
<b>Zmiatacz ONOO<sup>-</sup></b>			
Ebselen	50	Sigma-Aldrich (E3520)	

**Tabela uzupełniająca 2.** Inhibitor PRMT5 (GSK3326595/EPZ015938).

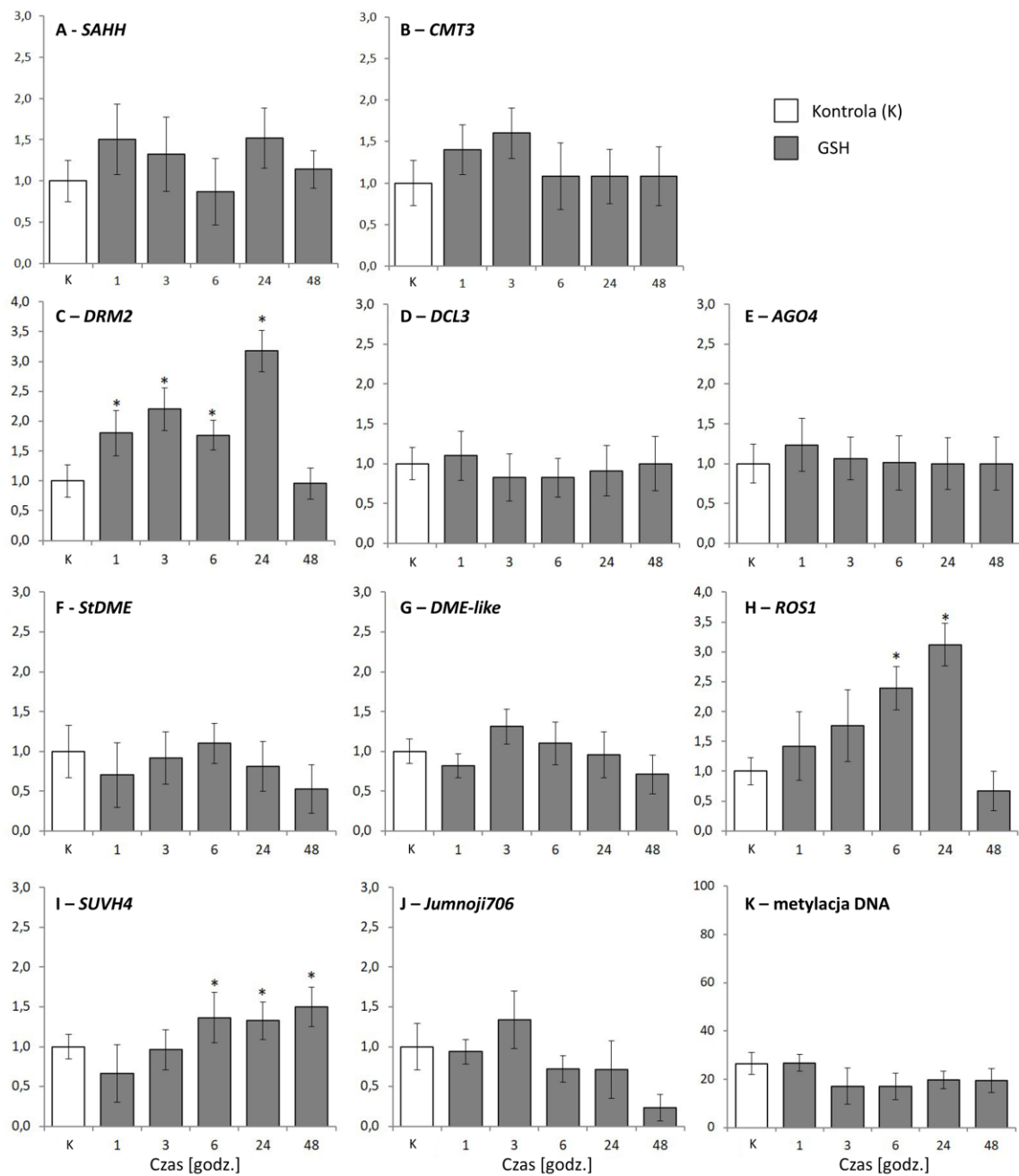
Odczynnik	Stosowane stężenie [μM]	Firma (Numer katalogowy)	Wzór chemiczny
GSK3326595 /EPZ015938	50 100 200	MedChemExpress (HY-101563)	



**Rycina uzupełniająca 1.** Wpływ avr *P. infestans* lub GSNO, lub cPTIO na globalną metylację DNA w liściach ziemniaka (TG 97-411).



**Rycina uzupełniająca 2.** Profil ekspresji *miR6026* i jego celu, genu *Rpi-phu1* po traktowaniu avr *P. infestans* lub GSNO. Analiza ekspresji *Rpi-phu1* w porównaniu z *miR6026* po infekcji (A) lub GSNO (B).



**Rycina uzupełniająca 3.** Wpływ GSH na ekspresję wszystkich analizowanych genów oraz poziom 5-mC DNA. Analiza ekspresji genów *SAHH* (A), *CMT3* (B) *DRM2* (C) *DCL3* (C) *AGO4* (E) *StDME* (F) *DME-like* (G) *ROS1* (H) *SUVH4* (I) *Jumonji706* (J) metylacja DNA(K).

## Wykaz dorobku naukowego

**Publikacja 3.** – nie stanowi podstawy postępowania w sprawie o nadanie stopnia naukowego doktora

Kuźnicki, D., Meller, B., Arasimowicz-Jelonek, M., Braszewska-Zalewska, A., **Drozda, A.**, Floryszak-Wieczorek, J. (2019). BABA-Induced DNA Methylome Adjustment to Intergenerational Defense Priming in Potato to *Phytophthora infestans*. *Front. Plant Sci.* 10, 650.

DOI: [10.3389/fpls.2019.00650](https://doi.org/10.3389/fpls.2019.00650).

Punktacja wg MEiN (2023): 140

IF=5.6

### UDZIAŁ W KONFERENCJACH NAUKOWYCH

1. Kuźnicki D., Meller B., **Drozda A.**, Guan Y., Arasimowicz-Jelonek M., Floryszak-Wieczorek J.; 8-13.04.2019, Poznań, Polska; "Participation of RdDM pathway in induced potato immunity to *Phytophthora infestans*" V International Conference on Research and Education; Księga abstraktów, s. 172.
2. **Drozda A.**, Kuźnicki D., Meller B., Guan Y., Arasimowicz-Jelonek M., Floryszak-Wieczorek J.; 9-12.09.2019, Toruń, Polska; "Nitric oxide as an epigenetic mediator of effector-triggered immunity in potato" 9th Conference of the Polish Society of Experimental Plant Biology; Księga abstraktów, s. 65.
3. **Drozda, A.**; Kurpisz, B.; Guan, Y.; Kuźnicki, D.; Arasimowicz-Jelonek, M.; Floryszak-Wieczorek, J. Nitric oxide as a regulator of diverse histone methylations involved in potato immunity to *Phytophthora infestans*. 25-26.02.2021, Charków, Ukraina; International Scientific Conference Plant Stress and Adaptation. Księga abstraktów s. 7.
4. **Drozda, A.**; Kurpisz, B.; Guan, Y.; Kuźnicki, D.; Arasimowicz-Jelonek, M.; Floryszak-Wieczorek, J. The impact of nitrite oxide and peroxy nitrite on DNA (de)methylation gene expression in potato to *Phytophthora infestans*. 17.06.2021, Kijów, Ukraina; International Scientific Conference, dedicated to the 75<sup>th</sup> anniversary of the Institute of Plant Physiology and Genetics of the National Academy of Sciences of Ukraine, Księga anstraktów, s. 220.
5. **Drozda, A.**; Guan, Y.; Kuźnicki, D.; Kurpisz, B.; Arasimowicz-Jelonek, M.; Floryszak-Wieczorek, J. Is NO regulation of potato gene expression related to *Phytophthora infestans* resistance epigenetic in nature? 7-9.07.2021, Szeged, Węgry; 8<sup>th</sup> Plant Nitric Oxide International Meeting. Księga abstraktów, s. 56 (nagrodzony poster).

6. Guan, Y.; **Droзда, A.**; Kuźnicki, D.; Kurpisz, B.; Arasimowicz-Jelonek, M.; Floryszak-Wieczorek, J. Influence of nitric oxide on the expression patterns of *mi482e* and *R3a* in potato leaves (*Solanum tuberosum* L. 'Sarpo Mira'). 22-24.09.2021, Poznań, Polska; COMPASS: the future of interdisciplinary science.
7. Floryszak-Wieczorek, J., **Droзда, A.**, Guan, Y., Kuźnicki, D., Kurpisz, B., Arasimowicz-Jelonek, M. Insights into the expression of DNA (de)methylation genes responsive to nitric oxide in potato resistance to late blight disease. 12-14.07.2022, Kreta, Grecja; EPI-CATCH Conference 2022: EPIgenetic mechanisms of Crop Adaptation To Climate Change. poster.

*Pozostałe aktywności prowadzone w trakcie studiów doktoranckich*

1. Udział w XIX Poznańskim Festiwalu Nauki i Sztuki organizowanym m.in. przez Uniwersytet Przyrodniczy w Poznaniu – prezentacja multimedialna w języku niemieckim, pt. „Fitochrom”; 19.04.2016.
2. Udział w konferencji naukowej „Dni Doktoranta 2018” organizowanej przez Samorząd Doktorantów Uniwersytetu Przyrodniczego w Poznaniu; poster prezentujący wyniki badań prowadzonych w ramach projektu SORMISOL, w IGR PAN w Poznaniu; pt.: „Badanie reakcji fizjologicznej na stres suszy u sadzonek miskanta otrzymanych w kulturze *in vitro*”; 13.04. 2018.
3. Zaangażowanie, czynne uczestnictwo i promocja Uczelni w trakcie X edycji Nocy Naukowców na Uniwersytecie Przyrodniczym w Poznaniu; 28.09.2018.
  - Projekt nr 818464 – „UNIGHTED”; UNITED EUROPE-UNITED SCIENCE-UNITED CULTURE-UNITED NIGHT – projekt realizowany w ramach Programu Ramowego Unii Europejskiej HORIZON 2020.
4. Członkini i przedstawicielka doktorantów Wydziału Ogrodnictwa i Architektury Krajobrazu w Odwoławczej Komisji Stypendialnej na Uniwersytecie Przyrodniczym w Poznaniu; 2019.
5. Zaangażowanie, czynne uczestnictwo i promocja Uczelni w trakcie XI edycji Nocy Naukowców na Uniwersytecie Przyrodniczym w Poznaniu; 27.09.2019.
  - Projekt nr 818464 – „UNIGHTED”; UNITED EUROPE-UNITED SCIENCE-UNITED CULTURE-UNITED NIGHT – projekt realizowany w ramach Programu Ramowego Unii Europejskiej HORIZON 2020.

6. Przygotowanie i realizacja programu wydarzeń na Uniwersytecie Przyrodniczym w Poznaniu w ramach XXII Poznańskiego Festiwalu Nauki i Sztuki; 8-11.04.2019.
7. Zakwalifikowanie i udział w projekcie „Wysoka jakość kształcenia atutem młodej kadry dydaktycznej Uniwersytetu Przyrodniczego w Poznaniu” współfinansowany ze środków Unii Europejskiej w ramach Europejskiego Funduszu Społecznego i Programu Operacyjnego Wiedza Edukacja Rozwój.
  - a) Ukończenie szkolenia „Kursu innowacyjnych kompetencji dydaktycznych”; 20.05-22.05.2019 oraz 3-5.06.2019; Poznań; organizator – Kuźnia Ekspertów.
  - b) Ukończenie szkolenia pt.: „Obsługa programów do prezentacji multimedialnych (Power Point, Prezi, Emaze)”; 7-23.09.2019; Poznań; organizator – MrCertified.
  - c) Ukończenie szkolenia „Wystąpienia publiczne, retoryka, erystyka, prowadzenie dyskusji i debat, nowoczesna dydaktyka”; 22-23.02.2020; Poznań; organizator – Kuźnia Ekspertów.
  - d) Ukończenie szkolenia pt.: „Blended learning: Tworzenie treści do materiałów dydaktycznych e formule e-learning”; 6-9.04.2020; organizator MrCertified.
  - e) Ukończenie szkolenia pt.: „Wykorzystanie mediów społecznościowych w procesie dydaktycznym”; 8.05.2020; Poznań; organizator – Kuźnia Ekspertów.
  - f) Ukończenie szkolenia pt.: „Język angielski dla dydaktyków” oraz uzyskanie dyplomu potwierdzającego osiągnięcie poziomu biegłości językowej B2; lipiec 2020; organizator – Internat Language Institute.
8. Ukończenie szkolenia pt.: “Using NCBI’s Primer-BLAST to Design and Analyze PCR Primers”; 15.03.2022.

## Kopie publikacji wchodzących w skład rozprawy doktorskiej

### Publikacja 1.

**Drozda, A.**, Kurpisz, B., Arasimowicz-Jelonek, M., Kuźnicki, D., Jagodzik, P., Guan, Y., Floryszak-Wieczorek, J., 2022. Nitric oxide implication in potato immunity to *Phytophthora infestans* via modifications of histone H3/H4 methylation patterns on defense genes. *Int. J. Mol. Sci.* 23, 4051.

DOI: <https://doi.org/10.3390/ijms23074051>

### Publikacja 2.

**Drozda, A.**, Kurpisz, B., Guan, Y., Arasimowicz-Jelonek, M., Plich, J., Jagodzik, P., Kuźnicki, D., Floryszak-Wieczorek, J., 2022. Insights into the expression of DNA (de)methylation genes responsive to nitric oxide signaling in potato resistance to late blight disease. *Front. Plant Sci.* 13.

DOI: <https://doi.org/10.3389/fpls.2022.1033699>





Article

# Nitric Oxide Implication in Potato Immunity to *Phytophthora infestans* via Modifications of Histone H3/H4 Methylation Patterns on Defense Genes

Andżelika Drozda <sup>1</sup>, Barbara Kurpisz <sup>1</sup>, Magdalena Arasimowicz-Jelonek <sup>2</sup> , Daniel Kuźnicki <sup>1</sup>, Przemysław Jagodzick <sup>2</sup> , Yufeng Guan <sup>1,2</sup> and Jolanta Floryszak-Wieczorek <sup>1,\*</sup>

<sup>1</sup> Department of Plant Physiology, Faculty of Agronomy, Horticulture and Bioengineering, Poznan University of Life Sciences, 60-637 Poznan, Poland; andzelika.drozda@up.poznan.pl (A.D.); barbara.kurpisz90@gmail.com (B.K.); daniel.kuznicki@up.poznan.pl (D.K.); yufeng.guan@amu.edu.pl (Y.G.)

<sup>2</sup> Department of Plant Ecophysiology, Faculty of Biology, Adam Mickiewicz University in Poznan, 61-614 Poznan, Poland; arasim@amu.edu.pl (M.A.-J.); przemyslaw.jagodzick@amu.edu.pl (P.J.)

\* Correspondence: jolanta.floryszak@up.poznan.pl; Tel.: +48-61-848-71-81

**Abstract:** Nitric oxide (NO) is an essential redox-signaling molecule operating in many physiological and pathophysiological processes. However, evidence on putative NO engagement in plant immunity by affecting defense gene expressions, including histone modifications, is poorly recognized. Exploring the effect of biphasic NO generation regulated by S-nitrosoglutathione reductase (GNSOR) activity after avr *Phytophthora infestans* inoculation, we showed that the phase of NO decline at 6 h post-inoculation (hpi) was correlated with the rise of defense gene expressions enriched in the TrxG-mediated H3K4me3 active mark in their promoter regions. Here, we report that arginine methyltransferase PRMT5 catalyzing histone H4R3 symmetric dimethylation (H4R3sme2) is necessary to ensure potato resistance to avr *P. infestans*. Both the pathogen and S-nitrosoglutathione (GSNO) altered the methylation status of H4R3sme2 by transient reduction in the repressive mark in the promoter of defense genes, *R3a* and *HSR203J* (a resistance marker), thereby elevating their transcription. In turn, the PRMT5-selective inhibitor repressed *R3a* expression and attenuated the hypersensitive response to the pathogen. In conclusion, we postulate that lowering the NO level (at 6 hpi) might be decisive for facilitating the pathogen-induced upregulation of stress genes via histone lysine methylation and PRMT5 controlling potato immunity to late blight.

**Keywords:** nitric oxide; stress-responsive gene regulation; histone lysine; arginine methylation; potato hypersensitive response; late blight



**Citation:** Drozda, A.; Kurpisz, B.; Arasimowicz-Jelonek, M.; Kuźnicki, D.; Jagodzick, P.; Guan, Y.; Floryszak-Wieczorek, J. Nitric Oxide Implication in Potato Immunity to *Phytophthora infestans* via Modifications of Histone H3/H4 Methylation Patterns on Defense Genes. *Int. J. Mol. Sci.* **2022**, *23*, 4051. <https://doi.org/10.3390/ijms23074051>

Academic Editor:  
Siriluck Ponsuksili

Received: 15 March 2022

Accepted: 4 April 2022

Published: 6 April 2022

**Publisher's Note:** MDPI stays neutral with regard to jurisdictional claims in published maps and institutional affiliations.



**Copyright:** © 2022 by the authors. Licensee MDPI, Basel, Switzerland. This article is an open access article distributed under the terms and conditions of the Creative Commons Attribution (CC BY) license (<https://creativecommons.org/licenses/by/4.0/>).

## 1. Introduction

The last three decades of intensive research on nitric oxide in plants has highlighted nitric oxide (NO) engagement in different aspects of development and stress-related responses. The wide range of NO bioactivity depends on its diffusion properties, high reactivity affecting the function of a multitude of cellular proteins, as well as its concentration. Nitric oxide has been documented as a critical redox signaling molecule effective in triggering plant responses against a wide range of pathogens during both pathogen-associated molecular pattern (PAMP) triggered immunity (PTI) and a particular effector-triggered immunity (ETI) [1,2]. During the first hours after a pathogen challenge, NO is generated by a plant in response to the pathogen attack as a local NO burst, stimulating a different sequence of defense events [3–8]. Nitric oxide generation in synergy with reactive oxygen species (ROS) may lead to the formation of peroxynitrite (ONOO<sup>−</sup>) which, at the molecular level, may constitute the signaling mode of NO action via tyrosine residue nitration in proteins [9–13]. S-nitrosation, based on the NO equivalent transfer to cysteine thiol, is the subsequent reversible redox and NO-dependent post-translational protein modification

(PTM) regulating the activity of many proteins, including R and PR (pathogenesis-related) proteins working in cooperation with transcription factors [14–17]. Some of the essential NO activities result from its covalent binding to the ferrous heme in proteins or the formation of nitrosyl–iron complexes (DNICs) [18]. NO in direct or indirect interactions with target proteins and other NO-dependent post-stress processes can affect plant immunity. Sometimes, when a stress stimulus overpowers the physiological response buffer, plant survival can involve epigenetic regulations [19].

Epigenetic control of gene expression relies on DNA methylation, the RNA-directed DNA methylation (RdDM) pathway with small non-coding interfering RNA (siRNA), and histone-modifying complexes, which regulate chromatin structure [20]. Under abiotic and biotic stresses, chromatin is dynamically modulated between the transcriptionally repressed and active states to regulate gene expression. Histone proteins are particularly susceptible to various PTMs, including methylation; however, the role of histone modifications during stress is not as straightforward as that of DNA methylation [21].

Depending on the site and extent of modification (mono-, di-, or tri-methylation) on lysine or arginine residues, histone methylation can contribute to the active or inactive conformation of chromatin. The state of lysine methylation can be achieved by a balance between the action of targeted methyltransferases (HMTs) and demethylases (KDMs), which can remove methyl groups from histone proteins. Most lysine methyltransferases contain a conserved SET domain, based on the three histone lysine methyltransferases, i.e., the suppressor of variegation [SU(VAR)3-9], enhancer of zeste [E(z)], and trithorax [Trx]. The trithorax subfamily proteins involved in transcription activation catalyze the di- or tri-methylation of H3K4, whereas the enhancer of the zeste subfamily, which is the active subunit of the polycomb repressor complex (PRC) harboring curly leaf (CLF), targets the di- and tri-methylation of H3K27 and inhibits gene expression [22–25].

In turn, protein arginine methylation is catalyzed by a group of highly conserved protein arginine methyltransferases (PRMTs), of which PRMT5 has been well characterized in plants. PRMT5 is also named SKB1 (kinase binding protein 1) or CAU1 (calcium under accumulation 1), because protein arginine methyltransferase 5 is a type II arginine methyltransferase that catalyzes Arg symmetric dimethylation at the arginine residue R on histone H4 (H4R3me2) [26,27]. PRMT5 methylates a large pool of target substrates, including histone and non-histone proteins, to regulate gene expression, RNA elongation, pre-mRNA splicing, protein regulation, and cell stability [28–34]. Increasing evidence suggests that PRMT5 regulates developmental processes and plant responses to environmental stresses. Study of *PRMT5* mutants revealed that *AtPRMT5* deficiency causes pleiotropic phenotypes, including growth inhibition, dark green and curled leaves, delayed flowering and reduced sensitivity to vernalization, hypersensitivity to salt, and drought [31,32,35].

Due to its pleiotropic functions, it could be assumed that PRMT5 is subject to multi-level regulation and modification. It has been found that human PRMT5 is phosphorylated at several residues, and this crosstalk between kinases and arginine methyltransferases may play a pivotal role in modulating different cellular functions of PRMT5 [36]. Additionally, experimental evidence in plants has shown that NO positively regulates PRMT5 function under stress conditions via the S-nitrosation of PRMT5 at cysteine 125, promoting methyltransferase activity associated with salt stress tolerance [37].

Compared with the well-established knowledge about the pathway of NO signaling to specific downstream effects in the plant, studies on epigenetic regulation by NO-mediated chromatin-modifying enzymes, altering histone post-translational modification, DNA methylation, and microRNA expression are in their infancy. To date, several reports have been published on the potential NO-dependent effects on chromatin structure affecting gene expression in plants [38–43]. The experimental evidence was focused on exploring NO regulation via the tyrosine nitration or S-nitrosation of histone deacetylases (HDACs), of which the downregulation enhances acetylation and makes chromatin more accessible for transcription factors [44–47]. A study on GSNOR1-mediated histone and DNA methylation

has been published recently, revealing the complex picture involving a new NO function as an epigenetic mediator in plants [48].

Our understanding of the molecular mechanisms of epigenetic variation in crop improvement strategies, including disease resistance, is rapidly growing [49–52]. Most of the recognized epigenetic mechanisms are related to model plants. In the present study, we focused on exploring histone modifications occurring in potato responses to *Phytophthora infestans*, the causative agent of late blight disease. Late blight remains the most devastating disease in potato, and the direct cost of plant protection, together with lost production, is assessed at over USD 5 billion per year globally [53]. Potato *P. infestans* epigenetic modifications should be better recognized and addressed for future potato resistance improvement.

Thus, our research provides new insight into NO-associated potato immunity to avr *P. infestans*, including redox- and time-dependent crosstalk between histone lysine and arginine methylation, contributing to reprogramming defense genes. Our findings revealed the molecular dialog between biphasic NO generation and PRMT5 linked with reversible deposition of the repressive H4R3sme2 mark on the resistance genes promoter, thus regulating their transcription.

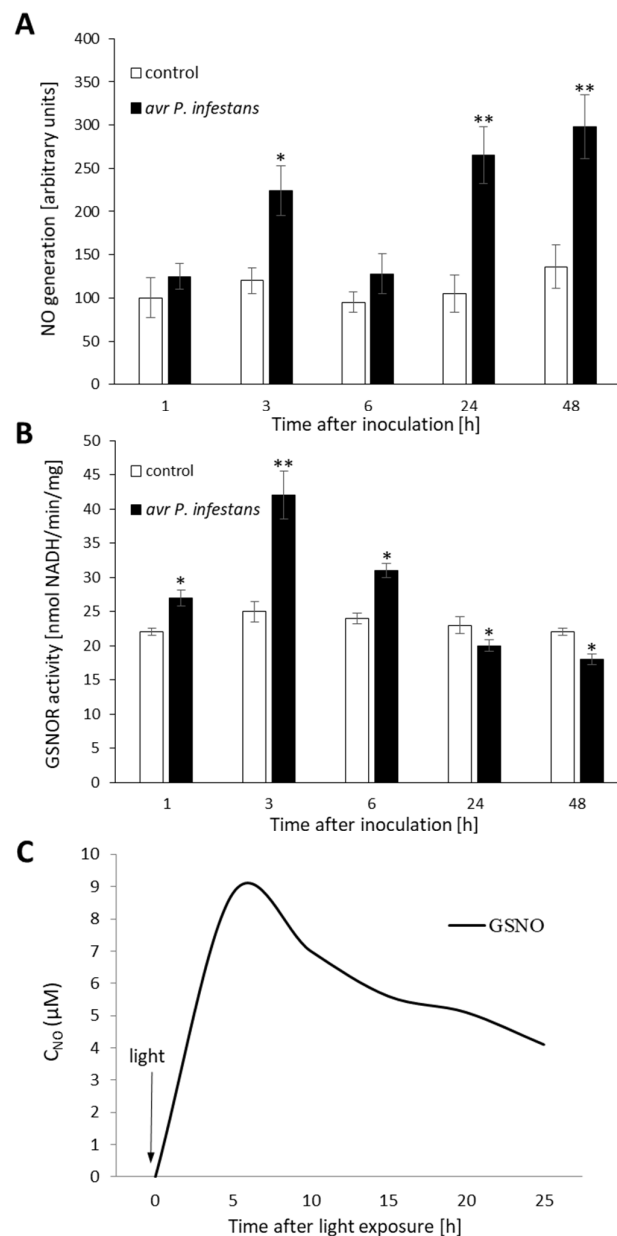
## 2. Results

### 2.1. Biphasic NO Production under GSNOR Controlling

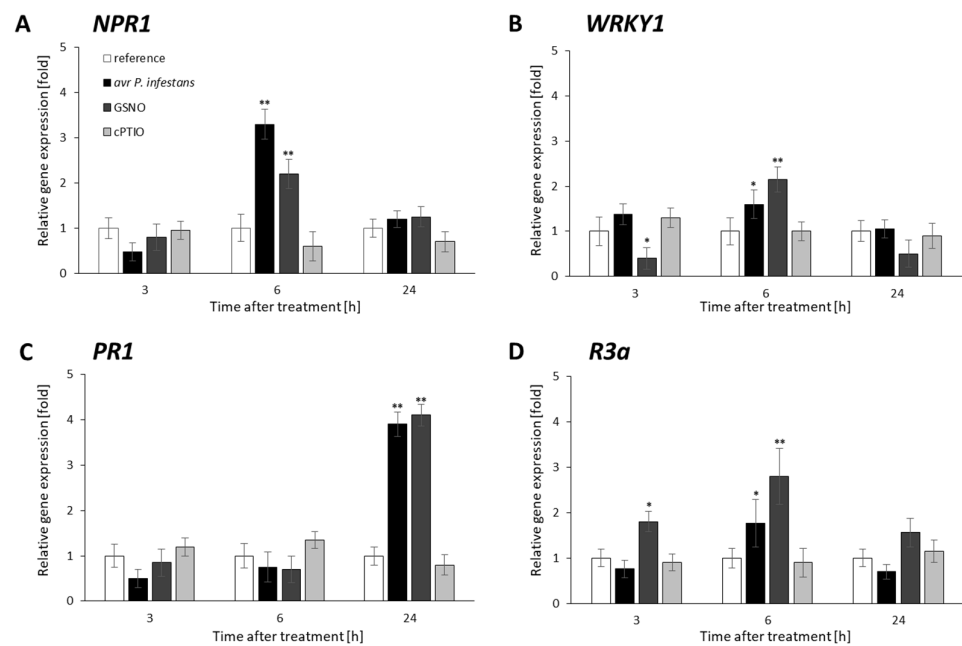
To determine the impact of pathogen-induced NO burst on epigenetic variations in potato plants, the level of NO was measured in leaves inoculated with avr *P. infestans*. The obtained data revealed two waves of NO overproduction after pathogen inoculation. The biphasic NO profile consisted of an initial sharp increase (at 3 hpi), subsequent decline (at 6 hpi), and a second (at 24–48 hpi) stronger phase of NO generation (Figure 1A). NO formation cooperated with S-nitrosoglutathione reductase (GSNOR) activity. The primary function of GSNOR is based on the regulation of intracellular resources of GSNO and NO/SNOs. Our data suggest that GSNOR activity increased gradually up to 3 hpi, then decreased (Figure 1B), and corresponded to the early timing of NO formation.

To compare the effect of endogenous NO generation after avr *P. infestans* inoculation with exogenous NO on histone methylation changes, potato leaves were treated with 250  $\mu$ M GSNO. The enhanced NO emissions from GSNO solution were found between 3 and 24 h after turning on the light, at a half-life  $t_{1/2}$  = ca. 7 h (Figure 1C). These data are in accordance with our previous study [54]. Moreover, to evaluate NO's contribution to a given process, leaves were treated independently with cPTIO (the NO scavenger) or GSH (additional control).

First, we analyzed the transcriptional pattern of essential defense genes and found that *NPR1*, *WRKY1*, and *R3a* peaked mainly at 6 h and *PR1* at 24 h, after pathogen or GSNO treatment (Figure 2A–D). Importantly, the obtained data revealed possible interconnections between controlled NO levels and other NO targets that integrated external cues to internal transcriptional network reprogramming for resistance.



**Figure 1.** Nitric oxide burst (A) and GSNOR activity in potato avr *P. infestans* interaction (B), concentration–time traces of NO emission from GSNO under continuous illumination (C). Conditions applied in electrochemical NO detection: donor concentration, 250  $\mu\text{M}$ ; electrolyte, phosphate buffer pH 7.4; light, polychromatic (white), illumination intensity 180  $\mu\text{mol photons m}^{-2} \text{s}^{-1}$ ; starting temperature, 20  $^{\circ}\text{C}$ ; final temperature, 26  $^{\circ}\text{C}$ . Values represent the means of data  $\pm$  SD of three independent experiments. Asterisks indicate values that differ significantly from control leaves at  $\alpha < 0.05$  (\*) and  $\alpha < 0.01$  (\*\*).



**Figure 2.** Effects of avr *P. infestans* and GSNO on potato defense genes transcription. RT-qPCR analysis of the *NPR1* (A), *WRKY1* (B), *PR1* (C), and *R3a* gene expression (D) was performed at selected time points at 3–24 h after GSNO, cPTIO treatment, or challenge inoculation, respectively. Values represent the means of data  $\pm$  SD of at least three independent experiments. Asterisks indicate values that differ significantly from water-treated (reference) potato leaves at  $\alpha < 0.05$  (\*) and  $\alpha < 0.01$  (\*\*).

## 2.2. CLF and TrxG Gene Expression under Redox-Dependent Changes

To explain how and whether NO bursts affect genes of H3 lysine methyltransferases, we analyzed the accumulation of mRNA transcripts for curly leaf (CLF) and trithorax (*TrxG*) in response to avr *P. infestans*. (Figures 3A and 4A). Pathogens weakly affected *CLF* gene expression, except for transient stimulation at 6 hpi (Figure 3A). A similar tendency was found in the transcriptional profile for *TrxG*, with no significant higher transcript levels (at 1–24 hpi). (Figure 4A). In turn, GSNO, similarly to GSH treatment, initially decreased (at 1–3 h) *CLF* gene expression, then induced an increase (at 6–24 h), as compared with cPTIO (Figure 3A). *TrxG* gene expression, apart from early (at 1 h) transcript level decline, showed no significant changes in response to GSNO (Figure 4A).

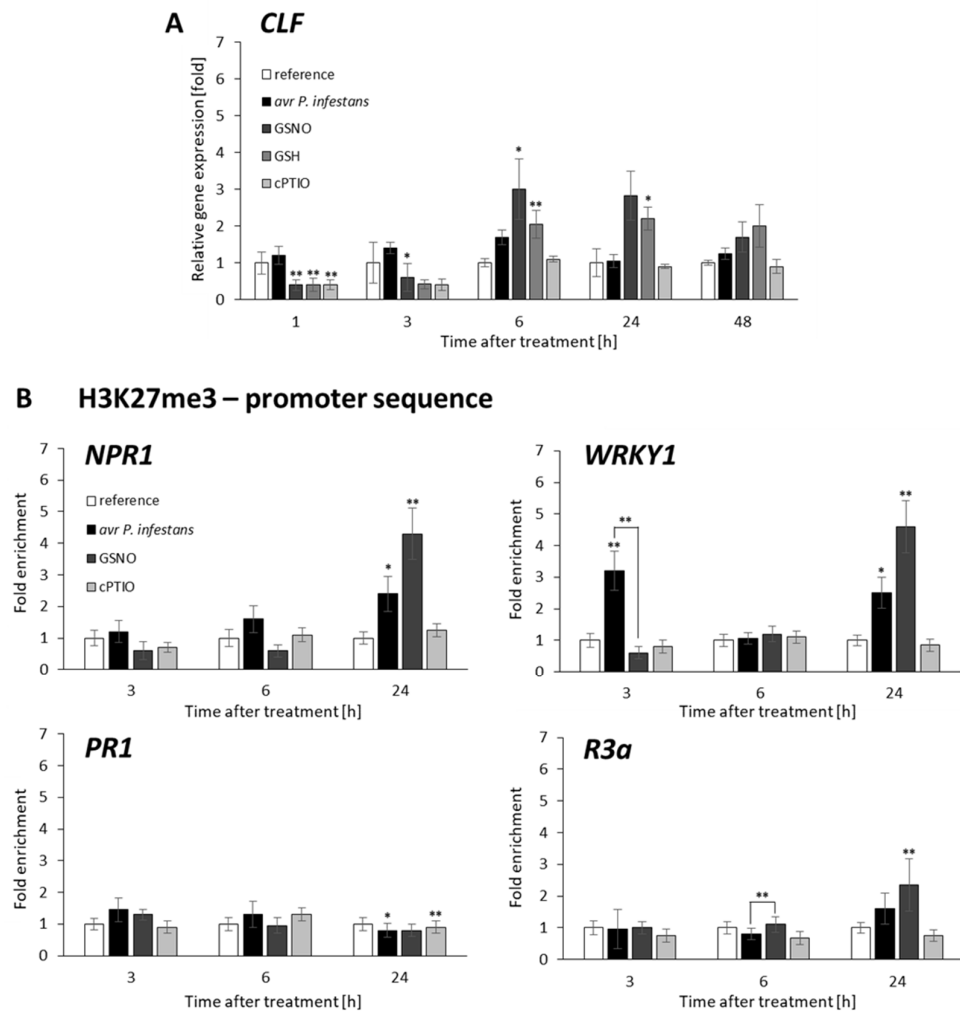
## 2.3. Distribution Status of CLF-Mediated H3K27me3 and TrxG-Mediated H3K4me3 Marks on Stress-Responsive Genes Shows Some Similarities in the Response to Pathogens and GSNO

To investigate the correlation of the transcriptional status with the level of H3K4me3 and H3K27me3 marks on stress-responsive genes after *P. infestans* or GSNO treatment, we used the ChIP-qPCR assay with H3K4me3 and H3K27me3 specific antibodies and primers designed to probe the promoter regions of these genes.

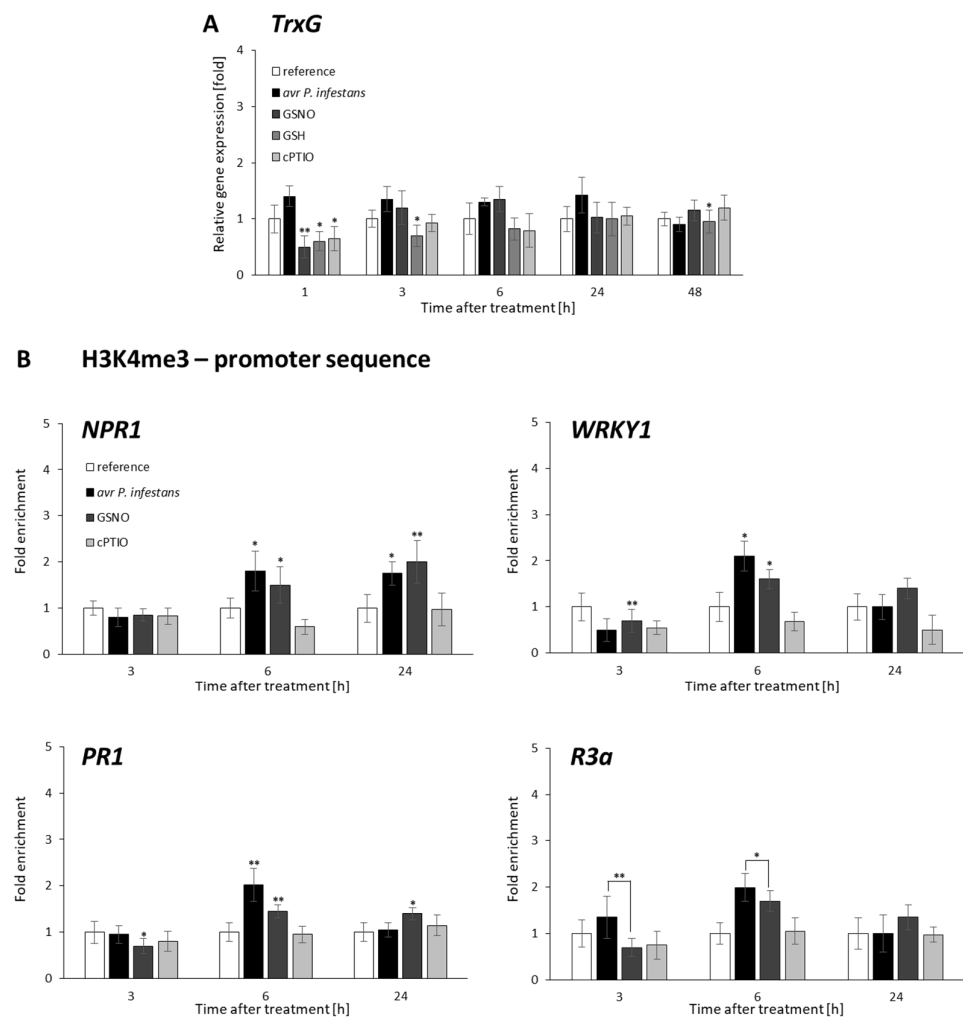
The promoters of *NPR1*, *WRKY1*, and *R3a* exhibited an increase in H3K27me3 levels mainly at a later time point (at 24 h) after both treatments. Only *WRKY1* was also (at 3 h) enriched early in this repressive mark, which decreased (at 6 hpi) after the pathogen challenge (Figure 3B). Notably, a relatively high level of H3K4me3 was noted on the promoter of all stress-responsive genes, mainly at 6 h in response avr *P. infestans* or GSNO (Figure 4B).

The obtained results revealed some similarities between endogenous and exogenous NO sources on the transcriptional pattern of stress-responsive genes linked with the distribution of active mark H3K4me3. After pathogen inoculation, time-dependent enrichment of the H3K4me3 mark on *NPR1*, *WRKY1*, *PR1*, and *R3a* promoters was probably favorable for effectively reinforcing defense gene transcription. Moreover, we concluded that histone

lysine methyltransferases activities connected with transient H3K4me3 or H3K27me3 mark deposition on defense genes could operate independently of *TrxG* or *CLF* transcription.



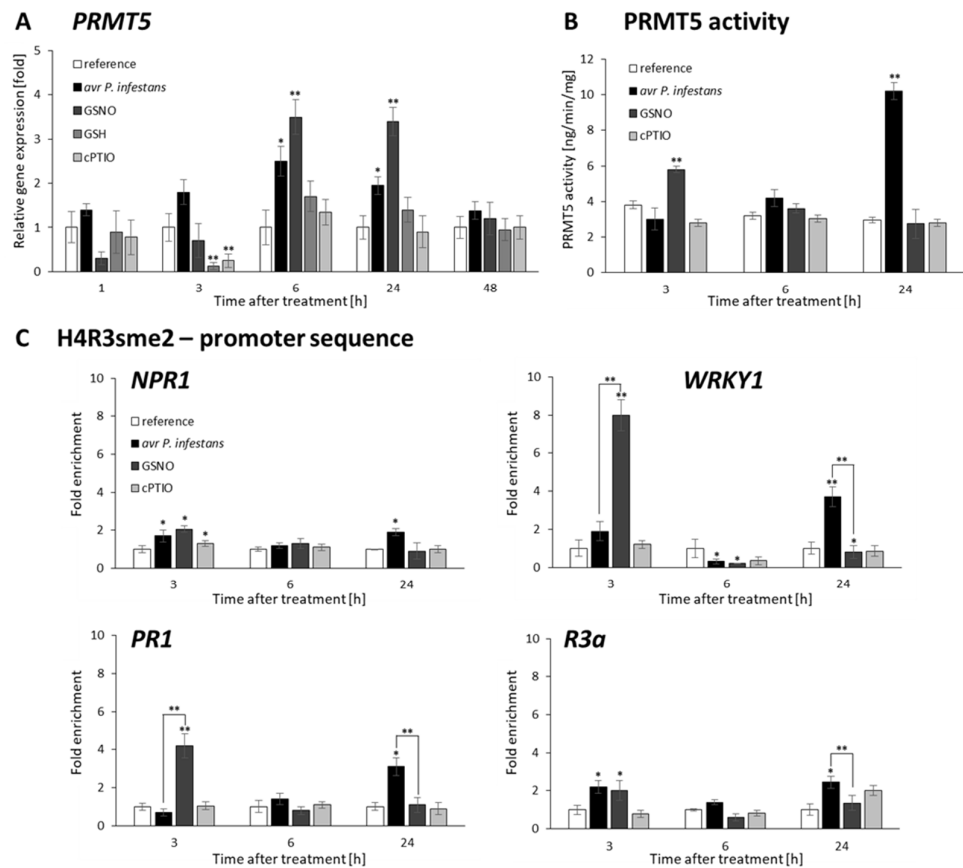
**Figure 3.** *CLF* methyltransferase expression profile (A) and distribution levels of H3K27me3 on the promoter of *NPR1*, *WRKY1*, *PR1*, and *R3a*, respectively (B). RT-qPCR gene expression of *CLF* was analyzed in potato leaves (at 1–48 h) after treatment with GSNO, GSH, cPTIO, water, or *avr P. infestans* inoculation, respectively. ChIP-qPCR analyses were performed in potato leaves at selected time points (3–24 h), after treatment with GSNO, GSH, cPTIO, water, or *avr P. infestans* inoculation, respectively. Data are presented as X-fold enrichment [55]. The relative amount of immunoprecipitated chromatin fragments (as determined by real-time PCR) from the above variants of treatment was compared with the reference (arbitrarily set to 1). Each experiment included at least three independent measurements per sample. *P* values for each sample combination were calculated using ANOVA and mean values were compared using the Tukey–Kramer test ( $\alpha = 0.05$  (\*) and  $\alpha = 0.01$  (\*\*)).



**Figure 4.** *TrxG* methyltransferase expression profile (A) and distribution levels of H3K4me3 on the promoters of *NPR1*, *WRKY1*, *PR1*, and *R3a*, respectively (B). RT-qPCR gene expression of *CLF* was analyzed in potato leaves (at 1–48 h) after treatment with GSNO, GSH, cPTIO, water, or avr *P. infestans* inoculation, respectively. ChIP-qPCR analyses were performed in potato leaves at selected time points (3–24 h), after treatment with GSNO, GSH, cPTIO, water, or avr *P. infestans* inoculation, respectively. Data are presented as X-fold enrichment [55]. The relative amount of immunoprecipitated chromatin fragments (as determined by real-time PCR) from the above variants of treatment was compared with the reference (arbitrarily set to 1). Each experiment included at least three independent measurements per sample. *P* values for each sample combination were calculated using ANOVA and mean values were compared using the Tukey–Kramer test ( $\alpha = 0.05$  (\*) and  $\alpha = 0.01$  (\*\*)).

#### 2.4. *P. infestans* and GSNO Modify PRMT5 Activity and Expression

Apart from lysine methylation, we attempted to analyze specific histone modifications in the form of symmetric dimethylation at arginine residue R on histone H4 (H4R3sme2) mediated by PRMT5. Interestingly, the *PRMT5* gene expression displayed a similar trend in transcriptional pattern peaking at 6–24 h after GSNO treatment or avr *P. infestans* inoculation (Figure 5A). However, we did not find a direct coincidence between PRMT5 activity and gene expression after both treatments (Figure 5B). The GSNO induced early upregulation (at 3 h) and pathogen elicited later upregulation (at 24 hpi) of PRMT5 activity. Additional controls, such as GSH or cPTIO treatment, caused no significant differences in PRMT5 activity or gene expression in the following hours compared with GSNO.



**Figure 5.** NO-mediated changes in histone arginine methylation *PRMT5* expression (A), *PRMT5* activity (B) distribution levels of H4R3sme2 on the promoter of *NPR1*, *WRKY1*, *PR1*, and *R3a*, respectively (C). RT-qPCR and ELISA tests were performed in potato leaves (at 1–48 h) after treatment with GSNO, GSH, cPTIO, water, or *avr P. infestans* inoculation, respectively. ChIP-qPCR analyses were performed in potato leaves at selected time points (3–24 h), after treatment with GSNO, GSH, cPTIO, water, or *avr P. infestans* inoculation, respectively. Data are presented as X-fold enrichment [55]. The relative amounts of immunoprecipitated chromatin fragments (as determined by real-time PCR) from the above variants of treatment were compared with the reference (arbitrarily set to 1). Each experiment included at least three independent measurements per sample. *P* values for each sample combination were calculated using ANOVA and mean values were compared using the Tukey–Kramer test ( $\alpha = 0.05$  (\*) and  $\alpha = 0.01$  (\*\*)).

### 2.5. *PRMT5* Affects Defense Genes Expression by Transient Deposition of the H4R3sme2 Mark

To further combine *PRMT5* activity with *PRMT5*-mediated histone modification, we analyzed the H4R3sme2 mark level on selected genes. Significant enrichment of H4R3sme2 was found in the promoter region of *WRKY1* (eightfold increase) and *PR1* (fourfold increase) early (3 h) after GSNO treatment (Figure 5C). A similarly enhanced level (approximately twofold increase) of this repressive mark was also observed in the promoter region of the *R3a* and *NPR1* genes after both treatments. Next, the same regions of genes promoter were analyzed at later time points and found that H4R3sme2 levels drastically and temporarily decreased at 6 h. Interestingly, the resurgence of this repressive mark level was observed later (at 24 h), but only after pathogen inoculation.

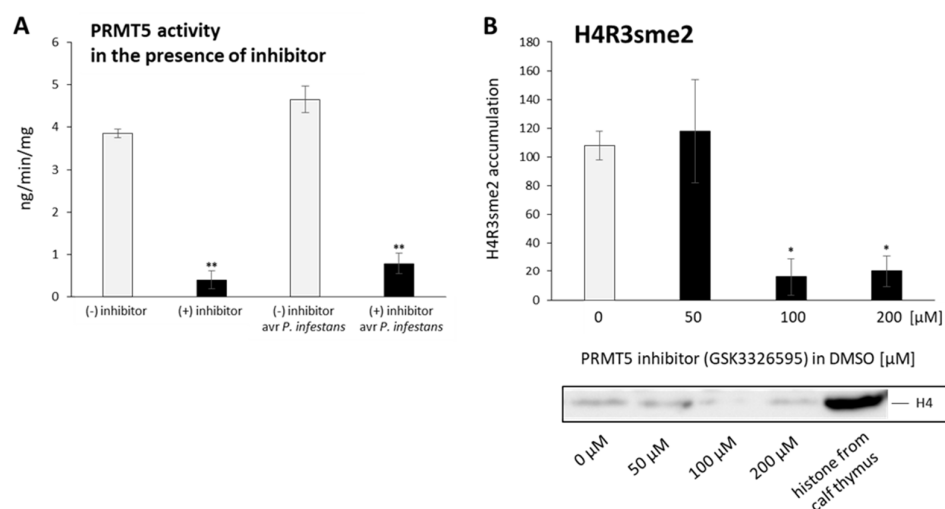
Data indicate that *PRMT5* selectively mediated H4R3sme2 and labeled promoters of stress-responsive genes in a time-dependent manner. The lowering *PRMT5* activity (at 6 h) resulted in the reduced occupancy of repressive H4R3sme2 on the promoter of genes, at the same time point in response to GSNO or the pathogen. In turn, there was a weak association between *PRMT5* activity and *PRMT5* gene expression changes, suggesting a



putative involvement of PRMT5 in other metabolic processes related to potato immunity to *P. infestans*.

### 2.6. PRMT5 Contributes to the Hypersensitive Response of Potato to Avr *P. infestans*

To assess whether PRMT5 activity affects the hypersensitive response (HR)-mediated cell death, we applied the PRMT5 inhibitor (GSK3326595), which effectively reduces PRMT5 activity. Thus far, this novel human therapeutic target used as a potent and reversible inhibitor of enzymatic activity of PRMT5 [56] has never been tested on plants. The ELISA confirmed a drastic decrease in PRMT5 activity under the influence of the PRMT5 inhibitor treatment compared with DMSO, used as the control (Figure 6A). After pathogen inoculation, PRMT5 activity slightly increased. Densitometric analysis of Western blot also revealed that the enzymatic inhibitor of PRMT5 (100 and 200  $\mu\text{M}$ ) provoked an approximately sixfold decline in total histone proteins marked by H4R3sme2 compared with DMSO (Figure 6B).

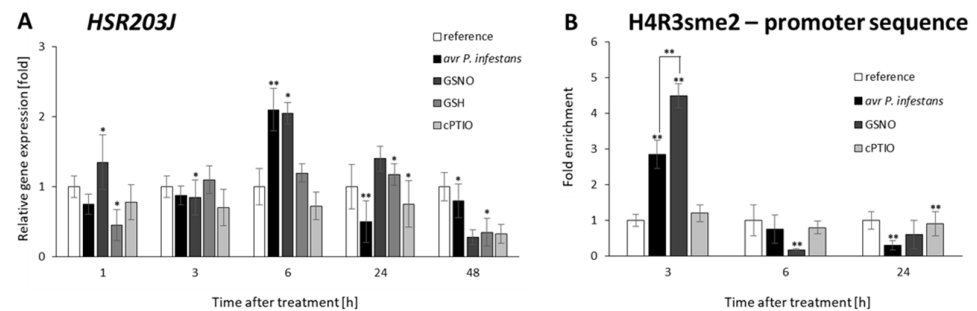


**Figure 6.** PRMT5 inhibitor (GSK3326595) drastically reduces PRMT5 activity (A) and causes a dose-dependent decrease in the total amount of H4R3sme2-marked histone proteins (B). ELISA of PRMT5 histone protein activity was performed using potato leaves after the following separate treatments: DMSO; inhibitor in DMSO; DMSO followed by avr *P. infestans* (6 hpi) or inhibitor in DMSO followed by avr *P. infestans* (6 hpi), respectively. For Western blot analysis, potato leaves were treated with increasing concentrations (50, 100, 200  $\mu\text{M}$ ) of GSK3326595 in DMSO or DMSO as the control. Total histone proteins were probed with H4R3sme2-specific antibodies and H4 histone from the calf thymus as a loading control. Values represent the means of data  $\pm$  SD of at least three independent experiments. Asterisks indicate values that differ significantly from DMSO at  $\alpha < 0.05$  (\*) and  $\alpha < 0.01$  (\*\*).

Given the importance of PRMT5 activity in numerous cellular processes, we focused on its role in cell damage during hypersensitive potato responses to avr. *P. infestans*. Emerging evidence suggests that NO as a signaling compound together with  $\text{H}_2\text{O}_2$  plays a crucial role in HR-mediated cell death during the ETI response to various pathogens [1,6,17].

First, we analyzed the expression of the *HSR203J* gene coding serine hydrolase, which displays an esterase activity. It is well documented that transient intensification of the mRNA transcript accumulation for *HSR203J* is closely associated with the activation of hypersensitive cell death during specific interaction of the *Avr* and *R* genes in *Solanaceae* plants [57,58]. Consistent with these results, we found a solid and time-dependent upregulation of the *HSR203J* gene expression (twofold increase) at 6 h after GSNO exposure or avirulent pathogen inoculation, compared with cPTIO or the healthy leaves, respectively (Figure 7A). Interestingly, the high level (at 3 h) of the repressive H4R3sme2 mark in

the *HSR203J* promoter rapidly decreased at 6 h after NO-donor and pathogen treatment, negatively correlated with enhanced *HSR203J* expression at the same time point (Figure 7B).

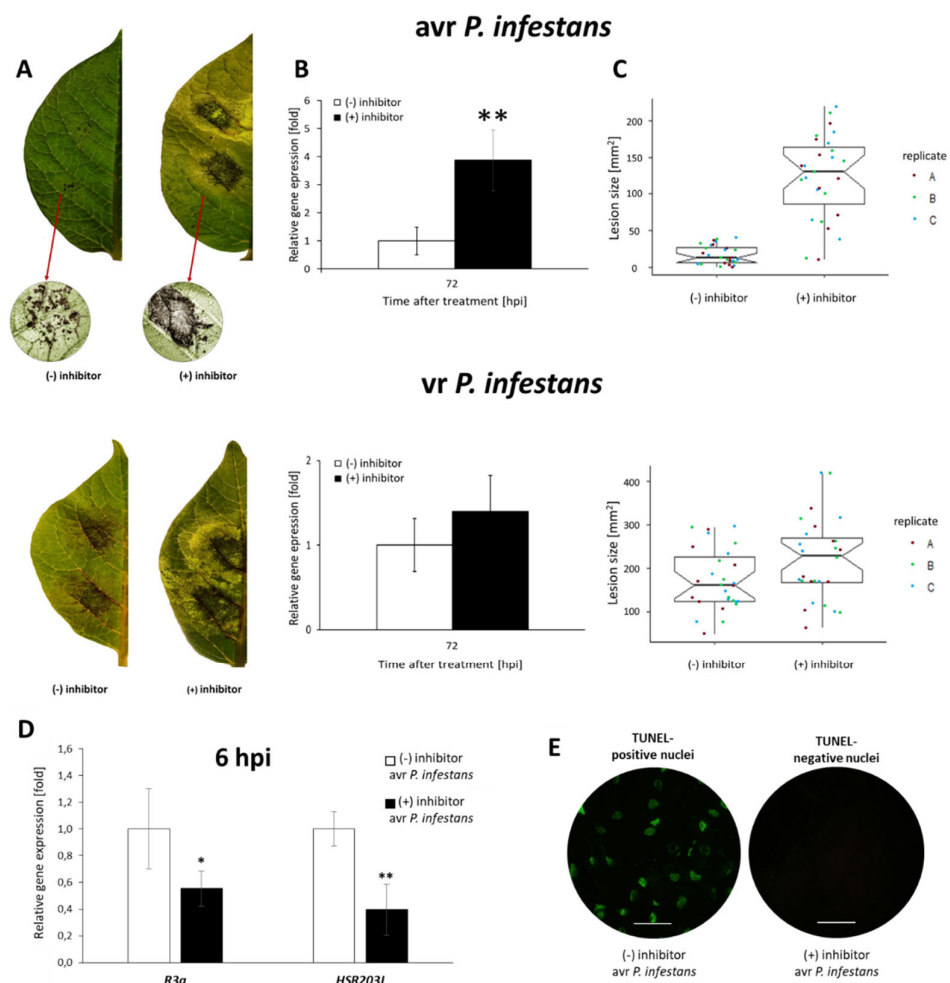


**Figure 7.** Analysis of *HSR203J* (hypersensitive marker) gene expression (A) and time-dependent distribution levels of H4R3sme2 on the promoter of *HSR203J* (B). RT-qPCR gene expression of *CLF* was analyzed in potato leaves (at 1–48 h) after treatment with GSNO, GSH, cPTIO, water, or *avr P. infestans* inoculation, respectively. ChIP-qPCR analyses were performed in potato leaves at selected time points (3–24 h), after treatment with GSNO, GSH, cPTIO, water, or *avr P. infestans* inoculation, respectively. Data are presented as X-fold enrichment [55]. The relative amounts of immunoprecipitated chromatin fragments (as determined by real-time PCR) from the above variants of treatment were compared with the reference (arbitrarily set to 1). Each experiment included at least three independent measurements per sample. *P* values for each sample combination were calculated using ANOVA and mean values were compared using the Tukey–Kramer test ( $\alpha = 0.05$  (\*) and  $\alpha = 0.01$  (\*\*)).

Assessing the engagement of PRMT5 in pathogen-induced cell death, we first verified whether PRMT5 downregulation by an enzymatic inhibitor compound might not only cause changes in the transcription of the *R3a* gene, but also investigated how the functional loss of PRMT5 affects local potato immune responses to the pathogen. Based on the disease index assay in potato leaves representing the percentage of leaf area covered by late blight symptoms, we showed that leaves treated with the PRMT5 inhibitor were more susceptible to damage after *P. infestans* inoculation (Figure 8A–C). Thus, the PRMT5 inhibitor, applied before challenge inoculation, caused rapidly developing and highly diffuse disease lesions, in contrast to topically located HR-type lesions on infected leaves without an inhibitor. Moreover, the pharmacological inhibition of PRMT5 also revealed a more significant progression of disease when potato leaves were challenged with virulent *P. infestans*.

To quantify the pathogen biomass in inoculated potato leaves, the expression of the *P. infestans translation elongation factor 1 $\alpha$*  (*Pitef1*) gene was measured. A fourfold higher level of *Pitef1* transcription at 72 hpi was observed compared with inoculated plants lacking the PRMT5 inhibitor (Figure 8B). This finding revealed that drastic inhibition of PRMT5 activity counteracted the resistance to late blight. Notably, the PRMT5 inhibitor downregulated *R3a* and *HSR203J* genes and abolished PCD, which was confirmed by TUNEL negative assay (Figure 8D,E).

In conclusion, the obtained data support the hypothesis that PRMT5 contributes to late blight resistance. After a pathogen challenge, a transient decrease in the level of PRMT5-mediated H4R3sme2 plays a critical role in regulating defense responses and co-activating programmed cell death.



**Figure 8.** PRMT5 activity is required in potato resistance to *avr P. infestans*. Potato leaf surface (with or without PRMT5 inhibitor) covered by late blight symptoms (A), *Pitef1* gene expression (B) and measurement of lesion size at 72 hpi after challenge inoculation with avirulent or virulent *P. infestans* (MP977) (C). Gene expression of *R3a* and *HSR203J* (D) and TUNEL assay at 6 hpi (E). Categorical scatter plots show lesion diameters of twelve inoculated sites from three biological replicates marked with three colors. Gene expression values represent the means of data  $\pm$  SD of at least three independent experiments, each with at least three biological replicates. Asterisks indicate values that differ significantly from mock-inoculated (water treatment) potato leaves at  $\alpha < 0.05$  (\*) and  $\alpha < 0.01$  (\*\*).

### 3. Discussion

#### 3.1. Biphasic NO Generation Indirect Reprograms Defense Gene Expression

Nitric oxide is a master regulator of plant immunity; however, knowledge on NO engagement in the epigenetic regulation of defense gene expression remains largely uncharacterized. Pathogens can seriously disturb NO homeostasis and elicit NO overproduction, generally known as the NO-burst. It has been well documented that biphasic NO/H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> influences HR [59,60]. Our results confirmed two waves of NO generation in potatoes inoculated with *avr P. infestans*, mediated by nitrate reductase (NR) activity [61]. Along with NO generation, GSNOR activity engaged in controlling the cellular level of NO/SNOs and GSNO content was upregulated early in response to HR-eliciting *P. infestans*. Previously, the linkage between the absence of *AtGSNOR1* and reduced *R* gene-mediated resistance to *PstDC3000* in the *atgsnor1-3* line compared with wild-type *Arabidopsis* was presented by Feechan et al. [62]. In other plants and under stress conditions, it has been demonstrated that GSNOR activity is differentially involved in NO homeostasis and SNOs accumula-

tion [63]. Notably, GSNOR is also present in the cell nucleus compartment, together with GSNO and small nitrosothiols (CysSNO), representing a reservoir and transport form of NO [40,64].

Searching for NO implication in the epigenetic regulation of potato immunity to late blight, we found enrichment of the H3K4me3 mark on the promoter region of *NPR1*, *WRKY1*, *PR1*, and *R3a* after pathogen inoculation, positively correlated in timing to genes expression. In turn, early CLF-mediated H3K27me3 levels did not significantly differ in the promoter of most dedicated genes, except for *WRKY1*. Then, a temporary decrease in H3K27me3 (at 6 h) was observed on the *WRKY1* promoter following pathogen challenge, independently of bivalent chromatin containing H3K4me3 on the same allele, which probably upregulated transcription. H3K4me3 did not preclude the accumulation of H3K27me3 on promoter regions of analyzed genes. The H3K4me3 mark, together with the H3K27me3 on defense-related genes, needs to be tightly balanced for faster inhibition or activation upon pathogen attack. However, it happens that histone modifications associated with specific marker deposition across genomic loci can occur independently of transcriptional activation or repression under stress conditions [65–67]. It was also found by Liu et al. [68] that the high level of H3K27me3 at specific dehydration stress-responding genes did not preclude the accumulation of H3K4me3 when the genes were actively transcribed. Generally, the functional consequence between the histone methylation mark and gene expression is a highly complex event, greatly depending on different combinations of histone PTMs, interactions with enhancers, and other histone modifiers that can coincide in response to NO/SNOs during pathogen attack.

However, our data concerning biphasic kinetics of NO burst and defense genes expression revealed that the rather declining phase and low level of NO might be decisive in facilitating the pathogen-induced upregulation of stress genes.

Several reports have revealed the functional role of NO/SNO from bacteria to mammals in direct or indirect epigenetic NO effects on transcription factors, chromatin remodeling enzymes, and histones [17,41,69,70]. As proven, NO epigenetically regulates histone deacetylase (HDAC) through the selective S-nitrosation or tyrosine nitration of HDACs in animals and plants. S-nitrosation of cysteine residues at binding sites on HDACs was found to inhibit enzyme activities and impair their ability to bind DNA in *Arabidopsis* [45,46]. An intricate crosstalk between NO and HDACs has been widely discussed in terms of different physiological and pathophysiological aspects in animals and humans [71,72]. Plant histone H3 and H4 acetylation by targeting and inhibiting histone deacetylases (HDA6/HDA19 complex) in *Arabidopsis* nuclear extracts and protoplasts exposed to GSNO were presented by Mengel et al. [45]. According to Ageeva-Kieferle et al. [47], GSNOR and HDA6 might maintain a tightly controlled balance between the acetylation/deacetylation states of genes involved in various developmental or stress metabolism processes.

Given the documented data concerning NO links with histone acetylation, the study on NO engagement in methyl-lysine or arginine modifications of target chromatin loci of histones H3/H4 is in its infancy in plants. Similar to histone acetylation, histone methylation is not a permanent modification, and both of these modifications often cooperate or antagonize. Although it has recently been documented by Rudolf et al. [48] that the GSNOR function is also required for balancing the methylation index between the prominent methyl donor, S-adenosylmethionine (SAM), for histone or DNA methylation and S-adenosylhomocysteine (SAH), its byproduct (the SAM/SAH ratio). Finally, the authors postulated that GSNOR1 plays a crucial role in regulating methylation processes and stress-responsive gene expression [48].

In mammals, in contrast to plants, advanced studies have been carried out for many years, providing essential insights on how NO can regulate the transcription of genes by changing global acetylation and methylation levels of histones [69,73–75].

### 3.1.1. NO and PRMT5 Activity Are Required to Integrate the Transcription of Defense Genes

PRMT5 (SKB1) catalyzes H4R3me2 and usually functions in repressing target gene expression; however, its specific regulation under stress conditions remains unclear in plants. The methylation of arginine residues governed by PRMT5 is less stable than the methylation of lysine PTMs, with a half-life ranging from several hours to days [69]. According to Fan et al. [33], PRMT5/SKB1 lays down H4R3me2, a repressive mark, playing a role in sensing environmental cues. The genome-wide analysis of wild-type and *prmt5* mutants did not support the idea that PRMT5 specifically acts as a transcriptional repressor, as previously suggested based on the analysis of several genes [76]. The authors found that 2604 genes were over-expressed and 3075 were under-expressed in *prmt5* mutants under non-stress conditions as compared with wild-type *Arabidopsis*.

Our results indicate that in response to the pathogen, lowering PRMT5 activity (at 6 hpi) was correlated with the declining level of H4R3me2 on the defense gene promoter, which enhanced the transcription of these genes. Notably, a decreased level of the repressive H4R3me2 mark occurred concurrently with an increased level of active H3K4me3 marks on the same promoter regions, revealing crosstalk between lysine and arginine methyltransferases. The biphasic NO production shifted down at 6 hpi was probably decisive for switchable changes in histone marks on the defense gene promoters.

Data presented by Hu et al. [37] documented that NO positively regulates PRMT5 activity by S-nitrosation at Cys-125 in response to salt stress. The *gsnor1-3* mutant, with significantly higher levels of GSNO and S-nitrosothiols, was more resistant to stress than wild-type *Arabidopsis*. The authors observed no changes in the level of H4R3me2 in total protein extracts under NaCl conditions, and linked stress-induced PRMT5 activity with the pre-mRNA splicing machinery associated with stress-related genes.

Generally, prior studies have revealed that under salt stress or ABA treatment, a high H4R3me2 level decreased due to PRMT5/SKB1 disassociating from chromatin, induced the expression of *FLC* with stress-responsive genes, and improved the efficiency of the pre-mRNA splicing process [32]. In turn, when plants were subjected to low temperature (vernalization) or short/long days, the levels of H4R3me2 associated with the chromatin of *FLOWERING LOCUS C (FLC)* increased or decreased, depending on the treatment affecting the flowering program [29,30].

Moreover, it was previously documented that PRMT5/SKB1-mediated H4R3me2 on the promoter of the *Ib* subgroup *bHLH* transcription factor genes could be involved in the regulation of iron homeostasis in *Arabidopsis* [33]. Under iron deficiency conditions, the level of H4R3me2 associated with *bHLH* decreased, resulting in the reduced transcriptional repression of genes and enhanced iron uptake.

It is known that NO plays a crucial role in iron homeostasis in plants [32]. Apart from NO engagement in regulating genes related to iron acquisition, NO reacts with iron-producing dinitrosyl iron complexes (DNICs). In animals, it is well documented that DNICs can indirectly inhibit the Jumonji C (JMJC) domain-containing histone demethylases. NO can also directly inhibit the catalytic activities of these enzymes by binding to the non-heme iron in the catalytic pocket. Thus, it was found by Hickok et al. [77] that human JMJC domain-containing histone demethylase KDM3A was highly sensitive to inhibition by NO.

There is no doubt that a peculiar crosstalk between methyltransferases/demethylases modifying histone patterns exists under stress conditions; however, there is no information on NO engagement in inhibiting JMJC domain-containing histone demethylases in plants. It was proposed that GSNO reductase (GSNOR) activity regulating the intracellular level of NO indirectly contributes to demethylation processes in *Arabidopsis* [48]. This finding aligns with our result, suggesting that GSNOR might control the NO level during biotic stress and indirectly affects histone methylation in orchestrating defense responses in potato.

Recently, intriguing evidence has been presented, indicating that NO modulates the selective autophagic degradation of GSNOR1 by S-nitrosation at Cys-10 and positively regulates responses under hypoxia [15].

### 3.1.2. NO Cooperates with PRMT5 in the Regulation of Hypersensitive Cell Death and Potato Resistance to Late Blight

AtPRMT5 has been found to play an essential role in regulating plant vegetative growth, flowering time, and various other cellular and biological processes, including apoptosis [28,29,31,32,34,37,78,79]. One of the most typical features of ETI response is the rapid dying of host plant cells at the site of infection within hours following pathogen contact; this process of programmed cell death is known as the hypersensitive response [80]. Our data revealed that the pharmacological inhibitor of PRMT5 downregulated *R3a* gene expression and abolished HR-type resistance, evidenced by TUNEL negative assay.

Moreover, the *HSR203J* gene, as an HR marker, was activated at the same time points after GSNO or avr *P. infestans* inoculation. Initially, the PRMT5-mediated high level of H4R3sme2 on the promoter of *HSR203J* drastically decreased, correlated with upregulation of the *HSR203J* transcript and triggering cell death.

The *hsr203j* gene is a valuable marker of HR mediated by *R/avr* genes activated in tomato against *Cladosporium fulvum* (*Cf-9/avr9*), tobacco against *Ralstonia solanacearum*, and in similar processes in other members of *Solanaceae* [57]. Significantly, *hsr203j* is not expressed during leaf senescence, and four W boxes with MYB binding sites have been identified in the enhancer region of the *HSR203J* promoter [58]. It remains unclear whether PRMT5-mediated H4R3sme2 directly regulates the transcriptional activity of *HSR203J* in response to cell death provoked by an avirulent pathogen. *HSR203J* might be the target for *WRKY1* or other transcription factors recognizing the W-box present in the promoter of various pathogen-related genes involved in defense responses. Our findings suggest a causal link between *WRKY1* and *HSR203J* in response to avr *P. infestans*.

Moreover, it was previously documented that *StWRKY1* participates in other defense pathways, including regulating phenylpropanoid metabolite gene expression, strengthening the secondary cell wall, and enhancing potato resistance to *P. infestans* [81,82]. Modifying the host cell wall to the plasma membrane continuum is critical for sensing and inducing several interlinked and independent defense signaling compounds, e.g., ROS/NO burst and cell death [83].

Previously Li et al. [34] suggested that *PRMT5/SKB1*-deficient root stem cells of the *skb1* mutant were more sensitive to DNA damage caused by a genotoxic agent (methyl methanesulfonate, MMS). Numerous animal studies have suggested that the dysregulation of H4R3sme2 through downregulation of the PRMT5 protein level modifies the expression of target genes essential in cancer survival [84] and can selectively diversify the proteome via alternative splicing [85].

Many targets of PRMT5 in living cells have been identified until now. PRMT5/SKB1 might interact with different transcription factors and chromatin-modifying enzymes and mediates the methylation of nuclear proteins functioning as a co-repressor and co-activator during differentiation or apoptosis [79,86–90].

In conclusion, our findings postulate that biphasic NO production, downregulated by GSNOR activity, is required to reprogram the transcriptional network of defense genes. A decreased level of the repressive H4R3sme2 mark occurred (at 6 hpi) concurrently with an increased level of the active H3K4me3 mark on the same promoter regions, revealing crosstalk between lysine and arginine methyltransferases. A time-dependent reduction in the level of PRMT5-mediated H4R3sme2 on the *R3a* and *HSR203J* promoters enhanced their expression and triggered HR-type resistance to avr *P. infestans*. Future studies should be performed to gain greater insight into the epigenetic mechanism influencing pre-mRNA splicing machinery, by which PRMT5 regulates cell death in potato exposed to avr *P. infestans*.

## 4. Materials and Methods

### 4.1. Plant Material

All experiments were conducted on potato plant *Solanum tuberosum* L. cultivar Sarpo Mira (carrying the R genes: *R3a*, *R3b*, *R4*, *Rpi-Smira1*, and *Rpi-Smira2*), which is highly resistant to avr *P. infestans*. In vitro potato seedlings came from the Potato Genebank (Plant

Breeding and Acclimatization Institute IHAR-PIB, Bonin, Poland). Plants propagated from *in vitro* nodal cuttings were grown for 4 weeks in sterile MS medium (Duchefa Biochemie B.V. Haarlem, The Netherlands) containing 2% (*w/v*) sucrose and 10% agar. Afterwards, plants were transplanted to sterile soil (universal substrate consisting of natural peat, WOKAS SA, Łosice, Poland) and grown to the leaf stage in a phytochamber with 16 h of light ( $180 \mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$ ), FLUORA L18W/77, and L58W/77, OSRAM, Germany) at  $18 \pm 2 \text{ }^\circ\text{C}$  and 60% humidity.

#### 4.2. Pathogen Culture and Inoculation

The avr *Phytophthora infestans* Mont. de Bary isolate MP946 (A1 mating type, race 1.3.4.7.10.11) was kindly supplied by the Plant Breeding and Acclimatization Institute collection Research Division in Młochów, Poland. The pathogen grew for 3 weeks on a pea medium, and was subsequently passaged through tubers at least twice. Inoculated slices of tubers were incubated for 7–14 days at  $16 \text{ }^\circ\text{C}$  in the dark. The sporangia of *P. infestans* were obtained by collecting the aerial mycelium, rinsed with cold distilled water, passed through a sterile sieve, and adjusted to a concentration of  $2.5 \times 10^5$  sporangia per 1 mL using a hemocytometer. Then, the sporangia were incubated at  $4 \text{ }^\circ\text{C}$  for 1 h to release the zoospores. Potato plants were inoculated by spraying leaves with a zoospore suspension and kept overnight at  $18 \text{ }^\circ\text{C}$  and 90% humidity on moist blotting paper in a plastic box covered with glass. Afterward, inoculated and control leaves were sprayed with distilled water and transferred to a phytochamber. Samples were collected at 3, 6, 24, and 48 h post-inoculation (hpi).

#### 4.3. Molecular Quantification of Pathogen

The *P. infestans* translation elongation factor  $1\alpha$  (*Pitef1*) gene was expressed in inoculated potato leaves, as confirmed by RT-qPCR analysis. The level of *Pitef1* transcription was calculated for *18sRNA* and *ef1 $\alpha$*  gene expression [91].

#### 4.4. Assessment of Disease Development

For the point inoculation experiment, 20  $\mu\text{L}$  drops of the zoospore suspension were applied on the abaxial leaf surface, and leaves were kept at 100% humidity in a growth chamber. Lesion diameters ( $\text{mm}^2$ ) of 12 infection sites from 3 independent biological replicates on potato leaves were measured at 72 hpi using the Adobe PHOTOSHOP CS5 (12.0) program. The mean area of a diseased spot was calculated to the area of transferred inoculum droplets.

#### 4.5. NO Donor and Scavenger Treatment

The third or fourth compound leaves from the base of intact plants were treated by spraying with 250  $\mu\text{M}$  GSNO (Sigma–Aldrich), then closed in an air-tight plastic chamber and exposed to light. To evaluate the effect of NO elimination in GSNO-treated potato, the leaves were also treated with a specific NO scavenger, cPTIO (Sigma–Aldrich), at 200  $\mu\text{M}$ . Moreover, 250  $\mu\text{M}$  of GSH (Sigma–Aldrich) was applied as a reducing compound in contrast to oxidizing GSNO under physiological conditions. GSH possesses a similar structure to GSNO, but cannot generate NO. The leaves were treated by spraying with 5 mL of the solution. Samples were collected at 3, 6, 24, and 48 h after treatment.

#### 4.6. PRMT5 Inhibitor Treatment

GSK3326595 (MedChemExpress, HY-101563) is a potent, reversible inhibitor of protein arginine N-methyltransferase. Leaves were sprayed with 5 mL GSK3326595 (50, 100, or 200  $\mu\text{M}$ ) in 1% DMSO, or with an equal volume of 1% DMSO as the control. After 12 h of incubation, leaves were dried and inoculated with avr *P. infestans* as described above. Samples were collected at 3 h and 6 h after inoculation.

#### 4.7. NO Detection and Quantification by the Electrochemical Method

Electrochemical monitoring of NO emissions from 250  $\mu\text{M}$  GSNO under continuous illumination intensity ( $180 \mu\text{mol photons m}^{-2} \text{s}^{-1}$ ; starting temperature  $20 \text{ }^\circ\text{C}$ ; final temperature  $26 \text{ }^\circ\text{C}$ ) was performed as described previously by Floryszak-Wieczorek et al. [54].

#### 4.8. Measurement of Nitric Oxide Generation

Nitric oxide generation was quantitatively measured using DAF-2DA (Calbiochem). Potato leaf samples (0.1 g) were incubated in the dark for 1 h at  $25 \text{ }^\circ\text{C}$  in a mixture containing 10  $\mu\text{M}$  DAF-2DA in 10 mM Tris-HCl buffer (pH 7.2). After incubation, the probes were transferred into 24-well plates (1 mL per well). Fluorescence in the reaction was measured using a spectrofluorometer (Fluorescence Spectrometer Perkin Elmer LS50B, United Kingdom) at 495 nm excitation and 515 nm emission filters. Fluorescence was expressed as arbitrary fluorescence units.

#### 4.9. S-Nitrosoglutathione Reductase [EC 1.2.1.46]

The GSNOR activity was assayed according to the procedure proposed by Barroso et al. [92], with modifications as described by Janus et al. [93]. Fresh leaves (0.5 g) were homogenized in 0.1 M Tris-HCl buffer, pH 7.5 (1:4 *w/v*) containing 0.2% Triton X-100 (*v/v*), 10% glycerol (*v/v*), 0.1 mM EDTA, 2 mM DTT at  $4 \text{ }^\circ\text{C}$  and centrifuged at  $27,000 \times g$  for 25 min. The supernatant was passed through Sephadex G-25 gel filtration columns (Illustra NAP-10, GE Healthcare), then immediately through Amicon Ultra 3 K Filters (Millipore) and served as the enzyme extract. The 1 mL assay reaction mixture contained 0.5 mM EDTA, 0.2 mM NADH, 0.4 mM GSNO and 30  $\mu\text{L}$  enzyme extract in 25 mM Tris-HCl buffer, pH 8.0. The reaction was held at  $25 \text{ }^\circ\text{C}$  and initiated with NO (Sigma Aldrich). NADH oxidation was determined at 340 nm, and rates of NADH consumed per minute were calculated using an extinction coefficient of  $6220 \text{ M}^{-1} \times \text{cm}^{-1}$ .

#### 4.10. TUNEL Assay

The TUNEL assay measures DNA fragmentation using the terminal deoxynucleotidyl transferase (TdT)-mediated deoxyuridine triphosphate (dUTP) nick end labeling method, which involves the TdT-mediated addition of fluorescein-12-dUTP to the 3' OH ends of fragmented DNA. The samples were studied using a TUNEL fluorescein kit (Roche; United States), in accordance with Floryszak-Wieczorek and Arasimowicz-Jelonek [94], and examined using a fluorescence microscope (AxioStar plus, Carl Zeiss, Germany) equipped with a digital camera, with excitation at 488 nm and emission at 515 nm. Experiments were repeated four times with ten slides per treatment. A region of 100 cells from at least 5 randomly selected slices in each treatment was counted and statistically analyzed.

#### 4.11. Gene Expression Analysis

Potato leaves were frozen in liquid nitrogen and stored at  $-80 \text{ }^\circ\text{C}$  before use. RNA was isolated from frozen leaf tissue (150 mg) with TriReagent (Sigma, USA). The obtained RNA was then purified using a deoxyribonuclease kit (Sigma, USA). Reverse transcription of 1  $\mu\text{g}$  of RNA for each experimental variant was performed using a reverse transcription kit (Thermo Fisher Scientific, USA). RT-qPCR analysis was performed on a PikoReal Thermocycler (Thermo Fisher Scientific, USA) under the following conditions: 10 min at  $95 \text{ }^\circ\text{C}$ , followed by 45 cycles of 12 s at  $95 \text{ }^\circ\text{C}$ , 30 s at the annealing temperature for each specific primer (Supplementary Tables S1 and S2) and 30 s at  $72 \text{ }^\circ\text{C}$ . The reaction mixture contained 0.1  $\mu\text{M}$  of each primer, 1  $\mu\text{L}$  of  $5 \times$  diluted cDNA, 10  $\mu\text{L}$  of the Power SYBR Green PCR Master Mix (Applied Biosystems, USA) and DEPC-treated water to a total volume of 20  $\mu\text{L}$ . Primers for the studied genes were designed using the Primer-blast program available from the NCBI (National Center of Biotechnology Information, USA) and PGSC (Potato Genome Sequencing Consortium) databases. The primers designed and used in this study are listed in Supplementary Table S1. The obtained data were normalized to elongation factors *ef1 $\alpha$*  (AB061263) and *18S rRNA* (X67238). Ct values were determined using the



Real-time PCR Miner [95], and relative gene expression was calculated using efficiency corrected computational models proposed by Pfaffl [96] and Tichopad et al. [97].

#### 4.12. Chromatin Immunoprecipitation Assay

The chromatin immunoprecipitation assay (ChIP) was carried out as described by Haring et al. [98] and Komar et al. [55]: 2 g of potato leaves was cross-linked by vacuum infiltration in a crosslinking buffer with 1% formaldehyde and then frozen at  $-80^{\circ}\text{C}$ . The next step was chromatin isolation, performed according to an existing protocol [98], with some modifications. Samples were ground in liquid nitrogen, resuspended, and incubated in nuclei isolation buffer, and after centrifugation, resuspended in nuclei lysis buffer. Then, the samples were sonicated on ice for  $30 \times 30$  s at 30% of power until DNA fragments of 250–750 nt were obtained. After sonication, an input sample (50–100  $\mu\text{L}$ ) was collected from the solution to check the quality of the sample on an agarose gel. The remaining solution was separated into the test sample (to which the antibody of interest was added: H3K4me3 (EMD Millipore; cat.-no. 07-473), H3K27me3 (EMD Millipore; cat.-no. 07-449), or H4R3me2 (Abcam; cat.-no. ab5823) and the control sample (to which IgG was added). The next day, 30  $\mu\text{L}$  of magnetic beads (PureProteome Protein A/G Mix, Millipore) was added, and the samples were incubated for at least 2 h. After incubation, the samples were washed and decrosslinked overnight with 300 mM NaCl and 1% SDS at  $65^{\circ}\text{C}$  with shaking. The next step consisted of incubating probes with proteinase K (20 mg/mL) to digest proteins. Then, the samples were subjected to DNA isolation with a phenol/chloroform/isoamyl alcohol mixture (25:24:1). The last step was to check the number of binding sites in the immunoprecipitated DNA using the RT-qPCR method. The reaction mixture contained 0.1  $\mu\text{M}$  of each primer, 2–5  $\mu\text{L}$  of purified DNA, 10  $\mu\text{L}$  of Power SYBR Green PCR Master Mix (Applied Biosystems), and DEPC-treated water, to a total volume of 20  $\mu\text{L}$ . The specificity of the reaction was confirmed by the presence of one peak in the melting curve analysis. Primers for the genes of interest (*NPR1*, *WRKY1*, *PR1*, *R3a*, and *HSR203J*) were designed with Primer3 Output Software (Supplementary Table S2). Data were analyzed by the fold enrichment method [99]. For this purpose, the raw Ct value of each sample was subtracted from the raw Ct value of the control (IgG) corresponding to that sample ( $\Delta\text{Ct} = \text{Ct}_{(\text{sample})} - \text{Ct}_{(\text{control, IgG})}$ ). The enrichment was calculated using the following formula: Fold enrichment =  $2^{-\Delta\text{Ct}}$ .

Samples were taken at 3, 6, and 24 h after treatment with GSH (250  $\mu\text{M}$ ), GSNO (250  $\mu\text{M}$ ), and cPTIO (200  $\mu\text{M}$ ) and after avr *P. infestans* inoculation. The relative amounts of immunoprecipitated chromatin fragments (as determined by real-time PCR) from the above treatment variants were compared with the reference (arbitrarily set to 1). The reference (leaves sprayed with water) was taken at each time point.

Each experiment included at least three independent measurements per sample. The *P* values for each sample combination were calculated using ANOVA. The Tukey–Kramer test was used to compare the mean values ( $\alpha = 0.05$  (\*), and  $\alpha = 0.01$  (\*\*)).

#### 4.13. ELISA Test for PRMT5 Activity

The level of PRMT5 activity was determined using an Epigenase<sup>TM</sup> PRMT5 Methyltransferase (Type II-Specific) Activity/Inhibition Assay Kit (Epigentek). Standard curves were generated using standards supplied by the manufacturer (H4R3), with a linear detection range of 0.1–2 ng of the methylated product. Input materials used in this procedure were nuclear extracts of 10  $\mu\text{g}$ . Absorbance was measured using a Tecan Infinite M50 plate reader (ThermoFisher Scientific) at 450 nm (with the reference wavelength of 655 nm).

#### 4.14. Histone-Enriched Protein Isolation

Histone-enriched protein was isolated from *S. tuberosum* ‘Sarpo Mira’ leaves, as described by Moehs et al. [100]. Namely, 1 g of leaves was homogenized in 7 mL of the homogenization buffer containing 10 mM Tris HCl pH 8.0, 0.4 M sucrose, 10 mM  $\text{MgCl}_2$ , 20 mM  $\beta$ -mercaptoethanol, 0.1 mM phenylmethylsulphonyl fluoride (PMSF). Homogenate

was filtered through four layers of miracloth and centrifuged at  $9300\times g$  for 10 min at  $2\text{ }^{\circ}\text{C}$ . The protein pellet was resuspended in 7 mL of the homogenization buffer enriched in 1% Triton X-100 and centrifuged at  $9300\times g$  for 10 min at  $2\text{ }^{\circ}\text{C}$ . The protein pellet was then resuspended in 5 mL of 0.4 M  $\text{H}_2\text{SO}_4$ , and overnight extraction at  $4\text{ }^{\circ}\text{C}$  (shaking) was performed. The extract was centrifuged at  $30,400\times g$  for 30 min at  $2\text{ }^{\circ}\text{C}$ , and histone-enriched protein was precipitated from the supernatant by adding 3.5 volumes of acetone and overnight incubation at  $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$ . The protein was pelleted at  $32,100\times g$  for 30 min at  $2\text{ }^{\circ}\text{C}$ , dried, and dissolved in 0.2 mL of the buffer containing 0.01 M HCl, 8 M urea, and 0.5 M  $\beta$ -mercaptoethanol. The protein concentration was measured by the Bradford assay [101].

#### 4.15. Immunoblot Analysis

Equal amounts (5  $\mu\text{g}$ ) of histone-enriched protein were separated by standard SDS-PAGE in 15% polyacrylamide gels, and electrotransferred on a PVDF membrane immunostained with antibodies against H4 symmetric dimethyl Arg 3 (Abcam; catalog number ab5823) applied in a concentration of 0.5  $\mu\text{g}/\text{mL}$ . According to standard procedures, signals were visualized using the chemiluminescence method and quantified using Image Lab<sup>TM</sup> software (Bio-Rad). Statistical significance of the differences in signal intensity was analyzed using the Student's *t*-test at  $\alpha < 0.05$  (\*) and  $\alpha < 0.01$  (\*\*).

#### 4.16. Statistical Analysis

All the experiments included three independent experiments in at least three replications. For each experiment, the means of the obtained values were calculated along with standard deviations. Analysis of variance was conducted, and the least significant differences (LSDs) between means were determined using Tukey's test at the levels of significance  $\alpha = 0.05$  (\*), and 0.01 (\*\*). Statistical analyses were performed using Microsoft Excel 2016 and R statistical software (version 4.1.2).

**Supplementary Materials:** The following supporting information can be downloaded at: <https://www.mdpi.com/article/10.3390/ijms23074051/s1>.

**Author Contributions:** Conceptualization, J.F.-W. and M.A.-J.; all plant and pathogen experiments, collection and data analysis of gene expression, A.D.; ChIP analysis and potato in vitro culture, B.K.; Western blot analysis, P.J.; participation in statistical analyses, D.K.; participation in *R3a* gene expression, Y.G.; writing—original draft preparation, J.F.-W.; writing—review and editing, J.F.-W. and M.A.-J. All authors have read and agreed to the published version of the manuscript.

**Funding:** This research was funded by the Polish National Science Centre; project NCN No. 2017/25/B/NZ9/00905; The publication was co-financed within the framework of the Polish Ministry of Science and Higher Education's program: "Regional Initiative Excellence" in the years 2019–2022 (No. 005/RID/2018/19).

**Institutional Review Board Statement:** Not applicable.

**Informed Consent Statement:** Not applicable.

**Data Availability Statement:** Not applicable.

**Conflicts of Interest:** The authors declare no conflict of interest.

#### Abbreviations

CLF	curly leaf
cPTIO	carboxy-PTIO
DNICs	dinitrosyl-iron complexes
ETI	effector-triggered immunity
GSH	glutathione
GSK3326595	inhibitor of protein arginine N-methyltransferase

GSNO	S-nitrosoglutathione
GSNOR	S-nitrosoglutathione reductase
H4R3me2	symmetric dimethyl methylation at the arginine residue on histone H4
H3K27me3	trimethylation of histone H3 lysine 27
H3K4me3	trimethylation of histone H3 lysine 4
HDACs	histone deacetylases
HMTs	methyltransferases
HR	hypersensitive response
KDMs	lysine demethylases
NR	nitrate reductase
NO	nitric oxide
ONOO <sup>−</sup>	peroxynitrite
PAMP	pathogen-associated molecular pattern
PR	pathogenesis-related proteins
PRC	polycomb repressor complex
PRMT5	protein arginine symmetric methyl transferase 5
PTI	PAMP-triggered immunity
PTMs	post-translational protein modifications
RdDM	RNA-directed DNA methylation
ROS	reactive oxygen species
siRNA	small non-coding interfering RNA
SKB1	kinase binding protein 1
TrxG	trithorax

## References

- Mur, L.A.J.; Carver, T.L.W.; Prats, E. NO Way to Live; the Various Roles of Nitric Oxide in Plant–Pathogen Interactions. *J. Exp. Bot.* **2006**, *57*, 489–505. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
- Trapet, P.; Kulik, A.; Lamotte, O.; Jeandroz, S.; Bourque, S.; Nicolas-Francès, V.; Rosnoblet, C.; Besson-Bard, A.; Wendehenne, D. NO Signaling in Plant Immunity: A Tale of Messengers. *Phytochemistry* **2015**, *112*, 72–79. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
- Delledonne, M.; Xia, Y.; Dixon, R.A.; Lamb, C. Nitric Oxide Functions as a Signal in Plant Disease Resistance. *Nature* **1998**, *394*, 585–588. [[CrossRef](#)]
- Foissner, I.; Wendehenne, D.; Langebartels, C.; Durner, J. In Vivo Imaging of an Elicitor-Induced Nitric Oxide Burst in Tobacco. *Plant J.* **2000**, *23*, 817–824. [[CrossRef](#)]
- Tada, Y.; Mori, T.; Shinogi, T.; Yao, N.; Takahashi, S.; Betsuyaku, S.; Sakamoto, M.; Park, P.; Nakayashiki, H.; Tosa, Y.; et al. Nitric Oxide and Reactive Oxygen Species Do Not Elicit Hypersensitive Cell Death but Induce Apoptosis in the Adjacent Cells During the Defense Response of Oat. *Mol. Plant. Microbe Interact.* **2004**, *17*, 245–253. [[CrossRef](#)]
- Floryszak-Wieczorek, J.; Arasimowicz, M.; Milczarek, G.; Jelen, H.; Jackowiak, H. Only an Early Nitric Oxide Burst and the Following Wave of Secondary Nitric Oxide Generation Enhanced Effective Defence Responses of Pelargonium to a Necrotrophic Pathogen. *New Phytol.* **2007**, *175*, 718–730. [[CrossRef](#)]
- Asai, S.; Ohta, K.; Yoshioka, H. MAPK Signaling Regulates Nitric Oxide and NADPH Oxidase-Dependent Oxidative Bursts in *Nicotiana Benthamiana*. *Plant Cell* **2008**, *20*, 1390–1406. [[CrossRef](#)]
- Wendehenne, D.; Gao, Q.-M.; Kachroo, A.; Kachroo, P. Free Radical-Mediated Systemic Immunity in Plants. *Curr. Opin. Plant Biol.* **2014**, *20*, 127–134. [[CrossRef](#)]
- Arasimowicz-Jelonek, M.; Floryszak-Wieczorek, J. Understanding the Fate of Peroxynitrite in Plant Cells—From Physiology to Pathophysiology. *Phytochemistry* **2011**, *72*, 681–688. [[CrossRef](#)]
- Chaki, M.; Valderrama, R.; Fernández-Ocaña, A.M.; Carreras, A.; Gómez-Rodríguez, M.V.; López-Jaramillo, J.; Begara-Morales, J.C.; Sánchez-Calvo, B.; Luque, F.; Leterrier, M.; et al. High Temperature Triggers the Metabolism of S-Nitrosothiols in Sunflower Mediating a Process of Nitrosative Stress Which Provokes the Inhibition of Ferredoxin–NADP Reductase by Tyrosine Nitration. *Plant Cell Environ.* **2011**, *34*, 1803–1818. [[CrossRef](#)]
- Corpas, F.; Palma, J.; del Río, L.; Barroso, J. Protein Tyrosine Nitration in Higher Plants Grown under Natural and Stress Conditions. *Front. Plant Sci.* **2013**, *4*, 29. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
- Mata-Pérez, C.; Begara-Morales, J.C.; Chaki, M.; Sánchez-Calvo, B.; Valderrama, R.; Padilla, M.N.; Corpas, F.J.; Barroso, J.B. Protein Tyrosine Nitration during Development and Abiotic Stress Response in Plants. *Front. Plant Sci.* **2016**, *7*, 1699. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
- Izbińska, K.; Floryszak-Wieczorek, J.; Gajewska, J.; Meller, B.; Kuźnicki, D.; Arasimowicz-Jelonek, M. RNA and mRNA Nitration as a Novel Metabolic Link in Potato Immune Response to *Phytophthora Infestans*. *Front. Plant Sci.* **2018**, *9*, 672. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]

14. Romero-Puertas, M.C.; Laxa, M.; Mattè, A.; Zaninotto, F.; Finkemeier, I.; Jones, A.M.E.; Perazzolli, M.; Vandelle, E.; Dietz, K.-J.; Delledonne, M. S-Nitrosylation of Peroxiredoxin II E Promotes Peroxynitrite-Mediated Tyrosine Nitration. *Plant Cell* **2007**, *19*, 4120–4130. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
15. Zhan, N.; Wang, C.; Chen, L.; Yang, H.; Feng, J.; Gong, X.; Ren, B.; Wu, R.; Mu, J.; Li, Y.; et al. S-Nitrosylation Targets GSNO Reductase for Selective Autophagy during Hypoxia Responses in Plants. *Mol. Cell* **2018**, *71*, 142–154. [[CrossRef](#)]
16. Feng, J.; Chen, L.; Zuo, J. Protein S-Nitrosylation in Plants: Current Progresses and Challenges. *J. Integr. Plant Biol.* **2019**, *61*, 1206–1223. [[CrossRef](#)]
17. Falak, N.; Imran, Q.M.; Hussain, A.; Yun, B.-W. Transcription Factors as the “Blitzkrieg” of Plant Defense: A Pragmatic View of Nitric Oxide’s Role in Gene Regulation. *Int. J. Mol. Sci.* **2021**, *22*, 522. [[CrossRef](#)]
18. Shumaev, K.B.; Kosmachevskaya, O.V.; Chumikina, L.V.; Topunov, A.F. Dinitrosyl Iron Complexes and Other Physiological Metabolites of Nitric Oxide: Multifarious Role in Plants. *Nat. Prod. Commun.* **2016**, *11*, 1189–1192. [[CrossRef](#)]
19. Srikant, T.; Drost, H.-G. How Stress Facilitates Phenotypic Innovation Through Epigenetic Diversity. *Front. Plant Sci.* **2021**, *11*, 606800. [[CrossRef](#)]
20. Pikaard, C.S.; Scheid, O.M. Epigenetic Regulation in Plants. *Cold Spring Harb. Perspect. Biol.* **2014**, *6*, a019315. [[CrossRef](#)]
21. Santos, A.P.; Ferreira, L.J.; Oliveira, M.M. Concerted Flexibility of Chromatin Structure, Methylation, and Histone Modifications along with Plant Stress Responses. *Biology* **2017**, *6*, 3. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
22. Alvarez, M.E.; Nota, F.; Cambiagno, D.A. Epigenetic Control of Plant Immunity. *Mol. Plant Pathol.* **2010**, *11*, 563–576. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
23. Lafos, M.; Kroll, P.; Hohenstatt, M.L.; Thorpe, F.L.; Clarenz, O.; Schubert, D. Dynamic Regulation of H3K27 Trimethylation during *Arabidopsis* Differentiation. *PLOS Genet.* **2011**, *7*, e1002040. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
24. Pu, L.; Sung, Z.R. PcG and TrxG in Plants—Friends or Foes. *Trends Genet.* **2015**, *31*, 252–262. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
25. Zhou, H.; Liu, Y.; Liang, Y.; Zhou, D.; Li, S.; Lin, S.; Dong, H.; Huang, L. The Function of Histone Lysine Methylation Related SET Domain Group Proteins in Plants. *Protein Sci.* **2020**, *29*, 1120–1137. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
26. Bedford, M.T.; Richard, S. Arginine Methylation: An Emerging Regulator of Protein Function. *Mol. Cell* **2005**, *18*, 263–272. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
27. Wysocka, J.; Allis, C.D.; Coonrod, S. Histone Arginine Methylation and Its Dynamic Regulation. *Front. Biosci.* **2006**, *11*, 344–355. [[CrossRef](#)]
28. Pei, Y.; Niu, L.; Lu, F.; Liu, C.; Zhai, J.; Kong, X.; Cao, X. Mutations in the Type II Protein Arginine Methyltransferase AtPRMT5 Result in Pleiotropic Developmental Defects in *Arabidopsis*. *Plant Physiol.* **2007**, *144*, 1913–1923. [[CrossRef](#)]
29. Wang, X.; Zhang, Y.; Ma, Q.; Zhang, Z.; Xue, Y.; Bao, S.; Chong, K. SKB1-Mediated Symmetric Dimethylation of Histone H4R3 Controls Flowering Time in *Arabidopsis*. *EMBO J.* **2007**, *26*, 1934–1941. [[CrossRef](#)]
30. Schmitz, R.J.; Sung, S.; Amasino, R.M. Histone Arginine Methylation Is Required for Vernalization-Induced Epigenetic Silencing of FLC in Winter-Annual *Arabidopsis Thaliana*. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **2008**, *105*, 411–416. [[CrossRef](#)]
31. Deng, X.; Gu, L.; Liu, C.; Lu, T.; Lu, F.; Lu, Z.; Cui, P.; Pei, Y.; Wang, B.; Hu, S.; et al. Arginine Methylation Mediated by the *Arabidopsis* Homolog of PRMT5 Is Essential for Proper Pre-mRNA Splicing. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **2010**, *107*, 19114–19119. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
32. Zhang, Z.; Zhang, S.; Zhang, Y.; Wang, X.; Li, D.; Li, Q.; Yue, M.; Li, Q.; Zhang, Y.; Xu, Y.; et al. *Arabidopsis* Floral Initiator SKB1 Confers High Salt Tolerance by Regulating Transcription and Pre-mRNA Splicing through Altering Histone H4R3 and Small Nuclear Ribonucleoprotein LSM4 Methylation. *Plant Cell* **2011**, *23*, 396–411. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
33. Fan, H.; Zhang, Z.; Wang, N.; Cui, Y.; Sun, H.; Liu, Y.; Wu, H.; Zheng, S.; Bao, S.; Ling, H.-Q. SKB1/PRMT5-Mediated Histone H4R3 Dimethylation of Ib Subgroup BHLH Genes Negatively Regulates Iron Homeostasis in *Arabidopsis Thaliana*. *Plant J.* **2014**, *77*, 209–221. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
34. Li, Q.; Zhao, Y.; Yue, M.; Xue, Y.; Bao, S. The Protein Arginine Methylase 5 (PRMT5/SKB1) Gene Is Required for the Maintenance of Root Stem Cells in Response to DNA Damage. *J. Genet. Genom.* **2016**, *43*, 187–197. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
35. Fu, Y.; Ma, H.; Chen, S.; Gu, T.; Gong, J. Control of Proline Accumulation under Drought via a Novel Pathway Comprising the Histone Methylase CAU1 and the Transcription Factor ANAC055. *J. Exp. Bot.* **2018**, *69*, 579–588. [[CrossRef](#)]
36. Espejo, A.B.; Gao, G.; Black, K.; Gayatri, S.; Veland, N.; Kim, J.; Chen, T.; Sudol, M.; Walker, C.; Bedford, M.T. PRMT5 C-Terminal Phosphorylation Modulates a 14-3-3/PDZ Interaction Switch. *J. Biol. Chem.* **2017**, *292*, 2255–2265. [[CrossRef](#)]
37. Hu, J.; Yang, H.; Mu, J.; Lu, T.; Peng, J.; Deng, X.; Kong, Z.; Bao, S.; Cao, X.; Zuo, J. Nitric Oxide Regulates Protein Methylation during Stress Responses in Plants. *Mol. Cell* **2017**, *67*, 702–710. [[CrossRef](#)]
38. Kovacs, I.; Ageeva, A.; König, E.-E.; Lindermayr, C. S-Nitrosylation of Nuclear Proteins: New Pathways in Regulation of Gene Expression. *Adv. Bot. Res.* **2016**, *77*, 15–39. [[CrossRef](#)]
39. Ageeva-Kieferle, A.; Rudolf, E.E.; Lindermayr, C. Redox-Dependent Chromatin Remodeling: A New Function of Nitric Oxide as Architect of Chromatin Structure in Plants. *Front. Plant Sci.* **2019**, *10*, 625. [[CrossRef](#)]
40. Wurm, C.J.; Lindermayr, C. Nitric Oxide Signaling in the Plant Nucleus: The Function of Nitric Oxide in Chromatin Modulation and Transcription. *J. Exp. Bot.* **2020**, *72*, 808–818. [[CrossRef](#)]
41. Lindermayr, C.; Rudolf, E.E.; Durner, J.; Groth, M. Interactions between Metabolism and Chromatin in Plant Models. *Mol. Metab.* **2020**, *38*, 100951. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]

42. Saravana Kumar, R.M.; Wang, Y.; Zhang, X.; Cheng, H.; Sun, L.; He, S.; Hao, F. Redox Components: Key Regulators of Epigenetic Modifications in Plants. *Int. J. Mol. Sci.* **2020**, *21*, 1419. [[CrossRef](#)]
43. Samo, N.; Ebert, A.; Kopka, J.; Mozgová, I. Plant Chromatin, Metabolism and Development—An Intricate Crosstalk. *Curr. Opin. Plant Biol.* **2021**, *61*, 102002. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
44. Chaki, M.; Valderrama, R.; Fernández-Ocaña, A.M.; Carreras, A.; López-Jaramillo, J.; Luque, F.; Palma, J.M.; Pedrajas, J.R.; Begara-Morales, J.C.; Sánchez-Calvo, B.; et al. Protein Targets of Tyrosine Nitration in Sunflower (*Helianthus Annuus* L.) Hypocotyls. *J. Exp. Bot.* **2009**, *60*, 4221–4234. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
45. Mengel, A.; Ageeva, A.; Georgii, E.; Bernhardt, J.; Wu, K.; Durner, J.; Lindermayr, C. Nitric Oxide Modulates Histone Acetylation at Stress Genes by Inhibition of Histone Deacetylases. *Plant Physiol.* **2017**, *173*, 1434–1452. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
46. Chaki, M.; Shekariesfahlan, A.; Ageeva, A.; Mengel, A.; von Toerne, C.; Durner, J.; Lindermayr, C. Identification of Nuclear Target Proteins for S-Nitrosylation in Pathogen-Treated *Arabidopsis Thaliana* Cell Cultures. *Plant Sci.* **2015**, *238*, 115–126. [[CrossRef](#)]
47. Ageeva-Kieferle, A.; Georgii, E.; Winkler, B.; Ghirardo, A.; Albert, A.; Hüther, P.; Mengel, A.; Becker, C.; Schnitzler, J.-P.; Durner, J.; et al. Nitric Oxide Coordinates Growth, Development, and Stress Response via Histone Modification and Gene Expression. *Plant Physiol.* **2021**, *187*, 336–360. [[CrossRef](#)]
48. Rudolf, E.E.; Hüther, P.; Forné, I.; Georgii, E.; Han, Y.; Hell, R.; Wirtz, M.; Imhof, A.; Becker, C.; Durner, J.; et al. GSNOR Contributes to Demethylation and Expression of Transposable Elements and Stress-Responsive Genes. *Antioxidants* **2021**, *10*, 1128. [[CrossRef](#)]
49. Varotto, S.; Tani, E.; Abraham, E.; Krugman, T.; Kapazoglou, A.; Melzer, R.; Radanović, A.; Miladinović, D. Epigenetics: Possible Applications in Climate-Smart Crop Breeding. *J. Exp. Bot.* **2020**, *71*, 5223–5236. [[CrossRef](#)]
50. Kakoulidou, I.; Avramidou, E.V.; Baránek, M.; Brunel-Muguet, S.; Farrona, S.; Johannes, F.; Kaiserli, E.; Lieberman-Lazarovich, M.; Martinelli, F.; Mladenov, V.; et al. Epigenetics for Crop Improvement in Times of Global Change. *Biology* **2021**, *10*, 766. [[CrossRef](#)]
51. Zhi, P.; Chang, C. Exploiting Epigenetic Variations for Crop Disease Resistance Improvement. *Front. Plant Sci.* **2021**, *12*, 692328. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
52. Zhang, Y.; Andrews, H.; Eglitis-Sexton, J.; Godwin, I.; Tanurdžić, M.; Crisp, P.A. Epigenome Guided Crop Improvement: Current Progress and Future Opportunities. *Emerg. Top. Life Sci.* **2022**, ETL20210258. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
53. Haverkort, A.J.; Struik, P.C.; Visser, R.G.F.; Jacobsen, E. Applied Biotechnology to Combat Late Blight in Potato Caused by *Phytophthora Infestans*. *Potato Res.* **2009**, *52*, 249–264. [[CrossRef](#)]
54. Floryszak-Wieczorek, J.; Milczarek, G.; Arasimowicz, M.; Ciszewski, A. Do Nitric Oxide Donors Mimic Endogenous NO-Related Response in Plants? *Planta* **2006**, *224*, 1363–1372. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
55. Komar, D.N.; Mouriz, A.; Jarillo, J.A.; Piñeiro, M. Chromatin Immunoprecipitation Assay for the Identification of *Arabidopsis* Protein-DNA Interactions In Vivo. *J. Vis. Exp.* **2016**, e53422. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
56. Tao, H.; Yan, X.; Zhu, K.; Zhang, H. Discovery of Novel PRMT5 Inhibitors by Virtual Screening and Biological Evaluations. *Chem. Pharm. Bull.* **2019**, *67*, 382–388. [[CrossRef](#)]
57. Pontier, D.; Tronchet, M.; Rogowsky, P.; Lam, E.; Roby, D. Activation of Hsr203, a Plant Gene Expressed during Incompatible Plant-Pathogen Interactions, Is Correlated with Programmed Cell Death. *Mol. Plant Microbe Interact.* **1998**, *11*, 544–554. [[CrossRef](#)]
58. Pontier, D.; Balagué, C.; Bezombes-Marion, I.; Tronchet, M.; Deslandes, L.; Roby, D. Identification of a Novel Pathogen-Responsive Element in the Promoter of the Tobacco Gene HSR203], a Molecular Marker of the Hypersensitive Response. *Plant J.* **2001**, *26*, 495–507. [[CrossRef](#)]
59. Lamb, C.; Dixon, R.A. The Oxidative Burst in Plant Disease Resistance. *Annu. Rev. Plant Physiol. Plant Mol. Biol.* **1997**, *48*, 251–275. [[CrossRef](#)]
60. Mur, L.A.J.; Brown, I.R.; Darby, R.M.; Bestwick, C.S.; Bi, Y.-M.; Mansfield, J.W.; Draper, J. A Loss of Resistance to Avirulent Bacterial Pathogens in Tobacco Is Associated with the Attenuation of a Salicylic Acid-Potentiated Oxidative Burst. *Plant J.* **2000**, *23*, 609–621. [[CrossRef](#)]
61. Floryszak-Wieczorek, J.; Arasimowicz-Jelonek, M.; Izbiańska, K. The Combined Nitrate Reductase and Nitrite-Dependent Route of NO Synthesis in Potato Immunity to *Phytophthora Infestans*. *Plant Physiol. Biochem.* **2016**, *108*, 468–477. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
62. Feechan, A.; Kwon, E.; Yun, B.-W.; Wang, Y.; Pallas, J.A.; Loake, G.J. A Central Role for S-Nitrosothiols in Plant Disease Resistance. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **2005**, *102*, 8054–8059. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
63. Treffon, P.; Rossi, J.; Gabellini, G.; Trost, P.; Zaffagnini, M.; Vierling, E. Quantitative Proteome Profiling of a S-Nitrosogluthathione Reductase (GSNOR) Null Mutant Reveals a New Class of Enzymes Involved in Nitric Oxide Homeostasis in Plants. *Front. Plant Sci.* **2021**, *12*, 2869. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
64. Delorme-Hinoux, V.; Bangash, S.A.K.; Meyer, A.J.; Reichheld, J.-P. Nuclear Thiol Redox Systems in Plants. *Plant Sci.* **2016**, *243*, 84–95. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
65. Sani, E.; Herzyk, P.; Perrella, G.; Colot, V.; Amtmann, A. Hyperosmotic Priming of *Arabidopsis* Seedlings Establishes a Long-Term Somatic Memory Accompanied by Specific Changes of the Epigenome. *Genome Biol.* **2013**, *14*, R59. [[CrossRef](#)]
66. Sneppen, K.; Ringrose, L. Theoretical Analysis of Polycomb-Trithorax Systems Predicts That Poised Chromatin Is Bistable and Not Bivalent. *Nat. Commun.* **2019**, *10*, 2133. [[CrossRef](#)]
67. Kim, J.-H. Multifaceted Chromatin Structure and Transcription Changes in Plant Stress Response. *Int. J. Mol. Sci.* **2021**, *22*, 2013. [[CrossRef](#)]

68. Liu, N.; Fromm, M.; Avramova, Z. H3K27me3 and H3K4me3 Chromatin Environment at Super-Induced Dehydration Stress Memory Genes of *Arabidopsis Thaliana*. *Mol. Plant* **2014**, *7*, 502–513. [[CrossRef](#)]
69. Vasudevan, D.; Hickok, J.R.; Bovee, R.C.; Pham, V.; Mantell, L.L.; Bahroos, N.; Kanabar, P.; Cao, X.-J.; Maisenschein-Cline, M.; Garcia, B.A.; et al. Nitric Oxide Regulates Gene Expression in Cancers by Controlling Histone Posttranslational Modifications. *Cancer Res.* **2015**, *75*, 5299–5308. [[CrossRef](#)]
70. Socco, S.; Bovee, R.C.; Palczewski, M.B.; Hickok, J.R.; Thomas, D.D. Epigenetics: The Third Pillar of Nitric Oxide Signaling. *Pharmacol. Res.* **2017**, *121*, 52–58. [[CrossRef](#)]
71. Vasudevan, D.; Bovee, R.C.; Thomas, D.D. Nitric Oxide, the New Architect of Epigenetic Landscapes. *Nitric Oxide* **2016**, *59*, 54–62. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
72. Palczewski, M.B.; Petraitis, H.; Thomas, D.D. Nitric Oxide Is an Epigenetic Regulator of Histone Post-Translational Modifications in Cancer. *Curr. Opin. Physiol.* **2019**, *9*, 94–99. [[CrossRef](#)]
73. Nott, A.; Watson, P.M.; Robinson, J.D.; Crepaldi, L.; Riccio, A. S-Nitrosylation of Histone Deacetylase 2 Induces Chromatin Remodelling in Neurons. *Nature* **2008**, *455*, 411–415. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
74. Feng, J.H.; Jing, F.B.; Fang, H.; Gu, L.C.; Xu, W.F. Expression, Purification, and S-Nitrosylation of Recombinant Histone Deacetylase 8 in *Escherichia Coli*. *Biosci. Trends* **2011**, *5*, 17–22. [[CrossRef](#)]
75. Okuda, K.; Ito, A.; Uehara, T. Regulation of Histone Deacetylase 6 Activity via S-Nitrosylation. *Biol. Pharm. Bull.* **2015**, *38*, 1434–1437. [[CrossRef](#)]
76. Hernando, C.E.; Sanchez, S.E.; Mancini, E.; Yanovsky, M.J. Genome Wide Comparative Analysis of the Effects of PRMT5 and PRMT4/CARM1 Arginine Methyltransferases on the *Arabidopsis Thaliana* Transcriptome. *BMC Genom.* **2015**, *16*, 192. [[CrossRef](#)]
77. Hickok, J.R.; Vasudevan, D.; Antholine, W.E.; Thomas, D.D. Nitric Oxide Modifies Global Histone Methylation by Inhibiting Jumonji C Domain-Containing Demethylases. *J. Biol. Chem.* **2013**, *288*, 16004–16015. [[CrossRef](#)]
78. Sanchez, S.E.; Petrillo, E.; Beckwith, E.J.; Zhang, X.; Rugnone, M.L.; Hernando, C.E.; Cuevas, J.C.; Godoy Herz, M.A.; Depetris-Chauvin, A.; Simpson, C.G.; et al. A Methyl Transferase Links the Circadian Clock to the Regulation of Alternative Splicing. *Nature* **2010**, *468*, 112–116. [[CrossRef](#)]
79. Yue, M.; Li, Q.; Zhang, Y.; Zhao, Y.; Zhang, Z.; Bao, S. Histone H4R3 Methylation Catalyzed by SKB1/PRMT5 Is Required for Maintaining Shoot Apical Meristem. *PLoS ONE* **2013**, *8*, e83258. [[CrossRef](#)]
80. Balint-Kurti, P. The Plant Hypersensitive Response: Concepts, Control and Consequences. *Mol. Plant Pathol.* **2019**, *20*, 1163–1178. [[CrossRef](#)]
81. Yogendra, K.N.; Kumar, A.; Sarkar, K.; Li, Y.; Pushpa, D.; Mosa, K.A.; Duggavathi, R.; Kushalappa, A.C. Transcription Factor StWRKY1 Regulates Phenylpropanoid Metabolites Conferring Late Blight Resistance in Potato. *J. Exp. Bot.* **2015**, *66*, 7377–7389. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
82. Chacón-Cerdas, R.; Barboza-Barquero, L.; Albertazzi, F.J.; Rivera-Méndez, W. Transcription Factors Controlling Biotic Stress Response in Potato Plants. *Physiol. Mol. Plant Pathol.* **2020**, *112*, 101527. [[CrossRef](#)]
83. Naveed, Z.A.; Wei, X.; Chen, J.; Mubeen, H.; Ali, G.S. The PTI to ETI Continuum in *Phytophthora*-Plant Interactions. *Front. Plant Sci.* **2020**, *11*, 2030. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
84. Sachamitr, P.; Ho, J.C.; Ciamponi, F.E.; Ba-Alawi, W.; Coutinho, F.J.; Guilhamon, P.; Kushida, M.M.; Cavalli, F.M.G.; Lee, L.; Rastegar, N.; et al. PRMT5 Inhibition Disrupts Splicing and Stemness in Glioblastoma. *Nat. Commun.* **2021**, *12*, 979. [[CrossRef](#)]
85. Metz, P.J.; Ching, K.A.; Xie, T.; Delgado Cuenca, P.; Niessen, S.; Tatlock, J.H.; Jensen-Pergakes, K.; Murray, B.W. Symmetric Arginine Dimethylation Is Selectively Required for mRNA Splicing and the Initiation of Type I and Type III Interferon Signaling. *Cell Rep.* **2020**, *30*, 1935–1950.e8. [[CrossRef](#)]
86. Pal, S.; Sif, S. Interplay between Chromatin Remodelers and Protein Arginine Methyltransferases. *J. Cell. Physiol.* **2007**, *213*, 306–315. [[CrossRef](#)]
87. Ahmad, A.; Cao, X. Plant PRMTs Broaden the Scope of Arginine Methylation. *J. Genet. Genom.* **2012**, *39*, 195–208. [[CrossRef](#)]
88. Karkhanis, V.; Hu, Y.-J.; Baiocchi, R.A.; Imbalzano, A.N.; Sif, S. Versatility of PRMT5-Induced Methylation in Growth Control and Development. *Trends Biochem. Sci.* **2011**, *36*, 633–641. [[CrossRef](#)]
89. Zhang, J.; Jing, L.; Li, M.; He, L.; Guo, Z. Regulation of Histone Arginine Methylation/Demethylation by Methylase and Demethylase (Review). *Mol. Med. Rep.* **2019**, *19*, 3963–3971. [[CrossRef](#)]
90. Liu, F.; Xu, Y.; Lu, X.; Hamard, P.-J.; Karl, D.L.; Man, N.; Mookhtiar, A.K.; Martinez, C.; Lossos, I.S.; Sun, J.; et al. PRMT5-Mediated Histone Arginine Methylation Antagonizes Transcriptional Repression by Polycomb Complex PRC2. *Nucleic Acids Res.* **2020**, *48*, 2956–2968. [[CrossRef](#)]
91. van't Klooster, J.W.; van den Berg-Velthuis, G.; van West, P.; Govers, F. Tef1, a *Phytophthora Infestans* Gene Encoding Translation Elongation Factor 1 $\alpha$ . *Gene* **2000**, *249*, 145–151. [[CrossRef](#)]
92. Barroso, J.B.; Corpas, F.J.; Carreras, A.; Rodríguez-Serrano, M.; Esteban, F.J.; Fernández-Ocaña, A.; Chaki, M.; Romero-Puertas, M.C.; Valderrama, R.; Sandalio, L.M.; et al. Localization of S-Nitrosoglutathione and Expression of S-Nitrosoglutathione Reductase in Pea Plants under Cadmium Stress. *J. Exp. Bot.* **2006**, *57*, 1785–1793. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
93. Janus, Ł.; Milczarek, G.; Arasimowicz-Jelonek, M.; Abramowski, D.; Billert, H.; Floryszak-Wieczorek, J. Normoergic NO-Dependent Changes, Triggered by a SAR Inducer in Potato, Create More Potent Defense Responses to *Phytophthora Infestans*. *Plant Sci.* **2013**, *211*, 23–34. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]

94. Floryszak-Wieczorek, J.; Arasimowicz-Jelonek, M. Contrasting Regulation of NO and ROS in Potato Defense-Associated Metabolism in Response to Pathogens of Different Lifestyles. *PLoS ONE* **2016**, *11*, e0163546. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
95. Zhao, S.; Fernald, R.D. Comprehensive Algorithm for Quantitative Real-Time Polymerase Chain Reaction. *J. Comput. Biol.* **2005**, *12*, 1047–1064. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
96. Pfaffl, M.W. A New Mathematical Model for Relative Quantification in Real-Time RT-PCR. *Nucleic Acids Res.* **2001**, *29*, e45. [[CrossRef](#)]
97. Tichopad, A.; Didier, A.; Pfaffl, M.W. Inhibition of Real-Time RT-PCR Quantification Due to Tissue-Specific Contaminants. *Mol. Cell Probes* **2004**, *18*, 45–50. [[CrossRef](#)]
98. Haring, M.; Offermann, S.; Danker, T.; Horst, I.; Peterhansel, C.; Stam, M. Chromatin Immunoprecipitation: Optimization, Quantitative Analysis and Data Normalization. *Plant Methods* **2007**, *3*, 11. [[CrossRef](#)]
99. Jarillo, J.A.; Komar, D.N.; Piñeiro, M. The Use of the Chromatin Immunoprecipitation Technique for In Vivo Identification of Plant Protein-DNA Interactions. *Methods Mol Biol.* **2018**, *1794*, 323–334. [[CrossRef](#)]
100. Moehs, C.P.; McElwain, E.F.; Spiker, S. Chromosomal Proteins of *Arabidopsis Thaliana*. *Plant Mol. Biol.* **1988**, *11*, 507–515. [[CrossRef](#)]
101. Bradford, M.M. A Rapid and Sensitive Method for the Quantitation of Microgram Quantities of Protein Utilizing the Principle of Protein-Dye Binding. *Anal. Biochem.* **1976**, *72*, 248–254. [[CrossRef](#)]



## OPEN ACCESS

## EDITED BY

Essaid Ait Barka,  
Université de Reims Champagne-  
Ardenne, France

## REVIEWED BY

Christian Lindermayr,  
Helmholtz Association of German  
Research Centres (HZ), Germany  
Jun Cui,  
Hunan Normal University, China

## \*CORRESPONDENCE

Jolanta Floryszak-Wieczorek  
jolanta.floryszak@up.poznan.pl

## SPECIALTY SECTION

This article was submitted to  
Plant Pathogen Interactions,  
a section of the journal  
Frontiers in Plant Science

RECEIVED 31 August 2022

ACCEPTED 08 November 2022

PUBLISHED 02 December 2022

## CITATION

Drozda A, Kurpisz B, Guan Y,  
Arasimowicz-Jelonek M, Plich J,  
Jagodzik P, Kuźnicki D and Floryszak-  
Wieczorek J (2022) Insights into the  
expression of DNA (de)methylation  
genes responsive to nitric oxide  
signaling in potato resistance to late  
blight disease.  
*Front. Plant Sci.* 13:1033699.  
doi: 10.3389/fpls.2022.1033699

## COPYRIGHT

© 2022 Drozda, Kurpisz, Guan,  
Arasimowicz-Jelonek, Plich, Jagodzik,  
Kuźnicki and Floryszak-Wieczorek. This  
is an open-access article distributed  
under the terms of the [Creative  
Commons Attribution License \(CC BY\)](https://creativecommons.org/licenses/by/4.0/).  
The use, distribution or reproduction  
in other forums is permitted, provided  
the original author(s) and the  
copyright owner(s) are credited and  
that the original publication in this  
journal is cited, in accordance with  
accepted academic practice. No use,  
distribution or reproduction is  
permitted which does not comply with  
these terms.

# Insights into the expression of DNA (de)methylation genes responsive to nitric oxide signaling in potato resistance to late blight disease

Andżelika Drozda<sup>1</sup>, Barbara Kurpisz<sup>1</sup>, Yufeng Guan<sup>1,2</sup>,  
Magdalena Arasimowicz-Jelonek<sup>2</sup>, Jarosław Plich<sup>3</sup>,  
Przemysław Jagodzik<sup>2</sup>, Daniel Kuźnicki<sup>1</sup>  
and Jolanta Floryszak-Wieczorek<sup>1\*</sup>

<sup>1</sup>Department of Plant Physiology, Faculty of Agronomy, Horticulture and Bioengineering, Poznań University of Life Sciences, Poznań, Poland, <sup>2</sup>Department of Plant Ecophysiology, Faculty of Biology, Adam Mickiewicz University in Poznań, Poznań, Poland, <sup>3</sup>Plant Breeding and Acclimatization Institute - National Research Institute, Młochów, Poland

Our previous study concerning the pathogen-induced biphasic pattern of nitric oxide (NO) burst revealed that the decline phase and a low level of NO, due to S-nitrosoglutathione reductase (GSNOR) activity, might be decisive in the upregulation of stress-sensitive genes *via* histone H3/H4 methylation in potato leaves inoculated with *avr P. infestans*. The present study refers to the NO-related impact on genes regulating DNA (de)methylation, being in dialog with histone methylation. The excessive amounts of NO after the pathogen or GSNO treatment forced the transient upregulation of histone *SUVH4* methylation and DNA hypermethylation. Then the diminished NO bioavailability reduced the *SUVH4*-mediated suppressive H3K9me2 mark on the *R3a* gene promoter and enhanced its transcription. However, we found that the *R3a* gene is likely to be controlled by the RdDM methylation pathway. The data revealed the time-dependent downregulation of the *DCL3*, *AGO4*, and *miR482e* genes, exerting upregulation of the targeted *R3a* gene correlated with *ROS1* overexpression. Based on these results, we postulate that the biphasic waves of NO burst in response to the pathogen appear crucial in establishing potato resistance to late blight through the RdDM pathway controlling *R* gene expression.

## KEYWORDS

nitric oxide, DNA (de)methylation genes, *R3a*, RdDM pathway, *Phytophthora infestans*



## Introduction

Nitric oxide is an endogenous bioactive signaling molecule associated with various physiological and pathophysiological effects (Del Castello et al., 2019; Kolbert et al., 2019). Nitric oxide is a relatively stable, uncharged molecule and highly diffusible through biological membranes. Although it has a short biological half-life (max. a few seconds) and usually acts locally in the cell compartments, it is also possible to transfer NO bioactivity into the cell nucleus (Wurm and Lindermayr, 2021). NO belongs to the group of redox-signaling molecules. Most of the biological functions of NO are mediated by several mechanisms concerning either its direct or indirect reaction with the iron centers in heme-containing proteins or *via* the formation of protein adducts containing nitrogen oxide through the process of S-nitrosation, transnitrosation, tyrosine nitration or dinitrosyliron complex formation (Gupta et al., 2020; Lindermayr et al., 2020). New findings have recently demonstrated that apart from pleiotropic functions recognized so far; NO reactivity might also be engaged in epigenetic processes involved in histone modifications and DNA methylation in plants (Mengel et al., 2017; Ageeva-Kieferle et al., 2021; Rudolf et al., 2021; Drozda et al., 2022).

Peroxynitrite (ONOO<sup>-</sup>) is a potent oxidant and nitrating species generated by the reaction of NO and superoxide, commonly known as a mediator of cellular injury in many biological systems (Arasimowicz-Jelonek and Floryszak-Wieczorek, 2011; Vandelle and Delledonne, 2011). An increasing number of studies have reported that peroxynitrite may not be considered only as a cytotoxic agent but might also act as a potent modulator of the redox regulation in various cell signal transduction pathways, including pathogen resistance (del Río, 2015; Vandelle et al., 2016; Arasimowicz-Jelonek and Floryszak-Wieczorek, 2019).

A majority of the *R* genes encode the intracellular nucleotide-binding domain and leucine-rich repeat receptors (NB-LRR), which can recognize pathogen effectors and activate rapid and robust effector-triggered immunity (ETI) against the pathogen, involving hypersensitive response (Cui et al., 2015; Jones et al., 2016; Zhou and Zhang, 2020). The expression of the *R* genes is regulated in a precise and multifaceted manner at transcriptional and post-transcriptional levels or by non-coding small RNAs. Small RNAs, including siRNA and miRNA, are involved in several biological processes, including regulating gene expression or silencing transposable elements (Fuso et al., 2020).

In *Solanaceous* species, such as potato and tomato, some miR482, miR5300, miR6019, and miR6027 were identified to target the NB-LRR genes, respectively (Li et al., 2012; Shivaprasad et al., 2012; Cui et al., 2014; Seo et al., 2018). Small RNAs are mobile to exert systemic effects over a long distance within the plant, causing posttranscriptional modifications (PTMs) and other epigenetic changes (Molnar

et al., 2010). Generally, the experimental data revealed that miRNAs suppress a wide range of *R* genes that confer resistance to various pathogens; however, the specific mechanism of this regulation seems to vary significantly between species (Shivaprasad et al., 2012; Ouyang et al., 2014; Fei et al., 2016). Precise regulation of *R* genes is pivotal to preventing fitness costs and autoimmune responses in the absence of the pathogen. However, in the presence of an aggressor, early and rapid overexpression of *R* genes is necessary for improved resistance to stress.

In the present paper, special attention is given to the issue of how or whether NO influences the expression of *R* genes implicated in the regulation through the RNA-directed DNA methylation pathway (RdDM). Under changing circumstances, the current state of the 5-mC DNA pattern is often the effect of the cooperation or competition of DNA methyltransferases and the RdDM pathway with DNA demethylation machinery. *De novo* DNA methylation is established by chromomethylase 3 (CMT3), CMT2 for CHG methylation, and domain rearranged methyltransferase 2 (DRM2) for CHH methylation (where H corresponds to A, T, or C). In turn, methyltransferase 1 (MET1) is required for global cytosine methylation maintenance in the CG sequence context. Methyl groups can also be removed from DNA through a DNA base excision repair pathway mediated by 5-methylcytosine DNA glycosylases in *Arabidopsis*, such as repressors of silencing 1 (ROS1), DEMETER (DME), and DEMETER-LIKE 2 (DML2) and DML3. DNA methylation is functionally linked to H3K9me2 through CMT2/CMT3 or DRM2 engaged in the RdDM machinery. Several essential enzymes of the RdDM pathway were detected, including Dicer-like 3 (DCL3), which processes double-stranded RNA to form 24-26-nucleotide siRNAs, or Argonaute 4 (AGO4). AGO4-bound siRNAs interact with Pol V to recruit DRM2 and catalyze *de novo* DNA methylation at CG and non-CG contexts at the homologous genomic sites, affecting Transposon Elements (TEs) and transcriptional gene silencing (Saze et al., 2012; Matzke and Mosher, 2014; Zhang et al., 2018).

Few reports have been published on the potential NO-dependent effect on DNA methylation in plants. It was previously found that seedlings of two *Oryza sativa* L. ssp. Japonica cultivars treated with high doses of sodium nitroprusside (NO donor) showed hypomethylation, mainly in the CHG sequence and transcriptional perturbations of chromatin-remodeling genes (Ou et al., 2015). Recently, it was demonstrated that GSNO reductase-deficient *Arabidopsis* (*gsnor1-3*) with enhanced NO levels revealed hypermethylation of TEs and impaired stress-responsive genes (Rudolf et al., 2021). Moreover, the authors proposed that S-nitrosoglutathione reductase (GSNOR) activity is required to control transmethylation cell activity linked with DNA (de) methylation associated with stress-responsive gene regulation.

Methylation is directly linked to S-adenosylmethionine (SAM) acting as a universal methyl (-CH<sub>3</sub>) donor in a broad

spectrum of biological functions, including DNA and histone methylation. Each transfer of the -CH<sub>3</sub> group to a methyl acceptor generates S-adenosylhomocysteine (SAH), a competitive inhibitor of methyltransferases that is subsequently cleaved to adenosine and homocysteine using an S-adenosylhomocysteine hydrolase (SAHH). Homocysteine is then converted through methionine to S-adenosylmethionine (SAM), which acts again in this cycle as a methyl donor for methyltransferases in the transmethylation reactions of various acceptors. Growing evidence highlighted the critical role of SAHH in maintaining the methylation potential in this recycling mechanism by regulating the cellular SAM/SAH ratio for DNA and H3K9me2 methylation under physiological or pathological conditions (Palmer and Abeles, 1979; Rahikainen et al., 2018; Saravana Kumar et al., 2020).

In the past, numerous proteome-wide analyses reported that some components involved in the SAM/SAH cycle underwent S-nitrosation (Lindermayr et al., 2005; Abat and Deswal, 2009; Puyaubert et al., 2014; Hu et al., 2015) or tyrosine nitration (Chaki et al., 2009; Lozano-Juste et al., 2011; Begara-Morales et al., 2013; Arasimowicz-Jelonek et al., 2016) modifying the methylation homeostasis in plant cells.

The cultivated potato is the third most important food crop after rice and wheat and is a major horticultural crop (Devaux et al., 2014). Biotic stresses negatively influence plant growth and development, severely reducing crop yield potential and leading to substantial economic losses. The late blight disease of potato and tomato, caused by the oomycete *P. infestans*, generates estimated global annual losses of €12 billion (Arora et al., 2014). Plants are constantly exposed to unfavorable biotic and abiotic cues. Research on epigenetic mechanisms in crop response to stress could be necessary to improve crop adaptation to environmental changes and enhance resistance to pathogens in line with the epi-breeding strategy (Springer and Schmitz, 2017; Varotto et al., 2020; Zhi and Chang, 2021).

The presented study aimed to explore the NO-dependent redox targets that can participate in the antagonistic tuning of the *R* gene expression by complementary miRNA during the potato-avr *P. infestans* interaction. Our findings revealed that under excessive NO, the central genes of the RdDM pathway were upregulated (*DCL3*, *AGO4*, *DRM2*, and *miR482e*), which suppressed the *R3a* gene expression. Then, diminished NO bioavailability probably resulted in the reduced inhibitory impact of the *miR482e* gene toward the corresponding *R3a* gene, favoring resistance to *Phytophthora infestans*.

## Materials and methods

### Plant material and cultivation

The plant material consisted of two potato genotypes, i.e., ‘Sarpó Mira’ (*Solanum tuberosum* L. cv. Sarpó Mira) and the

breeding line TG 97-411 obtained from the Plant Breeding and Acclimatization Institute collection Research Division in Młochów, Poland. Both ‘Sarpó Mira’ and the breeding line TG 97-411 show high effector-triggered immunity (ETI) resistance with the avirulent *Phytophthora infestans* isolate, resulting in a hypersensitive response (HR). The genotype ‘Sarpó Mira’ is characterized by the pyramidization of *R* genes against *P. infestans*. Thus this leads to a high degree of resistance to this pathogen, as the genes identified in this R variant are *R3a*, *R3b*, *R4*, *R8*, and *Rpi-Smira1*. The protoplast of the TG 97-411 tetraploid genotype is the interspecific *S. phureja* × *S. stenotomum* hybrid, from where the *Rpi-phu1* gene was introduced into the tetraploid *S. tuberosum* (Śliwka et al., 2010). Potato explants were propagated under sterile conditions by the *in vitro* seedling method. They were cultured for 28 days on solidified MS medium (Duchefa Biochemie B.V. Haarlem, the Netherlands) containing 2% (w/v) sucrose and 10% agar (Murashige and Skoog, 1962). Then the plants were transplanted to sterile soil (universal substrate consisting of natural peat, WOKAS SA, Łosice, Poland) and grown to the leaf stage in a phytochamber with 16 h of light (180 μmol m<sup>-2</sup>s<sup>-1</sup>), FLUORA L18W/77, and L58W/77, OSRAM, Germany) at 18 ± 2°C and 60% humidity for 4 weeks.

### Pathogen culture and inoculation

The avr *Phytophthora infestans* (Mont.) de Bary isolate MP946 (A1 mating type, race 1.3.4.7.10.11) and MP324 (A1 mating type, race 1.2.3.4.5.6.7.8.10.11) were kindly supplied by the Plant Breeding and Acclimatization Institute collection Research Division in Młochów, Poland. After three weeks of growth in pea medium, pH=6.1, the pathogen was passaged at least twice through the tubers. The inoculated tuber slices were incubated in airtight plastic boxes for 7-14 days in the dark at 16°C. The sporangia of *P. infestans* were obtained by collecting the aerial mycelium, rinsed with cold distilled water, passed through a sterile sieve, and adjusted to a concentration of 2.5 × 10<sup>5</sup> sporangia per 1 ml using a hemocytometer. Then the sporangia were incubated at 4°C for 1 h to release the zoospores. Potato plants were inoculated by spraying leaves with a zoospore suspension and kept overnight at 18°C and 80-90% humidity on moist blotting paper in a plastic box covered with glass. Inoculated and control leaves were sprayed with distilled water and transferred to a phytochamber. Samples were collected at 1, 3, 6, 24, and 48 h after inoculation (hpi).

### NO donor and scavenger treatment

The third or fourth compound leaf from the base of the intact plant was treated by spraying with nitric oxide donor – 250 μM GSNO (S-nitrosoglutathione; Sigma-Aldrich) or a specific scavenger of NO – 200 μM cPTIO (2-(4-

Carboxyphenyl)-4,4,5,5-tetramethylimidazoline-1-oxyl-3-oxide; Sigma-Aldrich), which allowed to estimate the effect of eliminating NO from potato leaves or 250  $\mu\text{M}$  GSH (glutathione; Sigma-Aldrich), respectively. GSH is not responsible for NO generation but acts as a reducing compound compared to oxidizing GSNO under physiological conditions. The leaves were sprayed with 5 ml of the mentioned solutions and placed in an airtight, transparent plastic box. Samples were collected at 1, 3, 6, 24, and 48 h after treatment (h).

## Measurement of nitric oxide generation

Nitric oxide production was measured using cell-permeable NO fluorescent probe - CuFL (the copper (II) complex of FL (2-{2-Chloro-6-hydroxy-5-[2-methylquinolin-8-ylamino)methyl]-3-oxo-3H-xanthen-9-yl}benzoic acid. Cu-FL was freshly prepared by adding a 1:1 FL solution (1 mM) to the copper (II) solution (1 mM), as previously specified by [Arasimowicz-Jelonek et al. \(2016\)](#). The fluorescence intensity of the NO-FL complex was determined with the Perkin Elmer LS Fluorescence Spectrometer 50B (UK) using 488 and 516 nm for excitation and emission. Each value was expressed as relative fluorescence intensity ( $\text{Int} \times \text{g}^{-1} \text{FW}$ ).

Nitric oxide emission from potato leaves was also measured using the NO chemiluminescence analyzer (CLD 88, Eco Physics, Switzerland) as described by [Planchet and Kaiser, 2006](#) and [Zafari et al. \(2022\)](#), with some modifications. The leaf segments (2g FW) from 4-week-old potato plants were treated with the pathogen, 250  $\mu\text{M}$  GSNO, 200  $\mu\text{M}$  cPTIO, or  $\text{H}_2\text{O}$ , and immediately placed into a measuring glass chamber. NO-free helium gas with a constant flow of 400  $\text{mL min}^{-1}$  was first passed through the measuring chamber with potato leaves and subsequently through the NO chemiluminescence analyzer that is sensitive in a range of 0-4000ppb of NO. Microsoft Excel visualized the NO measurement recorded every second for approx. 7 hours. Each value was expressed as NO emission ( $\text{ppb} \times \text{g}^{-1} \text{FW} \times \text{h}^{-1}$ ).

## Gene expression analysis

Potato leaf fragments collected at the appropriate time points were frozen in liquid nitrogen and stored at  $-80^\circ\text{C}$  until use. RNA was then isolated from 100 mg of frozen tissue using TriReagent (Sigma-Aldrich) according to the manufacturer's protocol. The obtained RNA was then purified using a special Deoxyribonuclease kit (Sigma-Aldrich). Reverse transcription of 1  $\mu\text{g}$  of RNA for each experimental variant was performed using a reverse transcription kit (Thermo Fisher Scientific, USA). RT-qPCR analyses were performed on a PikoReal 96 Thermocycler (Thermo Fisher Scientific, USA) under the following conditions: 10 min at  $95^\circ\text{C}$ , followed by 45 cycles of 12 s at  $95^\circ\text{C}$ , 30 s at the

annealing temperature for each specific primer ([Table S1](#)) and 30 s at  $72^\circ\text{C}$ . The reaction mixture contained 0.1  $\mu\text{M}$  of each primer, 1  $\mu\text{l}$  of 5  $\times$  diluted cDNA, 10  $\mu\text{l}$  of the Power SYBR<sup>®</sup> Green PCR Master Mix (Applied Biosystems, United States), and DEPC treated water to a total volume of 20  $\mu\text{l}$ . Primers for the studied genes were designed using the Primer-blast program by the available NCBI (National Center of Biotechnology Information) and PGSC (Potato Genome Sequencing Consortium) databases. The primers designed and used in this study are listed in [Table S1](#). The obtained data were normalized to the elongation factor *efl1 $\alpha$*  (AB061263) and *18S rRNA* (X67238). The Ct values were determined using the Real-time PCR Miner ([Zhao and Fernald, 2005](#)), and relative gene expression was calculated using efficiency-corrected computational models proposed by [Pfaffl \(2001\)](#) and [Tichopad et al. \(2004\)](#).

## Analysis of miRNA expression – quantitative steam-loop PCR method

The amount of the mature miRNA transcript was determined according to [Varkonyi-Gasic and Hellens \(2011\)](#) and [Varkonyi-Gasic \(2017\)](#). The primers used were designed according to the modified method of [Chen et al. \(2005\)](#) and are given in [Table S2](#). Total RNA, also used in gene expression analyses, was reverse transcribed. The 1  $\mu\text{M}$  loop primer solution was denatured at  $65^\circ\text{C}$  for 5 minutes and then kept on ice until used. The samples contained 1  $\mu\text{l}$  of total RNA, 4  $\mu\text{l}$  of 5  $\times$  concentrated reaction buffer, 0.1  $\mu\text{l}$  of RNase inhibitor (Ribolock RNase inhibitor, 40  $\text{U} \times \mu\text{l}^{-1}$ ), 0.5  $\mu\text{l}$  10 mM dNTP mixture, 0.25  $\mu\text{l}$  of reverse transcriptase (200  $\text{U} \times \mu\text{l}^{-1}$ ), 1  $\mu\text{l}$  of denatured loop primers, 1  $\mu\text{l}$  of oligo-dT oligonucleotides and 12.15  $\mu\text{l}$  of RNase-free water. The samples were lightly centrifuged and placed in a PikoReal 96 thermal cycler (Thermo Fisher Scientific) with the following reaction conditions: 30 minutes at  $16^\circ\text{C}$ , followed by 60 cycles of  $30^\circ\text{C}$  for 30 s,  $42^\circ\text{C}$  for 30 s, and  $50^\circ\text{C}$  for 1 s. After this, the reverse transcription process was stopped by heating at  $85^\circ\text{C}$  for 5 minutes; samples were cooled at  $4^\circ\text{C}$  and diluted 5 times by adding 80  $\mu\text{l}$  of DEPC water.

The level of miRNA transcript was also determined using the PikoReal 96 RT-qPCR instrument (Thermo Fisher Scientific). The volume of the reaction mixture was 20  $\mu\text{l}$  consisting of 12  $\mu\text{l}$  of DEPC water, 2  $\mu\text{l}$  of 100 mM selective primer mix, 2  $\mu\text{l}$  of reverse transcription assay, and 4  $\mu\text{l}$  of polymerase solution (Power SYBR<sup>®</sup> Green PCR Master Mix, Qiagen). Negative samples had a similar composition, but instead of 2  $\mu\text{l}$  of the test sample, 2  $\mu\text{l}$  of DEPC water was added as a volume equivalent. The thermal profile of the reaction was as follows: initial denaturation at  $95^\circ\text{C}$  for 5 minutes, 35 cycles of denaturation at  $95^\circ\text{C}$  for 5 s, primer annealing at a specific temperature for 10 s, and an extension step at  $72^\circ\text{C}$  for 15 s. The

melting curve was obtained by heating the samples from 65°C to 95°C at 0.1°C\*s<sup>-1</sup>. The specificity of the amplification was assessed mainly by the analysis of the melting curves of the products. In addition, in the case of the preparation of new primers, electrophoretic analysis of the product length was performed. In the case of the appearance of a non-specific product, the result was not taken into account in further calculations. The results were analyzed using the PCR Miner algorithm provided by [Zhao and Fernald \(2005\)](#). The relative amount of the test miRNA transcript was calculated in relation to the control and the *ef1α* (AB061263) and *18S rRNA* (X67238) reference genes ([Nicot et al., 2005](#)), using the Pfaffl method (2001).

## Chromatin immunoprecipitation assay

The chromatin immunoprecipitation assay (ChIP) was carried out as described by [Haring et al. \(2007\)](#) and [Komar et al. \(2016\)](#). The sample of 2 g potato leaves was cross-linked by vacuum infiltration in a crosslinking buffer with 1% formaldehyde and frozen at -80°C. The next step was chromatin isolation, performed according to [Jarillo et al.'s](#) protocol (2018) with some modifications. Samples were ground in liquid nitrogen, resuspended, and incubated in Nuclei Isolation Buffer, and after centrifugation, resuspended in Nuclei Lysis Buffer. Subsequently, the samples were sonicated on ice for 30 × 30 s at 30% power to obtain DNA fragments of 250-750 nt in length. An input sample (50-100 µl) was collected from the solution to check the quality of the model on an agarose gel. The remaining solution was separated into the test sample (to which the antibody of interest was added: H3K9me2 (EMD Millipore; cat.-no. 07-411) and the control sample (to which IgG was added). The next day 30 µl of Magnetic Beads (PureProteome Protein A/G Mix, Millipore) were added, and the samples were incubated for at least 2 hours. Afterward, the samples were washed and decrosslinked overnight with 300 mM NaCl and 1% SDS at 65°C with shaking. The next step involved incubating probes with proteinase K (20 mg/ml) to digest proteins. Then the samples were subjected to DNA isolation with phenol: chloroform: isoamyl alcohol mixture (25:24:1). The last step was to check the number of binding sites in the immunoprecipitated DNA using the RT-qPCR method. The reaction mixture contained 0.1 µM of each primer, 2-5 µl of purified DNA, 10 µl of Power SYBR<sup>®</sup> Green PCR Master Mix (Applied Biosystems), and DEPC treated water to a total volume of 20 µl. The specificity of the reaction was confirmed by the presence of one peak in the melting curve analysis. Primers for the gene of interest (*R3a*) were designed by Primer3 Output Software ([Table S3](#)). Data were analyzed by the Fold Enrichment Method ([Jarillo et al., 2018](#)). The raw Ct value of each sample was subtracted from the raw Ct value of the control (IgG) corresponding to that sample ( $\Delta Ct = Ct_{\text{sample}} - Ct_{\text{control, IgG}}$ ).

The enrichments were calculated using the following formula:

$$\text{Fold enrichment} = 2^{-\Delta Ct}$$

After treatment with GSNO (250 µM), cPTIO (200 µM), and GSH (250 µM), and after *avr P. infestans* inoculation, samples were taken at 3, 6, and 24 h. The relative amount of immunoprecipitated chromatin fragments (as determined by real-time PCR) from the above treatment variants was compared with the reference (arbitrarily set to 1). The reference (leaves sprayed with water) was taken at each time point.

Each experiment included at least three independent measurements per sample. The P values for each sample combination were calculated using ANOVA. The Tukey-Kramer test compared the mean values ( $\alpha=0.05$  and  $\alpha=0.01$ ).

## ELISA test for global 5-mC DNA

DNA isolation was performed using the phenol-chloroform method, with 150 mg of an aliquot of leaves frozen in liquid nitrogen ([Sambrook and Russell, 2006](#)). 2 µl of proteinase K and 1 µl of RNase (Sigma-Aldrich) were added to the plant material homogenized in 1 ml of TE buffer (10 mM Tris-HCl, 10 mM EDTA, 100 mM NaCl, 2% SDS), the whole was incubated at 37°C for 30 minutes and then at 95°C for 5 minutes to stop the reaction. After adding a 1:1 v/v mixture of phenol and chloroform, the samples were vigorously shaken and then centrifuged for 12 minutes at 4°C (10000 × g). The upper phase was collected in a new tube, and 400 µl of a mixture of chloroform and isoamyl alcohol (2:1 v/v) was added, followed by repeated shaking and centrifugation for 12 minutes at 4°C (10000 × g). The upper phase was harvested again, and 180 µl of isopropanol was added, with the samples incubated for 10 minutes at room temperature and centrifuged for 12 minutes at 4°C (10000 × g). The supernatant was discarded, and the pellet was left for 10 minutes in open tubes at 25°C to dry. After this time, 30 µl of DEPC water (Bioshop) was added to the tests. The quality control of the obtained DNA was performed both by the electrophoretic method and quantitative and qualitative measurements on the NanoDrop 2000 device (Thermo Fisher Scientific). The samples were diluted with DEPC water to a concentration of 0.1 µg DNA\*µl<sup>-1</sup> of the solution and then frozen at -20°C, thus storing them for further analysis.

According to the manufacturer's protocol, global 5-mC detection was performed with the 5-mC ELISA kit (Zymo Research, United States). 100 ng of each probe was added to a PCR tube and brought to 100 µl with 5-mC Coating Buffer. Next, all DNA samples were denatured for 5 minutes (98°C) and immediately transferred to ice. After cooling, samples were added to the wells on the plate, covered with foil, and incubated at 37°C for 1 hour. After incubation, the probes were washed and blocked in 5-mC ELISA Buffer. The next

step was the addition of the antibody. 100  $\mu$ l of the antibody mix containing Anti-5-Methylcytosine and Secondary Antibody were added. Plates were incubated at 37°C for 1 hour. After that time, each well was washed 3 times with 5-mC ELISA Buffer. In the last step, 100  $\mu$ l of HRP Developer was added to each well and allowed to develop color for 10-60 minutes in RT. Absorbance was read at 450 nm using an ELISA plate reader (Tecan, Infinite F50 Plus). The percentage of 5-mC was calculated using the following formula:

$$\% \text{ 5m-C} = e^{\left\{ \frac{\text{Absorbance-y-intercept}}{\text{Slope}} \right\}}$$

## Protein immunoprecipitation

Protein immunoprecipitation was performed according to the protocol described by Zhao et al. (2017). Potato leaves (0.75 g) were ground to a fine powder in liquid nitrogen. The powder was suspended in 375  $\mu$ l of binding buffer (50 mM Tris-HCl [pH 8.0], 100 mM NaCl, 1 mM EDTA, 0.5% NP-40, 1% protease inhibitor cocktail (Merck Group, Darmstadt, Germany)). Homogenates were centrifuged at 16000  $\times$  g for 10 min, and the supernatants were transferred to the fresh tube. The protein concentration was measured by the Bradford assay with bovine serum albumin (BSA) as the standard protein (Bradford, 1976). Protein samples (2.5 mg) were incubated overnight with an anti-nitrotyrosine polyclonal antibody (Thermo Fisher Scientific, Waltham, Massachusetts, United States) at 8  $\mu$ g/1 mg of protein at 4°C with gentle rotation in a total volume of 450  $\mu$ l. Simultaneously, protein samples used as the negative control were incubated without antibodies. After incubation, 400  $\mu$ l of 50% protein G beads (Merck Group, Darmstadt, Germany) (in PBS buffer) were added to the solution for overnight incubation at 4°C with gentle rotation. The supernatants (unbound proteins) were removed by carefully washing the beads once with 2.5 ml of binding buffer, twice with 2.5 ml of washing buffer 1 (50 mM Tris HCl [pH 8.0], 100 mM NaCl, 1 mM EDTA), once with 2.5 ml of washing buffer 2 (50 mM Tris [pH 8.0], 100 mM NaCl, 1 mM EDTA, 10% acetonitrile [ACN]) and once with 2.5 ml of water. Nitrotyrosine-containing proteins were eluted from the beads with 1 ml of low-pH acetonitrile solution (0.5% TFA, 25% ACN) and collected in 10 fractions. The most protein-abundant fractions were selected based on SDS-PAGE analysis and combined. The protein concentration was calculated based on SDS-PAGE analysis by summing the intensity of the pixels within each protein band image with BSA as the standard protein.

## Western blot

Equal amounts (0.2  $\mu$ g) of nitrotyrosine-containing proteins were incubated with sample buffer (62.5 mM Tris-HCl, pH 8.5, 10% sucrose, 2% SDS, 0.025% bromophenol blue, 0.1 M

dithioerythritol) at 95°C for 3 min and separated by standard SDS-PAGE in 12% polyacrylamide gels, electrotransferred on to a PVDF membrane and immunostained with antibodies against the anti-S-adenosylhomocysteine hydrolase (n-terminal) antibody (Merck Group, Darmstadt, Germany) (1/2000, v/v) in 1% BSA/TBS-T at 4°C overnight. After washing the membrane, it was treated with horseradish peroxidase-conjugated goat anti-rabbit IgG antibody (1/25000, v/v) in TBS-T for 1 h. According to standard procedures, the signals were visualized using the chemiluminescence method and quantified using the Image Lab™ software (Bio-Rad; Hercules, CA, USA). The statistical significance of the differences in signal intensity was analyzed using Student's *t*-test at  $P < 0.05$ .

## Statistical analysis

All the experiments included three independent experiments in at least three replications. For each experiment, the means of the obtained values were calculated along with standard deviations. The analysis of variance was conducted, and the least significant differences (LSDs) between means were determined using Tukey's test at the levels of significance  $\alpha = 0.05$  (\*) and  $\alpha = 0.01$  (\*\*). Statistical analyses were performed using Microsoft Excel 2016 and R statistical software (version 4.1.2).

## Results

### Time-dependent NO overproduction after pathogen or GSNO treatment

The experiments were carried out on the potato leaves of two resistant cultivars giving an HR-type response with a corresponding avr *Phytophthora infestans* isolate and analyzed NO-mediated changes in the early hours after inoculation, decisive for plant immunity. In agreement with our previous findings (Drozda et al., 2022), a pathogen-induced biphasic NO burst was shown. We identified two waves of NO overproduction consisting of an initial sharp increase (at 3 hpi), subsequent decline (at 6 hpi), and a second (at 24 hpi) pronounced phase of NO generation (Figure 1A).

Nitric oxide emitted from potato leaves treated with 250  $\mu$ M GSNO was even twice higher than from avr *P. infestans* inoculated leaves during the first two hours after the treatment, measured by the chemiluminescence method (Figure 1B). However, the initially high NO level from GSNO diminished temporarily, in contrast to the second re-increase (at 6 hpi) after the pathogen challenge, which is also observed using the cell-permeable NO fluorescent probe – CuFL (Figure 1A). Control or H<sub>2</sub>O-treated leaves showed low basal NO production,

and 200  $\mu\text{M}$  cPTIO scavenged endogenous NO in potato leaves (Figure 1B).

## Enhanced NO level promotes transient upregulation of histone methyltransferase SUVH4-mediated H3K9me2 and DNA hypermethylation

To investigate the global DNA methylation status, we performed an ELISA assay and found that the level of 5-mC DNA significantly increased after inoculation. The pathogen triggered an almost 2-fold enrichment of 5-mC levels from 1 to 48 hpi (Figure 2). Similarly, GSNO treatment heightened DNA methylation from 3 to 24 h compared to cPTIO, respectively (Figure 2). These data indicate a rise in NO-mediated DNA global hypermethylation (growth to 50-55%).

Also, TG-line showed a significant increase in 5-mC level after *avr P. infestans* or GSNO treatment, similarly to the cv. Sarpo Mira (Supplementary Figure S1). Our results showed that elevated NO production (from endogenous or exogenous sources) resulted in DNA hypermethylation in two resistant potato cultivars in response to *avr P. infestans* or GSNO.

The CMT3 chromomethylase is required to maintain DNA methylation preferentially in the CHG context. The CMT3 activity depends on the H3K9me2 mark driven by SUVH4/KYP methyltransferase to guide DNA methylation (Pikaard and Scheid, 2014).

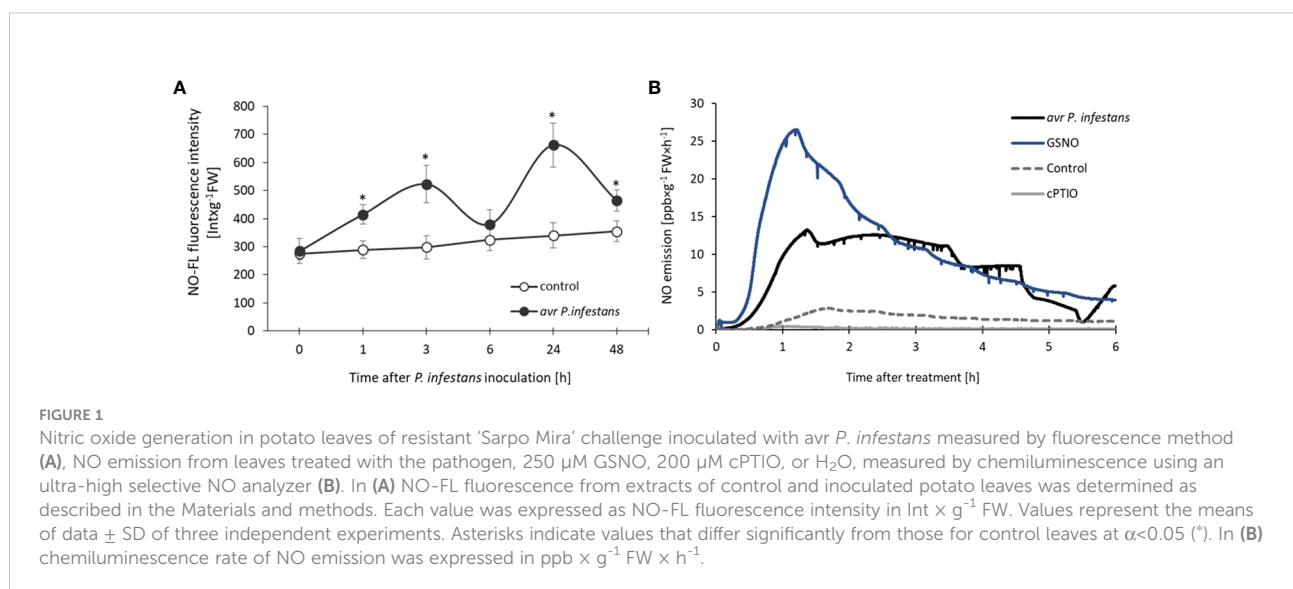
The obtained data concerning CMT3 gene expression revealed approx. a 2-fold increase (at 1-3 h) correlated in time with the first peak of biphasic NO overproduction after the pathogen challenge (Figure 1 and Figure 3A). Interestingly, the SUVH4 expression displayed a similar transcriptional profile as

CMT3, manifested in a transient increase of gene expression at 1-3 h in response to pathogen inoculation or GSNO exposure (Figure 3B). We also found enrichment of SUVH4-mediated H3K9me2 mark at 3 h on the promoter region of the *R3a* gene after the *avr P. infestans* challenge or GSNO (Figure 3C). Next, the same region of the promoter was analyzed at 6 h. The results showed that a decrease in H3K9me2 mark deposition positively correlated with the time-dependent downregulation of SUVH4 during the same period.

The JMJ706 has been documented as a histone demethylase, precisely removing H3K9me2, thus disassembling heterochromatin from the repressive state (Sun and Zhou, 2008; Qian et al., 2015). The results exhibited different trends in the JMJ706 transcript profile for GSNO and the pathogen. The data showed that JMJ706 transcription first drastically increased (a 4-fold growth) and then gradually diminished in the following hours after GSNO treatment (Figure 3D). In contrast, JMJ706 gene expression gradually increased up to 24 hpi and then decreased slightly in potato leaves challenged with *avr P. infestans* (Figure 3D). Thus, these results indicate that the transcriptional changes of JMJ706 histone demethylase occur largely independently in response to GSNO or the pathogen.

## Pathogen downregulates SAHH gene expression and SAHH protein undergoes Tyr-nitration

Given the role of SAHH in maintaining methylation homeostasis and that the CMT3 pathway is uniquely sensitive to SAHH impairment (Mull et al., 2006), we further focused on SAHH transcriptomic and post-transcriptomic changes after the pathogen inoculation or GSNO exposure.



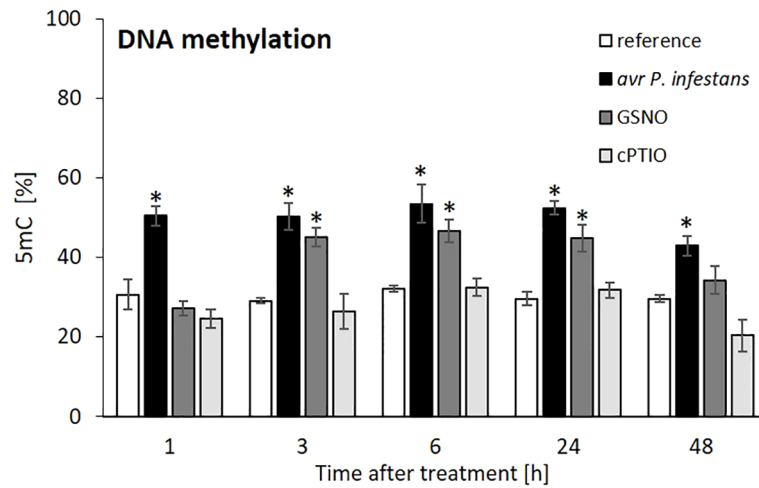


FIGURE 2

Effect of *avr P. infestans* or GSNO on global DNA methylation in potato leaves of cv. Sarpo Mira. The ELISA test of 5-mC DNA level was performed at selected time points at 1-48 h after GSNO, cPTIO treatment, or challenge inoculation. There were no significant changes in the absolute values of the analyzed 5-mC levels after the leaves spraying with water. Values represent the means of data  $\pm$  SD of at least three independent experiments. Asterisks indicate values that differ significantly from water-treated (reference) potato leaves at  $\alpha < 0.05$  (\*).

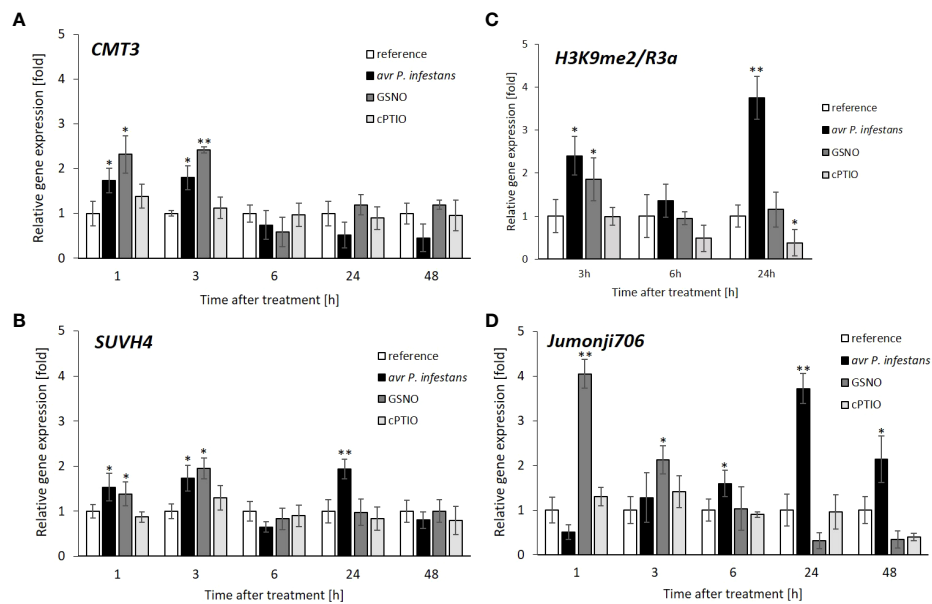


FIGURE 3

Functional link between histone and DNA methylation due to potato leaves treatment with pathogen or GSNO. *CMT3* DNA methyltransferase expression profile (A), *SUVH4* histone methyltransferase expression profile (B), distribution levels of *SUVH4*/mediated H3K9me2 on the promoter sequence of *R3a* (C), *JMJ706* histone demethylase expression profile (D). RT-qPCR gene expression of *CMT3*, *SUVH4*, and *JMJ706* was analyzed in potato leaves (at 1-48 h) after treatment with GSNO, cPTIO, water, or *avr P. infestans* inoculation, respectively. ChIP-qPCR analyses were performed in potato leaves at selected time points (3-24 h) after treatment with GSNO, cPTIO, water, or *avr P. infestans* inoculation. Data are presented as X-fold enrichment (Komar et al., 2016). The relative amount of immunoprecipitated chromatin fragments (as determined by real-time PCR) from the above treatment variants were compared with the reference (arbitrarily set to 1). There were no significant changes in the absolute values of the analyzed transcript levels after the leaves spraying with water. Each experiment included at least three independent measurements per sample. *P* values for each sample combination were calculated using ANOVA, and mean values were compared using the Tukey-Kramer test ( $\alpha = 0.05$  (\*) and  $\alpha = 0.01$  (\*\*)).

The *SAHH* gene expression was transiently downregulated markedly at 6 hpi, and then increased after the pathogen challenge (Figure 4A). Western analyses confirmed that *avr P. infestans* induced SAHH tyrosine nitration, mainly at 6 hpi, which correlated with the time of SAHH transcript inhibition (Figures 4A-C). In turn, GSNO application caused an early increase, followed by the *SAHH* expression return to the baseline level (Figure 4A).

Data indicate that a drastic *SAHH* inhibition at 6 h after GSNO or pathogen treatment correlated with transcriptional inhibition of *CMT3* functionally linked to *SUVH4* mediated by H3K9me2 mark deposition. At a later stage (at 24–48 h), only the pathogen provoked *SAHH* and *JMJ706* gene expression to rise again.

## Potato *R3a* gene is likely to be controlled by the RdDM pathway

To determine how NO-mediated signaling or transnitrosation processes affect the RdDM pathway, the expression of two essential genes of this pathway, *DICER (DCL3)* and *ARGONAUTE (AGO4)*, was examined. The time-dependent analysis of *DCL3* and *AGO4* expression revealed a drastic increase (approx. 3-fold) at 1 hpi, followed by a gradual decrease until 6 hpi in response to the pathogen challenge (Figures 5A, B). Interestingly, *DCL3* and *AGO4* transcription tended to rise later (at 24–48 hpi) but only after inoculation. Similar growth (a 2-fold increase) of transcriptional levels for *DCL3* and *AGO4*, mainly at 3 h, was found after GSNO treatment (Figures 5A, B).

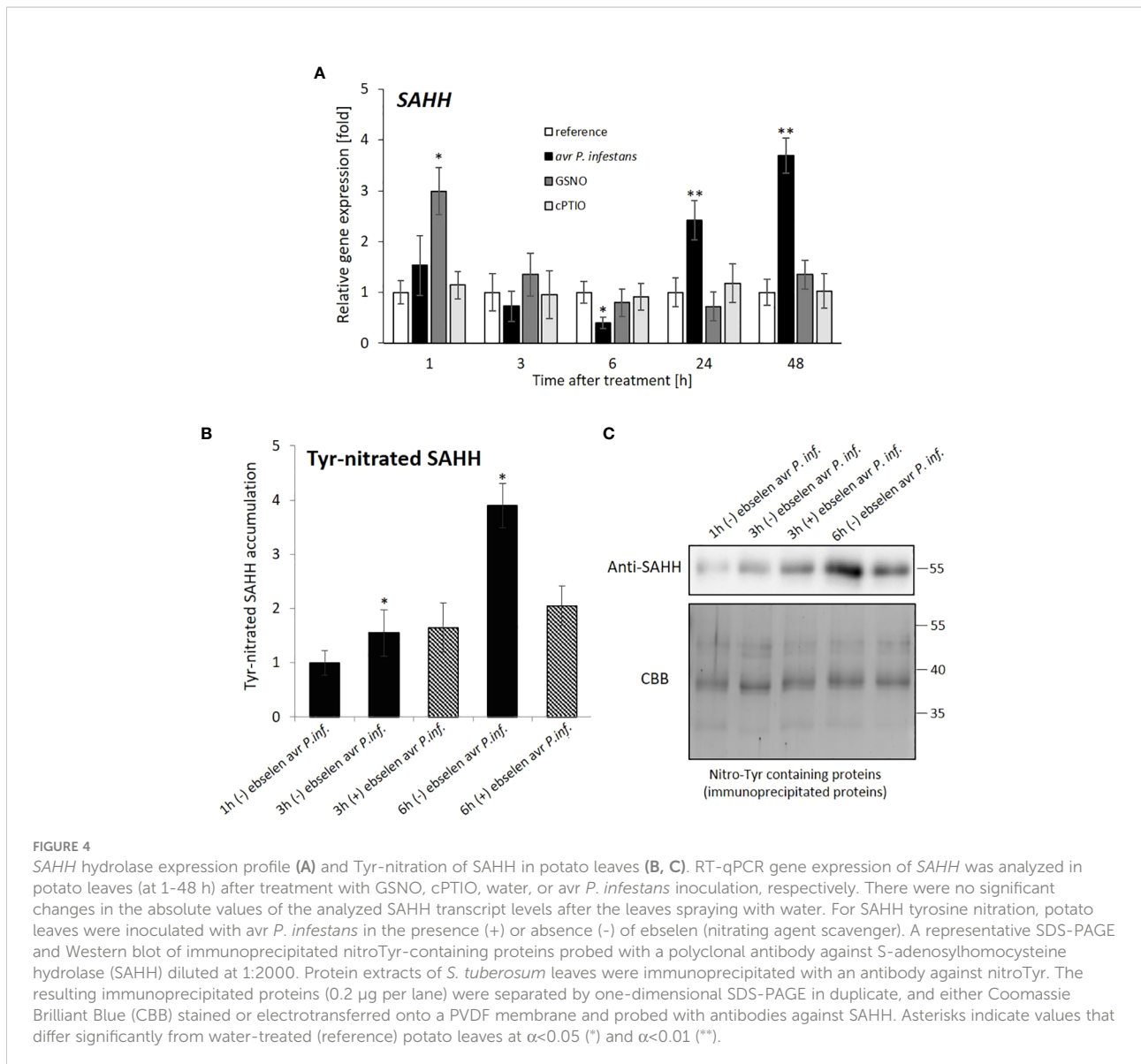


FIGURE 4

*SAHH* hydrolase expression profile (A) and Tyr-nitration of SAHH in potato leaves (B, C). RT-qPCR gene expression of *SAHH* was analyzed in potato leaves (at 1–48 h) after treatment with GSNO, cPTIO, water, or *avr P. infestans* inoculation, respectively. There were no significant changes in the absolute values of the analyzed SAHH transcript levels after the leaves spraying with water. For SAHH tyrosine nitration, potato leaves were inoculated with *avr P. infestans* in the presence (+) or absence (-) of ebselen (nitrating agent scavenger). A representative SDS-PAGE and Western blot of immunoprecipitated nitroTyr-containing proteins probed with a polyclonal antibody against S-adenosylhomocysteine hydrolase (SAHH) diluted at 1:2000. Protein extracts of *S. tuberosum* leaves were immunoprecipitated with an antibody against nitroTyr. The resulting immunoprecipitated proteins (0.2 µg per lane) were separated by one-dimensional SDS-PAGE in duplicate, and either Coomassie Brilliant Blue (CBB) stained or electrotransferred onto a PVDF membrane and probed with antibodies against SAHH. Asterisks indicate values that differ significantly from water-treated (reference) potato leaves at  $\alpha < 0.05$  (\*) and  $\alpha < 0.01$  (\*\*).



The domains rearranged methyltransferase 2 (DRM2) responsible for *de novo* DNA methylation in tandem with RdDM components was differentially expressed in the case of both treatments. The pathogen weakly affected *DRM2* gene expression, except for a transient upregulation (up to a 2-fold increase), mainly at 6 and 24 hpi (Figure 5C). In turn, GSNO initially (at 1 h) induced a drastic increase (more than 3-fold) of the mRNA transcript level for *DRM2*, which gradually decreased in the following time points after the treatment.

It was well documented that the miR482 family regulates gene expression of target mRNA associated with silencing the *R3a* gene (Li et al., 2012; Shivaprasad et al., 2012). The potato *R3a* gene encodes key immune leucine-rich repeat receptors, which overexpression triggered HR-type immunity to late blight (Kuźnicki et al., 2019). Therefore the challenge was understanding how NO-enhancing potato resistance might affect miRNA and *R* gene interaction.

Transcriptional profiling of *miR482e* revealed a time-dependent upregulated transcript level (a 3.5-fold increase) at 3 hpi, which markedly decreased in the following 6–24 h after the pathogen challenge or GSNO treatment when compared to cPTIO (Figure 6A).

Interestingly, a study on target *R* gene expression showed enhanced mRNA transcript accumulation for the *R3a* gene at 6 hpi after inoculation (Figure 6B). Also, upon GSNO application, the *R3a* gene expression displayed a similar trend of transcriptional activity peaking at 6 h, which was even more pronounced in response to GSNO than the pathogen (Figure 6C). Generally, our data provided evidence that a transient decrease in *miR482e* expression resulted in an increase in *R3a* gene expression at the same time point (6 h) after pathogen or GSNO treatment.

Notably, a similarly time-dependent negative correlation was found between *miR6026* and *Rpi-phu1* transcript accumulation in the TG line of potato leaves at 6 h, after GSNO or pathogen challenge (Supplementary Figure S2).

Our study revealed a relationship between elevated NO levels (at 3 h) and upregulated miRNA, suppressing the *R* gene expression. Next, the transient decline of NO generation (at 6 h) simultaneously with downregulated miRNA potentiated the *R* gene transcription. Based on these results, we suggest that the biphasic waves of NO burst in NO-mediated miRNA regulation appear crucial in establishing the late blight resistance to avr *P. infestans* by controlling *R* gene expression.

## ***ROS1* demethylase contributes to *R3a* upregulation**

Next, we tried to explain whether the previously observed NO-mediated increase of the global 5-mC DNA level was due to the inhibition of demethylation processes; thus, the corresponding mRNA transcript levels for DEMETER (DME)

and DEMETER-LIKE (DML) were quantified. The pathogen did not influence *StDME*, while the *DML-like glycosylase* transcript was slightly upregulated in the following time points after inoculation (Figures 7A, B). Both *StDME* and *DML-like* genes, except for early upregulation, were also not responsive to the GSNO treatment (Figures 7A, B). It is not surprising, given that NO bioactivity might (if any) affect DNA demethylases mainly at the post-translational level.

The *REPRESSOR OF SILENCING 1 (ROS1)* is activated in vegetative tissue and contributes to stress responses. The expression of *ROS1* is regulated transcriptionally by a complex balance between DNA methylation and demethylation status. Our result indicated a strong association between both treatments regarding *ROS1* transcriptional activity (Figure 7C). A significant increase (more than 4-fold) in *ROS1* transcript accumulation was found mainly at 6 h in response to avr *P. infestans* or GSNO. Our data suggest that elevated expression of *ROS1* could be a consequence of the enhanced activity of *de novo* methylation of the RdDM pathway found earlier.

## **GSH otherwise affects DNA (de) methylation than pathogen or GSNO**

To verify NO's contribution to analyzed processes, leaves were treated independently with reduced glutathione (GSH) as an additional control. Since the reductive decomposition of GSNO might influence GSH formation, and GSH is involved in controlling epigenetic regulation at different levels (Saravana Kumar et al., 2020), we examined how GSH might affect the genes involved in the transcriptional network of DNA (de) methylation. The obtained results are presented in Supplementary Figures S3A–K. GSH treatment resulted in a progressive and significant increase in *DRM2* expression up to 24 h and insignificant changes in SAHH and CMT3 transcripts accumulation, related to the reference (Supplementary Figures S3A–C). Moreover, GSH did not change *DCL3* and *AGO4* gene expression levels (Supplementary Figures S3D, E) and insignificantly altered *StDME* and *DML-like* genes transcription compared to controls (Supplementary Figures S3F, G). Unexpectedly, GSH treatment induced a progressive increase (up to 3.5-fold) in *ROS1* (Supplementary Figure S3H), correlated in time with enhanced *DRM2* gene expression. Histone *SUVH4/KYP* methyltransferase gene expression was significantly upregulated, but the *JMJ706* gene was not responsive to GSH treatment (Supplementary Figures S3I, J). Together, these data suggest that GSH treatment could also change DNA (de)methylation homeostasis manifested mainly by increasing *DRM2* methyltransferase and *ROS1* demethylase gene expression. Its effect on the other investigated genes was weaker and different from GSNO. However, the analysis confirmed that GSH did not affect global 5-mC DNA levels in the following hours after the treatment (Supplementary Figure S3K).

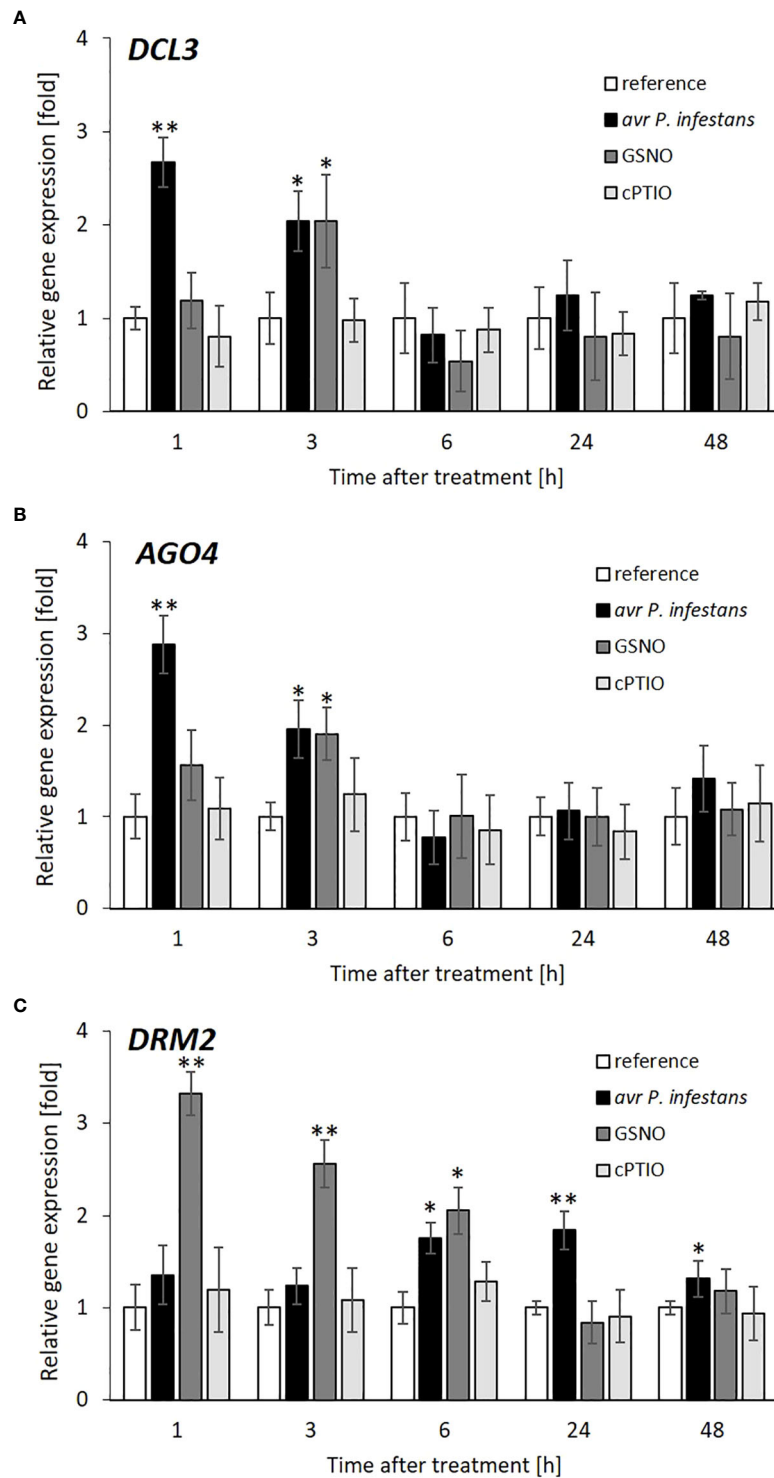


FIGURE 5

Effect of *avr P. infestans* or GSNO on RdDM pathway. RT-qPCR analysis of the *DICER* (*DCL3*) (A), *ARGONAUTE* (*AGO4*) (B) domains rearranged methyltransferase 2 (*DRM2*) (C), respectively, were performed at selected time points at 1–48 h after GSNO, cPTIO treatment or challenge inoculated. There were no significant changes in the absolute values of the analyzed transcript levels after the leaves spraying with water. Values represent the means of data  $\pm$  SD of at least three independent experiments. Asterisks indicate values that differ significantly from water-treated (reference) potato leaves at  $\alpha < 0.05$  (\*) and  $\alpha < 0.01$  (\*\*).

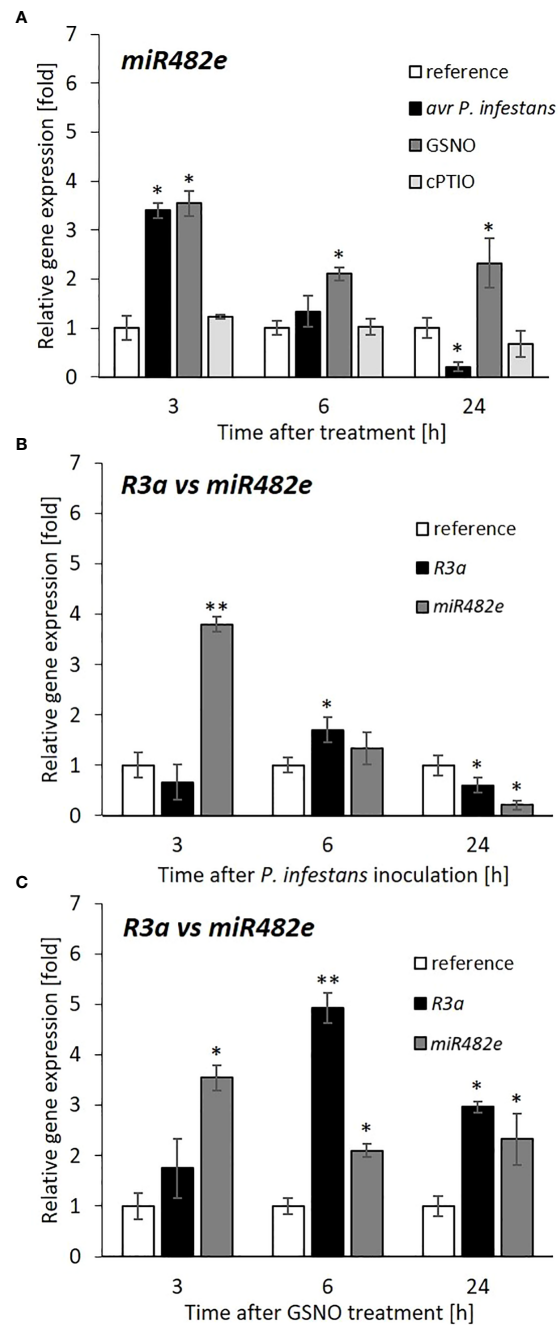


FIGURE 6

Expression profile of *miR482e* and its target, *R3a* gene after *avr P. infestans* or GSNO treatment. RT-qPCR analysis of the *miR482e* (A), relative *miR482e* versus *R3a* genes expression after pathogen (B), or GSNO (C) treatment, respectively. All data in (B) and (C) regarding *R3a* and *miR482e* transcript levels referred to the separate reference presented as 1 for *R3a* and *miR482e*, respectively. Values represent the means of data  $\pm$  SD of at least three independent experiments. Asterisks indicate values that differ significantly from water-treated (reference) potato leaves at  $\alpha < 0.05$  (\*) and  $\alpha < 0.01$  (\*\*).

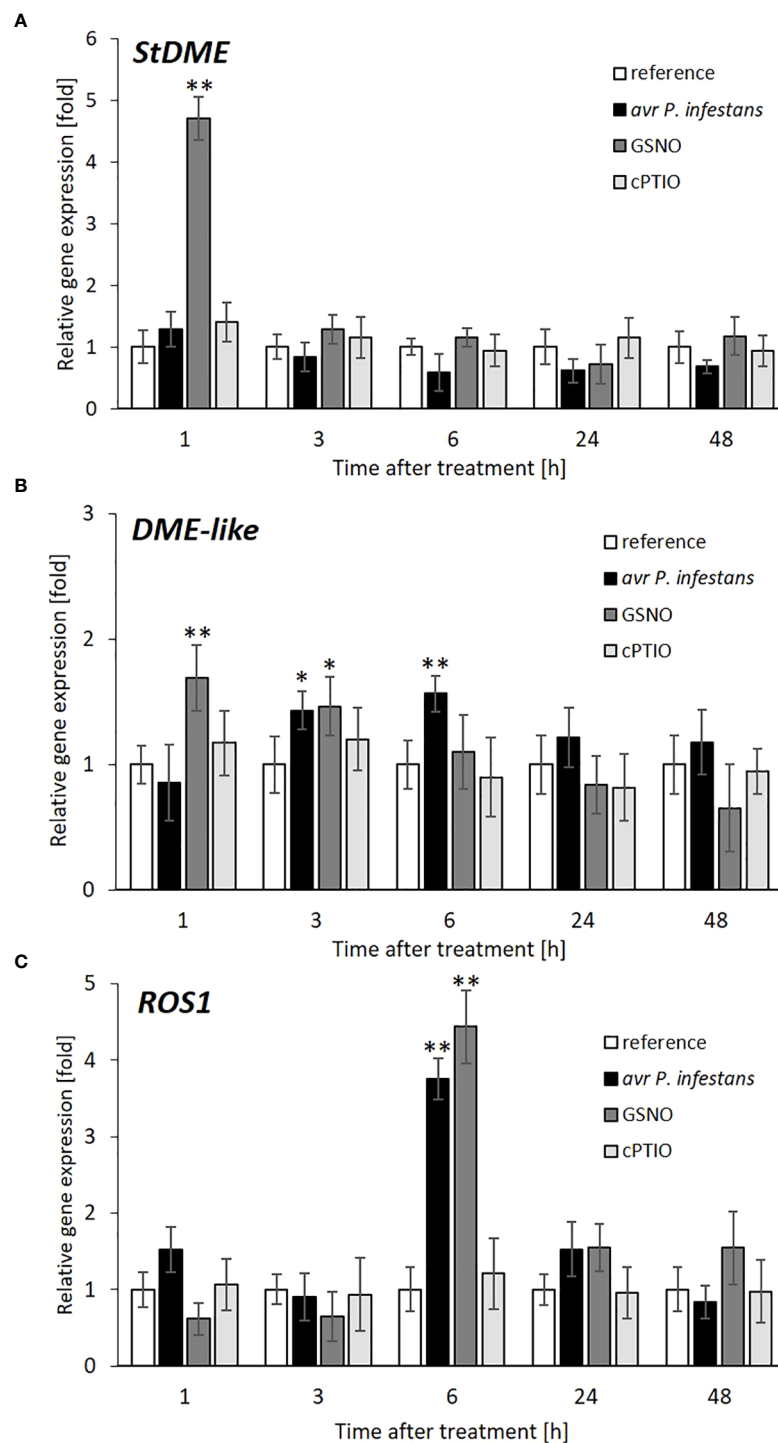


FIGURE 7

DNA demethylase gene expression after pathogen or GSNO treatment. RT-qPCR analyses of the *StDME* (A), *DME-like* (B), and *ROS1* (C), respectively, were performed at selected time points at 1–48 h after GSNO, cPTIO treatment, or challenge inoculation. There were no significant changes in the absolute values of the analyzed transcript levels after the leaves spraying with water. Values represent the means of data  $\pm$  SD of at least three independent experiments. Asterisks indicate values that differ significantly from water-treated (reference) potato leaves at  $\alpha < 0.05$  (\*) and  $\alpha < 0.01$  (\*\*).

## Discussion

### Pathogen similarly to GSNO induces potato DNA hypermethylation

Nitric oxide is a multifaceted mediator of plant immunity, exerting numerous effects depending on the kinetics of NO generation, cell localization, local concentration, distribution, and metabolic consumption. In addition, the impact of NO bioactivity on plant pathophysiology is affected by the presence of additional free radicals, their scavengers, and the genetic background of the host or pathogen. Therefore, the NO concentration and temporal-dependent effects determine interactions with different cell targets leading to negative or positive disease outcomes (Thomas, 2015; Sánchez-Vicente et al., 2019).

Our recent findings have provided insights into NO-associated potato immunity to avr *P. infestans*, including redox- and time-dependent crosstalk between histone lysine and arginine methylation, which contributes to reprogramming defense genes (Drozda et al., 2022). These data concerning the pathogen-induced biphasic pattern of NO burst revealed that rather the decline phase and a low level of NO due to GSNOR activity might be decisive in facilitating the upregulation of stress-sensitive genes. The present research extends our previous study by examining the NO role in regulating DNA methylation, remaining in dialog with histone methylation in potato immunity to late blight.

Data presented here show that the pathogen rapidly elicited 5-mC DNA hypermethylation in two potato genotypes. A significant increase in the global methylation level was similarly observed for GSNO treatment.

It was shown by Fan et al. (2012) that exogenous NO (50  $\mu$ M sodium nitroprusside – SNP) could protect *Dendrobium huoshanense* against drought stress by increasing the demethylation ratio of genomic DNA regions methylated by stress. The other research group using the same MSAP (the methylation-sensitive amplified polymorphism) technique and gel-blot analyses presented DNA hypomethylation mainly at the CHG sites in correlation with transcriptional upregulation of genes and TEs in rice treated with high concentrations (0.5–1.0 mM) of SNP (Ou et al., 2015). However, excessive amounts of NO emitted from 0.5 mM SNP caused severe stress symptoms with inhibition of shoot and root growth in rice seedlings and complete silencing of the DNA chromomethylase 3 (*OsCMT3*) gene. In the same experiment, SNP exhibited hypermethylation in rice seedlings of two genotypes treated with a 50  $\mu$ M (a 10-fold lower concentration).

Recently, it has been shown that transmethylation activity linked to TEs and stress-responsive gene expression is affected by GSNOR activity (Rudolf et al., 2021). GSNO reductase-deficient (*gsnor1-3*) *Arabidopsis* seedlings with a high NO level

showed enhanced DNA methylation and reduced expression of TEs and stress-responsive genes compared with the wild type. The *Arabidopsis sahh1* knock-down mutant (*S*-adenosylhomocysteine hydrolase) with a decreased methylation index revealed enrichment of hypomethylated sites in defined genomic regions of the methylome.

Our study suggests that the high global 5-mC DNA levels in the following time points after potato inoculation were probably due to the inhibition of TEs and defense gene suppressors. Although the expression of TEs was not analyzed in this experimental approach, the previous study revealed a transient increase in mRNA transcript levels for the *NPRI*, *WRKY1*, and *PR1* key defense genes in a successful potato response to avr *P. infestans* (Drozda et al., 2022).

So far, no direct correlation between NO and DNA methylation has been fully confirmed in mammals; however, some data recognized an association between NO production or inducible nitric oxide synthase (iNOS) expression and DNA methylation level (Huang et al., 2012). When gastric cancer cells were treated with *Helicobacter pylori*, they showed enhanced NO synthesis, increased methyltransferase (DNMT) activity, and DNA methylation. The iNOS inhibitor (L-NAME) or demethylating agent returned both NO and methylation levels to the baseline. This documented that in the presence of NO-producing macrophages, *H. pylori*-induced epigenetic silencing of the tumor suppressor *runx3* gene via DNA methylation was reversed by treatment with a NOS inhibitor. Other experiments also revealed the gene-silencing effects through DNA methylation after SNP treatment of rat RINm5F cells, and here also, the outcomes were thoroughly arrested by the iNOS inhibitor (Hmadcha et al., 1999).

### SUVH4 mediated H3K9me2 functionally cooperates with DNA methylation in response to pathogen or GSNO

The main idea for *de novo* DNA methylation in plant resistance is the maintenance of plant genome stability by preventing TEs movement or blocking their binding to the specific 5-mC DNA sequences to avoid inhibition of defense genes by activating suppressor gene transcription (Downen et al., 2012; Viggiano and de Pinto, 2017; Huang and Jin, 2021). The interaction of CMT3 and KYP/SUVH4 constitutes a self-reinforcing loop in repressive DNA methylation, while histone modification marks specify one another to maintain an epigenetic state (Pikaard and Scheid, 2014; West et al., 2014). The KYP gene mutation reduced CHG methylation, and the *CMT3* knockdown mutant revealed reduced histone methylation (Du et al., 2015; Wendte et al., 2019; Nozawa et al., 2021). Besides the direct link between CMT3 and KYP/SUVH4, an indirect association was also documented between

SUVH4-mediated H3K9me2 and the RdDM pathway (Gouil and Baulcombe, 2016; Li et al., 2016).

In this study, GSNO treatment or pathogen-induced excessive amounts of NO caused enhanced DNA methylation correlated with a SUVH4-mediated high H3K9me2 level on the promoter *R3a* gene. When NO production and H3K9me2 declined (at 6 h), *R3a* gene transcript upregulation resulted. This finding indicates that reduced NO bioavailability, probably regulated by GSNOR, is pivotal in establishing potato resistance to the pathogen. The data confirmed our previous study since histone methylation is functionally linked to DNA methylation (Drozda et al., 2022).

Also, the GSNOR1-deficient mutant (*gsnor1-3*) with an elevated level of NO showed a significant increase in the global H3K9me2 level, in contrast to *sahh1* plants resulting in loss of the H3K9me2 mark (Rudolf et al., 2021).

Mammal cancer cells exposed to either DETA/NO and cellular sources of NO demonstrated changes in H3K9 methylation patterns, which is considered a gene-silencing mark (Hickok et al., 2013). The level of H3K9me2 became enriched around the promoter regions of most genes that were downregulated by tumor-associated NO overproduction, suggesting a causal link between the change in histone PTMs and altered gene expression related to the progression of more aggressive cancers (Hickok et al., 2013; Vasudevan et al., 2015).

There is evidence that NO exerts its regulatory function on DNA methylation and gene expression via S-nitrosylation of the enzyme engaged in maintaining a proper cellular methylation state. It has been demonstrated in *Arabidopsis thaliana* that methionine synthase (MS), S-adenosyl methionine synthase (SAMS), or S-adenosylhomocysteine hydrolase (SAHH) are affected by the reaction of NO with reactive thiols in cysteine (Cys) residues (Lindermayr et al., 2005; Abat and Deswal, 2009; Hu et al., 2014; Puyaubert et al., 2014; Hu et al., 2015). In addition to S-nitrosylation, crucial components of the SAM/SAH ratio undergo Tyr-nitration, as SAHH was found earlier in sunflower (Chaki et al., 2009) and potato (Arasimowicz-Jelonek et al., 2016). Also, in this study Tyr-nitration of SAHH in inoculated potato correlated in time (at 6 hpi) with the inhibition of SAHH transcript accumulation.

## Genes of the RdDM pathway responsive to nitric oxide are involved in potato immunity to late blight

Stress-induced *de novo* DNA methylation controlled by the RdDM pathway involves many regulators and primarily targets heterochromatic regions enriched with TEs and DNA repeat sequences (Cai et al., 2019; Huang et al., 2019). The functional relevance of individual methyltransferase/demethylase that controls plant immunity remains largely unknown, mainly due to the complex network and crosstalk between the different modulators that regulate resistance gene expression.

Our experiment exploring the *de novo* methylation pathway via the RdDM in disease regulation revealed an indirect link between NO and miRNAs, influencing the translation of target *R* genes. We found an opposite expression profile of *miR482e* and its target, the *R3a* gene involved in potato (cv. Sarpo Mira) immunity to late blight. This indicates that the transient decrease (at 6 hpi) in NO generation and downregulation of *DCL3* and *AGO4* diminished *miR482e* gene expression and allowed upregulation of the *R3a* gene. Notably, the following NO-responsive *miR6026* targets *Rpi-phu1* to trigger resistance response to avr *P. infestans* in the TG line has shown a similar effect. Consistently with these findings, also GSNO treatment provoked a time-dependent negative correlation between *R* and miRNA gene expression in both potato genotypes.

Recently published results showed that exogenous NO (SNP) could induce miRNAs in *Medicago sativa* plants subjected to drought stress (Zhao et al., 2019). The authors assumed that NO-sensitive miRNA downregulated transcription might play a positive regulatory role in drought stress response. As a result of deep sequencing analysis, it found that 24 known miRNAs and 31 novel miRNAs responded to NO under stress. Some of the exogenous NO reactive miRNAs targeted stress-responsive genes with the opposite expression profiles were engaged in enhanced drought tolerance. SNP-induced miR156 or miR399 downregulation enabled the synthesis of anthocyanins or positively regulated phosphate homeostasis in alfalfa responses to drought stress (Zhao et al., 2019). Among differentially expressed miRNAs that were explicitly induced or silenced by exogenous NO, the following miRNAs target genes or proteins, e.g., miR2513-5p (disease resistance protein), miR7696a-5p (chitin-binding; protein kinase) and miR398a-5p (Cu/Zn-superoxide dismutase copper chaperone) deserve special attention (Cohu et al., 2009; Devers et al., 2011; Eyles et al., 2013; Zhao et al., 2019).

An exciting relationship was found between NO and miRNA in controlling apoptosis in mammals (Lee et al., 2015). The NO-donor treatment (SNP) upregulated miR-1, which targeted Hsp-70, triggering apoptosis in osteoblasts. Moreover, the link between NO and the differential expression of numerous miRNAs was previously documented in the progression of various cancers and inflammatory diseases (de la Cruz-Ojeda et al., 2021). Differentiated upregulation of NOS expression is closely linked to antitumoral or oncogenic properties of nitric oxide, which are affected by multiple factors.

Importantly, our findings revealed that *DICER* (*DCL3*), *ARGONAUTE* (*AGO4*), and *DRM2* genes, the main components driving DNA methylation mediated by siRNAs, showed similar time-dependent profiles of transcriptional activity correlated with opposite miRNA/*R* gene expression and HR resistance to *Phytophthora infestans*.

In *Arabidopsis thaliana*, silencing of *AGO4* leads to increased susceptibility to the virulent bacterial pathogen *Pseudomonas syringae* (Agorio and Vera, 2007; Yu et al.,

2013). Also, other RdDM mutants, including *nrpe1*, *nrpd2*, *ago4*, *drd1*, and *rdr2*, showed reduced resistance to *P. syringae* (López et al., 2011), which indicates the critical importance of the RdDM pathway and TEs targeted specifically for DNA methylation in the regulation of plant immunity.

Recently reported in animals is a fascinating example of a potential mechanism for microbiota-dependent miRNA-based regulation of host gene silencing by NO-mediated S-nitrosylation (Seth et al., 2019). The authors have documented that S-nitrosylation of AGO2 in a nematode by NO derived from the microbiota-inhibited miRNA targets of *C. elegans*.

## Transient upregulation of *ROS1* correlates with potato *R3a* gene expression

DNA demethylases possess the Fe-S binding motif as their cofactor essential to catalyze the excision of 5-methylcytosine, followed by cytosine replacement through the base excision repair pathway. Under biotic stress conditions, various redox components, including NO, can alter DNA demethylation, disrupting the Fe-S cluster and repressing demethylase activity (Vasudevan et al., 2016; Socco et al., 2017).

Studies, which have been conducted for many years on mammals, provide essential insights into how NO can inhibit mononuclear non-heme iron dioxygenases enzymes, such as histone Jumonji C demethylases (JMJC) and DNA demethylase (Ten Eleven Translocation-TET) by producing a nitrosyl-iron complex in the active pocket of the enzyme or *via* formation of dinitrosyliron complexes (DNICs) that reduce the iron cofactor availability (Hickok et al., 2013; Cheng et al., 2014; Bovee et al., 2018; Palczewski et al., 2019). It was documented that a NO donor (DETA/NO) could inhibit the catalytic activity *in vitro* and the expression level of JMJC domain-containing histone demethylase (KDM3A) in a dose-dependent manner (Hickok et al., 2013). A similar effect was found when TET enzyme activity significantly decreased in cancer cells exposed to NO, supported by EPR studies showing that NO could directly bind to catalytic non-heme iron (Bovee et al., 2018).

*ROS1*, instead of TET, regulates plant developmental and stress responses (Gong et al., 2002), and its expression is influenced by the activity of the RdDM and active DNA demethylation pathways. The *ROS1* promoter in *Arabidopsis* contains a DNA methylation monitoring sequence (MEMS) that functions as an indicator to sense DNA methylation levels and regulates DNA methylation by controlling *ROS1* expression (Zhu, 2009; Lei et al., 2015; Williams et al., 2015).

In this study, the transcript level of *ROS1* drastically increased soon after *DRM2*, *DCL3*, and *AGO4* genes reached the maximum of their expression, demonstrating a tight interconnection with the RdDM pathway and facilitating *R3a* gene upregulation. Our research shows that *ROS1* might

counteract the DNA methylation pathway to prevent *R3a* gene silencing in potato exposed to GSNO or avr *P. infestans*.

Methylation-sensitive regulation of *ROS1* expression is robustly down-regulated in DNA methylation-defective mutants. The triple DNA demethylase *Arabidopsis* mutant (*ros1 dml2 dml3*) showed enhanced susceptibility to *Fusarium oxysporum* (Le et al., 2014). In turn, a hyper-methylated *ros1* mutant of *Arabidopsis*, which is affected in DNA demethylation, displayed enhanced susceptibility towards Pto DC3000 and attenuated resistance to *Hyaloperonospora arabidopsis*, in contrast to a hypomethylated *nrp1* mutant with impaired RdDM methylation (Yu et al., 2013; López Sánchez et al., 2016). Recently it was found that *ROS1* positively regulates basal resistance towards Pto DC3000 by counteracting RdDM activity (Halter et al., 2021). Cited authors documented that *ROS1*, by demethylating the *RMG1* (functional disease resistance gene) promoter, antagonizes *DCL2* or *DCL3* functions and facilitates proper flg22-triggered induction of this gene.

There is weak evidence for a direct NO effect on active DNA demethylation mechanisms in plants. However, NO may indirectly influence the demethylation process by forming DNIC or constitute complexes with iron-sulfur-containing proteins and non-heme iron proteins that affect their activity. The microarray analyses of *nia1nia2* with a decreased NO level showed *ROS1* upregulation (Gibbs et al., 2014). The infiltration of *Arabidopsis* leaves with 1 mM CysNO resulted in the downregulation of *ROS1* (Hussain et al., 2016).

Our experiment showed that other demethylase (*StDME* and *DML-like*) genes were rather not responsive to GSNO or pathogen treatment. Still, it may not be excluded that the increase in the global 5-mC DNA level in the presence of NO was due to an inhibition of demethylase activity coded by these genes.

## Conclusions

Our conclusions are based on the results obtained from the potato leaves exposed to biological (NO burst) or chemical (GSNO) NO sources. When comparing the effects, we found similarities and differences based on the NO origin, partially confirming the competency of NO signaling to affect expression profiles of DNA methylation/demethylation genes under stress. In potato response to avr *P. infestans*, the emphasis was placed on the timing and intensity of biphasic NO generation during NO burst, which influenced changes in *de novo* DNA methylation processes. This finding aligns with our previous concept postulated that biphasic NO production, downregulated by GSNOR activity, is required to trigger histone modifications and reprogram the transcriptional network of potato defense genes to avr *P. infestans* (Drozda et al., 2022).

This paper shows functional interconnections between SUVH4-mediated H3K9me2 and DNA methylation under

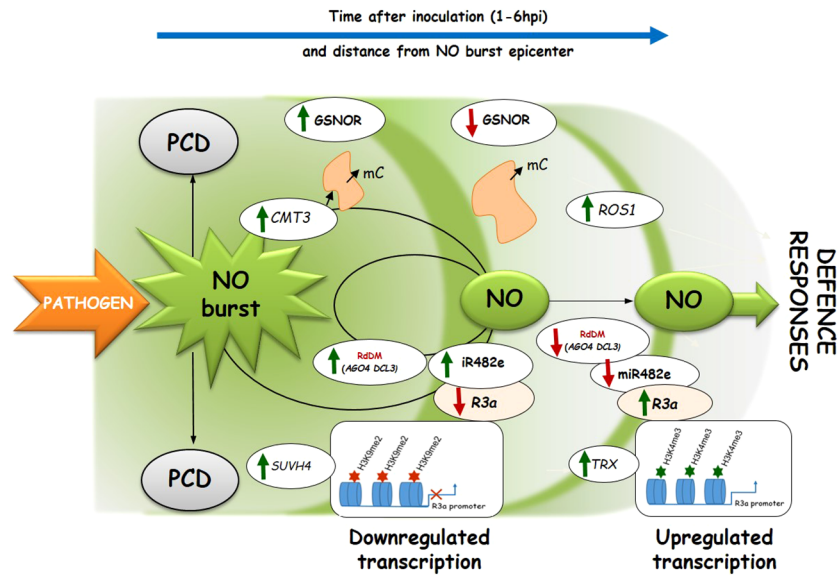


FIGURE 8

The proposed scheme illustrates the NO signaling effects on genes regulating DNA (de)methylation, being in dialog with histone methylation in potato leaves challenged with *avr P. infestans*. Pathogen-induced NO generation diminishes in the following hours after inoculation (at 1–6 hpi) and at further distances from the epicenter of the NO burst. Pathogen-induced NO signaling (at 3 hpi) promotes DNA methylation and upregulation of the RdDM pathway genes (*DCL3*, *AGO4*, *DRM2*, and *miR482e*), suppressing the *R3a* gene having high H3K9me2 level on its promoter. A drop in NO bioavailability (at 6 hpi) due to GSNOR activity (Drozda et al., 2022) results in the reduced inhibitory effect of the *miR482e* toward the corresponding *R3a* gene (having a high H3K4me3 level on its promoter), which favors potato resistance to *P. infestans*.

controlled NO levels in potato response to biotic stress. A timely decrease in NO bioavailability revealed a negative correlation between downregulated miRNAs and upregulated target *R* genes, favoring the resistance of two potato genotypes to late blight (Figure 8). Hopefully, future research will expand our patchy knowledge about epigenetic mechanisms including the NO-signaling in plant immunity to stress.

## Data availability statement

The original contributions presented in the study are included in the article/Supplementary Material. Further inquiries can be directed to the corresponding author.

## Author contributions

AD: Performing all plant and pathogen experiments, data analysis of gene expression. BK and AD: CHIP analysis and potato *in vitro* culture. YG: Performing NO detection and participation in *R* and miRNA gene expression. MA-J: Conceptualization, writing – review, and editing. JP: TG line culture and analysis. PJ: Western blot analysis. DK: Participation in statistical analyses. JF-W: Conceptualization, writing – original draft preparation, writing – review and editing with

contributions of all the authors. All authors have read and agreed to the published version of the manuscript. All authors contributed to the article and approved the submitted version.

## Funding

This research was funded by the Polish National Science Centre; project NCN No. 2017/25/B/NZ9/00905; The publication was co-financed within the framework of the Polish Ministry of Science and Higher Education's program: "Regional Initiative Excellence" in the years 2019–2022 (No. 005/RID/2018/19).

## Conflict of interest

The authors declare that the research was conducted in the absence of any commercial or financial relationships that could be construed as a potential conflict of interest.

## Publisher's note

All claims expressed in this article are solely those of the authors and do not necessarily represent those of their



affiliated organizations, or those of the publisher, the editors and the reviewers. Any product that may be evaluated in this article, or claim that may be made by its manufacturer, is not guaranteed or endorsed by the publisher.

## References

- Abat, J. K., and Deswal, R. (2009). Differential modulation of s-nitrosoproteome of *Brassica juncea* by low temperature: Change in s-nitrosylation of rubisco is responsible for the inactivation of its carboxylase activity. *Proteomics* 9, 4368–4380. doi: 10.1002/pmic.200800985
- Ageeva-Kieferle, A., Georgii, E., Winkler, B., Ghirardo, A., Albert, A., Hüther, P., et al. (2021). Nitric oxide coordinates growth, development, and stress response via histone modification and gene expression. *Plant Physiol.* 187, 336–360. doi: 10.1093/plphys/kiab222
- Agorio, A., and Vera, P. (2007). ARGONAUTE4 is required for resistance to *Pseudomonas syringae* in *Arabidopsis*. *Plant Cell* 19, 3778–3790. doi: 10.1105/tpc.107.054494
- Arasimowicz-Jelonek, M., and Floryszak-Wieczorek, J. (2011). Understanding the fate of peroxynitrite in plant cells – from physiology to pathophysiology. *Phytochemistry* 72, 681–688. doi: 10.1016/j.phytochem.2011.02.025
- Arasimowicz-Jelonek, M., and Floryszak-Wieczorek, J. (2019). A physiological perspective on targets of nitration in NO-based signaling networks in plants. *J. Exp. Bot.* 70, 4379–4389. doi: 10.1093/jxb/erz300
- Arasimowicz-Jelonek, M., Floryszak-Wieczorek, J., Izbiańska, K., Gzyl, J., and Jelonek, T. (2016). Implication of peroxynitrite in defence responses of potato to *Phytophthora infestans*. *Plant Pathol.* 65, 754–766. doi: 10.1111/ppa.12471
- Arora, R., Sharma, S., and Singh, B. (2014). Late blight disease of potato and its management. *Potato J.* 41, 16–40.
- Begara-Morales, J. C., Chaki, M., Sánchez-Calvo, B., Mata-Pérez, C., Leterrier, M., Palma, J. M., et al. (2013). Protein tyrosine nitration in pea roots during development and senescence. *J. Exp. Bot.* 64, 1121–1134. doi: 10.1093/jxb/ert006
- Bovee, R., Pham, V., Fernandez, J., Tretyakova, N., and Thomas, D. D. (2018). P-228 - nitric oxide is an epigenetic regulator of gene expression by directly controlling DNA methylation patterns. *Free Radic. Biol. Med.* 120, S114. doi: 10.1016/j.freeradbiomed.2018.04.375
- Bradford, M. M. (1976). A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Anal. Biochem.* 72, 248–254. doi: 10.1016/0003-2697(76)90527-3
- Cai, Q., He, B., Weiberg, A., Buck, A. H., and Jin, H. (2019). Small RNAs and extracellular vesicles: New mechanisms of cross-species communication and innovative tools for disease control. *PLoS Pathog.* 15, e1008090. doi: 10.1371/journal.ppat.1008090
- Chaki, M., Valderrama, R., Fernández-Ocaña, A. M., Carreras, A., López-Jaramillo, J., Luque, F., et al. (2009). Protein targets of tyrosine nitration in sunflower (*Helianthus annuus* L.) hypocotyls. *J. Exp. Bot.* 60, 4221–4234. doi: 10.1093/jxb/erp263
- Cheng, Z., Cheung, P., Kuo, A. J., Yukl, E. T., Wilmot, C. M., Gozani, O., et al. (2014). A molecular threading mechanism underlies jumonji lysine demethylase KDM2A regulation of methylated H3K36. *Genes Dev.* 28, 1758–1771. doi: 10.1101/gad.246561.114
- Chen, C., Ridzon, D. A., Broomer, A. J., Zhou, Z., Lee, D. H., Nguyen, J. T., et al. (2005). Real-time quantification of microRNAs by stem-loop RT-PCR. *Nucleic Acids Res.* 33, e179. doi: 10.1093/nar/gni178
- Cohu, C. M., Abdel-Ghany, S. E., Gogolin Reynolds, K. A., Onofrio, A. M., Bodecker, J. R., Kimbrel, J. A., et al. (2009). Copper delivery by the copper chaperone for chloroplast and cytosolic Copper/Zinc-superoxide dismutases: Regulation and unexpected phenotypes in an *Arabidopsis* mutant. *Mol. Plant* 2, 1336–1350. doi: 10.1093/mp/ssp084
- Cui, J., Luan, Y., Wang, W., and Zhai, J. (2014). Prediction and validation of potential pathogenic microRNAs involved in *Phytophthora infestans* infection. *Mol. Biol. Rep.* 41, 1879–1889. doi: 10.1007/s11033-014-3037-5
- Cui, H., Tsuda, K., and Parker, J. E. (2015). Effector-triggered immunity: From pathogen perception to robust defense. *Annu. Rev. Plant Biol.* 66, 487–511. doi: 10.1146/annurev-arplant-050213-040012
- de la Cruz-Ojeda, P., Flores-Campos, R., Dios-Barbeito, S., Navarro-Villarán, E., and Muntané, J. (2021). Role of nitric oxide in gene expression regulation during cancer: Epigenetic modifications and non-coding RNAs. *Int. J. Mol. Sci.* 22, 6264. doi: 10.3390/ijms22126264
- Del Castello, F., Nejamkin, A., Cassia, R., Correa-Aragunde, N., Fernández, B., Foresi, N., et al. (2019). The era of nitric oxide in plant biology: Twenty years tying up loose ends. *Nitric. Oxide* 85, 17–27. doi: 10.1016/j.niox.2019.01.013
- del Río, L. A. (2015). ROS and RNS in plant physiology: An overview. *J. Exp. Bot.* 66, 2827–2837. doi: 10.1093/jxb/erv099
- Devaux, A., Kromann, P., and Ortiz, O. (2014). Potatoes for sustainable global food security. *Potato Res.* 57, 185–199. doi: 10.1007/s11540-014-9265-1
- Devers, E. A., Branscheid, A., May, P., and Krajinski, F. (2011). Stars and symbiosis: MicroRNA- and MicroRNA\*-mediated transcript cleavage involved in arbuscular mycorrhizal symbiosis. *Plant Physiol.* 156, 1990–2010. doi: 10.1104/pp.111.172627
- Downen, R. H., Pelizzola, M., Schmitz, R. J., Lister, R., Downen, J. M., Nery, J. R., et al. (2012). Widespread dynamic DNA methylation in response to biotic stress. *Proc. Natl. Acad. Sci.* 109, E2183–E2191. doi: 10.1073/pnas.1209329109
- Drozda, A., Kurpisz, B., Arasimowicz-Jelonek, M., Kuźnicki, D., Jagodzki, P., Guan, Y., et al. (2022). Nitric oxide implication in potato immunity to *Phytophthora infestans* via modifications of histone H3/H4 methylation patterns on defense genes. *Int. J. Mol. Sci.* 23, 4051. doi: 10.3390/ijms23074051
- Du, J., Johnson, L. M., Jacobsen, S. E., and Patel, D. J. (2015). DNA Methylation pathways and their crosstalk with histone methylation. *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* 16, 519–532. doi: 10.1038/nrm4043
- Eyles, R. P., Williams, P. H., Ohms, S. J., Weiller, G. F., Ogilvie, H. A., Djordjevic, M. A., et al. (2013). microRNA profiling of root tissues and root forming explant cultures in *Medicago truncatula*. *Planta* 238, 91–105. doi: 10.1007/s00425-013-1871-7
- Fan, H., Li, T., Guan, L., Li, Z., Guo, N., Cai, Y., et al. (2012). Effects of exogenous nitric oxide on antioxidant and DNA methylation of dendrobium huoshanense grown under drought stress. *Plant Cell Tiss. Organ Cult.* 109, 307–314. doi: 10.1007/s11240-011-0096-3
- Fei, Q., Zhang, Y., Xia, R., and Meyers, B. C. (2016). Small RNAs add zing to the zig-Zag-Zig model of plant defenses. *Mol. Plant Microbe Interact.* 29, 165–169. doi: 10.1094/MPMI-09-15-0212-FI
- Fuso, A., Raia, T., Ortice, M., and Lucarelli, M. (2020). The complex interplay between DNA methylation and miRNAs in gene expression regulation. *Biochimie* 173, 12–16. doi: 10.1016/j.biochi.2020.02.006
- Gibbs, D. J., Md Isa, N., Movahedi, M., Lozano-Juste, J., Mendiondo, G. M., Berckhan, S., et al. (2014). Nitric oxide sensing in plants is mediated by proteolytic control of group VII ERF transcription factors. *Mol. Cell.* 53, 369–379. doi: 10.1016/j.molcel.2013.12.020
- Gong, Z., Morales-Ruiz, T., Ariza, R. R., Roldán-Arjona, T., David, L., and Zhu, J.-K. (2002). ROS1, a repressor of transcriptional gene silencing in *Arabidopsis*, encodes a DNA Glycosylase/Lyase. *Cell* 111, 803–814. doi: 10.1016/S0092-8674(02)01133-9
- Gouil, Q., and Baulcombe, D. C. (2016). DNA Methylation signatures of the plant chromomethyltransferases. *PLoS Genet.* 12, e1006526. doi: 10.1371/journal.pgen.1006526
- Gupta, K. J., Kolbert, Z., Durner, J., Lindermayr, C., Corpas, F. J., Brouquisse, R., et al. (2020). Regulating the regulator: nitric oxide control of post-translational modifications. *New Phytol.* 227, 1319–1325. doi: 10.1111/nph.16622
- Halter, T., Wang, J., Amese, D., Lastrucci, E., Charvin, M., Singla Rastogi, M., et al. (2021). The *Arabidopsis* active demethylase ROS1 cis-regulates defence genes by erasing DNA methylation at promoter-regulatory regions. *eLife* 10, e62994. doi: 10.7554/eLife.62994
- Haring, M., Offermann, S., Danker, T., Horst, I., Peterhansel, C., and Stam, M. (2007). Chromatin immunoprecipitation: optimization, quantitative analysis and data normalization. *Plant Methods* 3, 11. doi: 10.1186/1746-4811-3-11
- Hickok, J. R., Vasudevan, D., Antholine, W. E., and Thomas, D. D. (2013). Nitric oxide modifies global histone methylation by inhibiting jumonji c domain-

## Supplementary material

The Supplementary Material for this article can be found online at: <https://www.frontiersin.org/articles/10.3389/fpls.2022.1033699/full#supplementary-material>

- containing demethylases. *J. Biol. Chem.* 288, 16004–16015. doi: 10.1074/jbc.M112.432294
- Hmadcha, A., Carballo, M., Conde, M., Márquez, G., Monteseirín, J., Martín-Nieto, J., et al. (1999). Phenylarsine oxide increases intracellular calcium mobility and inhibits Ca<sup>2+</sup>-dependent ATPase activity in thymocytes. *Mol. Gen. Metab.* 68, 363–370. doi: 10.1006/mgme.1999.2917
- Huang, F.-Y., Chan, A. O.-O., Rashid, A., Wong, D. K.-H., Cho, C.-H., and Yuen, M.-F. (2012). *Helicobacter pylori* induces promoter methylation of e-cadherin via interleukin-1 $\beta$  activation of nitric oxide production in gastric cancer cells. *Cancer* 118, 4969–4980. doi: 10.1002/cncr.27519
- Huang, C.-Y., and Jin, H. (2021). Coordinated epigenetic regulation in plants: A potent managerial tool to conquer biotic stress. *Front. Plant Sci.* 12. doi: 10.3389/fpls.2021.795274
- Huang, C.-Y., Wang, H., Hu, P., Hamby, R., and Jin, H. (2019). Small RNAs - big players in plant-microbe interactions. *Cell Host Microbe* 26, 173–182. doi: 10.1016/j.chom.2019.07.021
- Hu, W.-J., Chen, J., Liu, T.-W., Liu, X., Chen, J., Wu, F.-H., et al. (2014). Comparative proteomic analysis on wild type and nitric oxide-overproducing mutant (nox1) of *Arabidopsis thaliana*. *Nitric. Oxide* 36, 19–30. doi: 10.1016/j.niox.2013.10.008
- Hu, J., Huang, X., Chen, L., Sun, X., Lu, C., Zhang, L., et al. (2015). Site-specific nitrosoproteomic identification of endogenously s-nitrosylated proteins in *Arabidopsis*. *Plant Physiol.* 167, 1731–1746. doi: 10.1104/pp.15.00026
- Hussain, A., Mun, B.-G., Imran, Q. M., Lee, S.-U., Adamu, T. A., Shahid, M., et al. (2016). Nitric oxide mediated transcriptome profiling reveals activation of multiple regulatory pathways in *Arabidopsis thaliana*. *Front. Plant Sci.* 7. doi: 10.3389/fpls.2016.00975
- Jarillo, J. A., Komar, D. N., and Piñeiro, M. (2018). “The use of the chromatin immunoprecipitation technique for *in vivo* identification of plant protein–DNA interactions,” in *Two-hybrid systems: Methods and protocols methods in molecular biology*. Ed. L. Oñate-Sánchez (New York, NY: Springer), 323–334. doi: 10.1007/978-1-4939-7871-7\_23
- Jones, J. D. G., Vance, R. E., and Dangel, J. L. (2016). Intracellular innate immune surveillance devices in plants and animals. *Science* 354, aaf6395. doi: 10.1126/science.aaf6395
- Kolbert, Z., Barroso, J. B., Brouquisse, R., Corpas, F. J., Gupta, K. J., Lindermayr, C., et al. (2019). A forty year journey: The generation and roles of NO in plants. *Nitric. Oxide* 93, 53–70. doi: 10.1016/j.niox.2019.09.006
- Komar, D. N., Mouriz, A., Jarillo, J. A., and Piñeiro, M. (2016). Chromatin immunoprecipitation assay for the identification of *Arabidopsis* protein–DNA interactions *In vivo*. *J. Vis. Exp.*, (107):e53422. doi: 10.3791/53422
- Kuznicki, D., Meller, B., Arasimowicz-Jelonek, M., Braszewska-Zaleska, A., Drozda, A., and Floryszak-Wieczorek, J. (2019). BABA-induced DNA methylation adjustment to intergenerational defense priming in potato to *Phytophthora infestans*. *Front. Plant Sci.* 10. doi: 10.3389/fpls.2019.00650
- Lee, Y.-E., Hong, C.-Y., Lin, Y.-L., and Chen, R.-M. (2015). MicroRNA-1 participates in nitric oxide-induced apoptotic insults to MC3T3-E1 cells by targeting heat-shock protein-70. *Int. J. Biol. Sci.* 11, 246–255. doi: 10.7150/ijbs.11138
- Lei, M., Zhang, H., Julian, R., Tang, K., Xie, S., and Zhu, J.-K. (2015). Regulatory link between DNA methylation and active demethylation in *Arabidopsis*. *Proc. Natl. Acad. Sci.* 112, 3553–3557. doi: 10.1073/pnas.1502279112
- Le, T.-N., Schumann, U., Smith, N. A., Tiwari, S., Au, P. C. K., Zhu, Q.-H., et al. (2014). DNA Demethylases target promoter transposable elements to positively regulate stress responsive genes in *Arabidopsis*. *Genome Biol.* 15, 458. doi: 10.1186/s13059-014-0458-3
- Li, S., Liu, L., Li, S., Gao, L., Zhao, Y., Kim, Y. J., et al. (2016). SUVH1, a Su(var) 3–9 family member, promotes the expression of genes targeted by DNA methylation. *Nucleic Acids Res.* 44, 608–620. doi: 10.1093/nar/gkv958
- Lindermayr, C., Rudolf, E. E., Durner, J., and Groth, M. (2020). Interactions between metabolism and chromatin in plant models. *Mol. Metab.* 38, 100951. doi: 10.1016/j.molmet.2020.01.015
- Lindermayr, C., Saalbach, G., and Durner, J. (2005). Proteomic identification of s-nitrosylated proteins in *Arabidopsis*. *Plant Physiol.* 137, 921–930. doi: 10.1104/pp.104.058719
- Li, F., Pignatta, D., Bendix, C., Brunkard, J. O., Cohn, M. M., Tung, J., et al. (2012). MicroRNA regulation of plant innate immune receptors. *Proc. Natl. Acad. Sci.* 109, 1790–1795. doi: 10.1073/pnas.1118282109
- López, A., Ramírez, V., García-Andrade, J., Flors, V., and Vera, P. (2011). The RNA silencing enzyme RNA polymerase V is required for plant immunity. *PLoS Genet.* 7, e1002434. doi: 10.1371/journal.pgen.1002434
- López Sánchez, A., Stassen, J. H. M., Furci, L., Smith, L. M., and Ton, J. (2016). The role of DNA (de)methylation in immune responsiveness of *Arabidopsis*. *Plant J.* 88, 361–374. doi: 10.1111/tpj.13252
- Lozano-Juste, J., Colom-Moreno, R., and León, J. (2011). *In vivo* protein tyrosine nitration in *Arabidopsis thaliana*. *J. Exp. Bot.* 62, 3501–3517. doi: 10.1093/jxb/err042
- Matzke, M. A., and Mosher, R. A. (2014). RNA-Directed DNA methylation: an epigenetic pathway of increasing complexity. *Nat. Rev. Genet.* 15, 394–408. doi: 10.1038/nrg3683
- Mengel, A., Ageeva, A., Georgii, E., Bernhardt, J., Wu, K., Durner, J., et al. (2017). Nitric oxide modulates histone acetylation at stress genes by inhibition of histone deacetylases. *Plant Physiol.* 173, 1434–1452. doi: 10.1104/pp.16.01734
- Molnar, A., Melnyk, C. W., Bassett, A., Hardcastle, T. J., Dunn, R., and Baulcombe, D. C. (2010). Small silencing RNAs in plants are mobile and direct epigenetic modification in recipient cells. *Science* 328, 872–875. doi: 10.1126/science.1187959
- Mull, L., Ebbs, M. L., and Bender, J. (2006). A histone methylation-dependent DNA methylation pathway is uniquely impaired by deficiency in *Arabidopsis* s-adenosylhomocysteine hydrolase. *Genetics* 174, 1161–1171. doi: 10.1534/genetics.106.063974
- Murashige, T., and Skoog, F. (1962). A revised medium for rapid growth and bio assays with tobacco tissue cultures. *Physiol. Plant* 15, 473–497. doi: 10.1111/j.1399-3054.1962.tb08052.x
- Nicot, N., Hausman, J.-F., Hoffmann, L., and Evers, D. (2005). Housekeeping gene selection for real-time RT-PCR normalization in potato during biotic and abiotic stress. *J. Exp. Bot.* 56, 2907–2914. doi: 10.1093/jxb/eri285
- Nozawa, K., Chen, J., Jiang, J., Leichter, S. M., Yamada, M., Suzuki, T., et al. (2021). DNA Methyltransferase CHROMOMETHYLASE3 prevents ONSEN transposon silencing under heat stress. *PLoS Genet.* 17, e1009710. doi: 10.1371/journal.pgen.1009710
- Ouyang, S., Park, G., Atamian, H. S., Han, C. S., Stajich, J. E., Kaloshian, I., et al. (2014). MicroRNAs suppress NB domain genes in tomato that confer resistance to *Fusarium oxysporum*. *PLoS Pathog.* 10, e1004464. doi: 10.1371/journal.ppat.1004464
- Ou, X., Zhuang, T., Yin, W., Miao, Y., Wang, B., Zhang, Y., et al. (2015). DNA Methylation changes induced in rice by exposure to high concentrations of the nitric oxide modulator, sodium nitroprusside. *Plant Mol. Biol. Rep.* 33, 1428–1440. doi: 10.1007/s11105-014-0843-9
- Palczewski, M. B., Petraitis, H., and Thomas, D. D. (2019). Nitric oxide is an epigenetic regulator of histone post-translational modifications in cancer. *Curr. Opin. Physiol.* 9, 94–99. doi: 10.1016/j.cophys.2019.05.006
- Palmer, J. L., and Abeles, R. H. (1979). The mechanism of action of s-adenosylhomocysteinase. *J. Biol. Chem.* 254, 1217–1226. doi: 10.1016/S0021-9258(17)34190-X
- Pfaffl, M. W. (2001). A new mathematical model for relative quantification in real-time RT–PCR. *Nucleic Acids Res.* 29, e45. doi: 10.1093/nar/29.9.e45
- Pikaard, C. S., and Scheid, O. M. (2014). Epigenetic regulation in plants. *Cold Spring Harb. Perspect. Biol.* 6, a019315. doi: 10.1101/cshperspect.a019315
- Planchet, E., and Kaiser, W. M. (2006). Nitric oxide (NO) detection by DAF fluorescence and chemiluminescence: a comparison using abiotic and biotic NO sources. *J. Exp. Bot.* 57, 3043–3055. doi: 10.1093/jxb/erl070
- Puyaubert, J., Fares, A., Rézé, N., Peltier, J.-B., and Baudouin, E. (2014). Identification of endogenously s-nitrosylated proteins in *Arabidopsis* plantlets: Effect of cold stress on cysteine nitrosylation level. *Plant Sci.* 215–216, 150–156. doi: 10.1016/j.plantsci.2013.10.014
- Qian, S., Wang, Y., Ma, H., and Zhang, L. (2015). Expansion and functional divergence of jumonji c-containing histone demethylases: Significance of duplications in ancestral angiosperms and vertebrates. *Plant Physiol.* 168, 1321–1337. doi: 10.1104/pp.15.00520
- Rahikainen, M., Alegre, S., Trotta, A., Pascual, J., and Kangasjärvi, S. (2018). Trans-methylation reactions in plants: focus on the activated methyl cycle. *Physiol. Plant* 162, 162–176. doi: 10.1111/pp.12619
- Rudolf, E. E., Hüther, P., Forné, I., Georgii, E., Han, Y., Hell, R., et al. (2021). GSNOR contributes to demethylation and expression of transposable elements and stress-responsive genes. *Antioxidants* 10, 1128. doi: 10.3390/antiox10071128
- Sambrook, J., and Russell, D. W. (2006). Purification of nucleic acids by extraction with phenol:chloroform. *CSH Protoc.* 2006, pdb.prot4455. doi: 10.1101/pdb.prot4455
- Sánchez-Vicente, I., Fernández-Espinoza, M. G., and Lorenzo, O. (2019). Nitric oxide molecular targets: reprogramming plant development upon stress. *J. Exp. Bot.* 70, 4441–4460. doi: 10.1093/jxb/erz339
- Saravana Kumar, R. M., Wang, Y., Zhang, X., Cheng, H., Sun, L., He, S., et al. (2020). Redox components: Key regulators of epigenetic modifications in plants. *Int. J. Mol. Sci.* 21, 1419. doi: 10.3390/ijms21041419
- Saze, H., Tsugane, K., Kanno, T., and Nishimura, T. (2012). DNA Methylation in plants: Relationship to small RNAs and histone modifications, and functions in transposon inactivation. *Plant Cell Physiol.* 53, 766–784. doi: 10.1093/pcp/pcs008
- Seo, E., Kim, T., Park, J. H., Yeom, S.-I., Kim, S., Seo, M.-K., et al. (2018). Genome-wide comparative analysis in solanaceous species reveals evolution of

- microRNAs targeting defense genes in *Capsicum DNA Res. spp* 25, 561–575. doi: 10.1093/dnares/dsy025
- Seth, P., Hsieh, P. N., Jamal, S., Wang, L., Gygi, S. P., Jain, M. K., et al. (2019). Regulation of MicroRNA machinery and development by interspecies s-nitrosylation. *Cell* 176, 1014–1025.e12. doi: 10.1016/j.cell.2019.01.037
- Shivaprasad, P. V., Chen, H.-M., Patel, K., Bond, D. M., Santos, B. A. C. M., and Baulcombe, D. C. (2012). A MicroRNA superfamily regulates nucleotide binding site–Leucine-Rich repeats and other mRNAs. *Plant Cell* 24, 859–874. doi: 10.1105/tpc.111.095380
- Socco, S., Bovee, R. C., Palczewski, M. B., Hickok, J. R., and Thomas, D. D. (2017). Epigenetics: The third pillar of nitric oxide signaling. *Pharmacol. Res.* 121, 52–58. doi: 10.1016/j.phrs.2017.04.011
- Springer, N. M., and Schmitz, R. J. (2017). Exploiting induced and natural epigenetic variation for crop improvement. *Nat. Rev. Genet.* 18, 563–575. doi: 10.1038/nrg.2017.45
- Sun, Q., and Zhou, D.-X. (2008). Rice jmjC domain-containing gene JM1706 encodes H3K9 demethylase required for floral organ development. *Proc. Natl. Acad. Sci.* 105, 13679–13684. doi: 10.1073/pnas.0805901105
- Sliwka, J., Jakuczun, H., Kamiński, P., and Zimnoch-Guzowska, E. (2010). Marker-assisted selection of diploid and tetraploid potatoes carrying rpi-phu1, a major gene for resistance to *Phytophthora infestans*. *J. Appl. Genet.* 51, 133–140. doi: 10.1007/BF03195721
- Thomas, D. D. (2015). Breathing new life into nitric oxide signaling: A brief overview of the interplay between oxygen and nitric oxide. *Redox Biol.* 5, 225–233. doi: 10.1016/j.redox.2015.05.002
- Tichopad, A., Didier, A., and Pfaffl, M. W. (2004). Inhibition of real-time RT-PCR quantification due to tissue-specific contaminants. *Mol. Cell. Probes.* 18, 45–50. doi: 10.1016/j.mcp.2003.09.001
- Vandelle, E., and Delledonne, M. (2011). Peroxynitrite formation and function in plants. *Plant Sci.* 181, 534–539. doi: 10.1016/j.plantsci.2011.05.002
- Vandelle, E., Ling, T. F., Imanifard, Z., Liu, R., Delledonne, M., Bellin, D., et al. (2016). Nitric oxide signaling during the hypersensitive disease resistance response. *Adv. in Bot. Res.* 77, 219–43. doi: 10.1016/bs.abr.2015.10.013
- Varkonyi-Gasic, E. (2017). “Stem-loop qRT-PCR for the detection of plant microRNAs,” in *Plant epigenetics: Methods and protocols methods in molecular biology*. Ed. I. Kovalchuk (Boston, MA: Springer US), 163–175. doi: 10.1007/978-1-4899-7708-3\_13
- Varkonyi-Gasic, E., and Hellens, R. P. (2011). “Quantitative stem-loop RT-PCR for detection of MicroRNAs,” in *RNAi and plant gene function analysis: Methods and protocols methods in molecular biology*. Eds. H. Kodama and A. Komamine (Totowa, NJ: Humana Press), 145–157. doi: 10.1007/978-1-61779-123-9\_10
- Varotto, S., Tani, E., Abraham, E., Krugman, T., Kapazoglou, A., Melzer, R., et al. (2020). Epigenetics: possible applications in climate-smart crop breeding. *J. Exp. Bot.* 71, 5223–5236. doi: 10.1093/jxb/eraa188
- Vasudevan, D., Bovee, R. C., and Thomas, D. D. (2016). Nitric oxide, the new architect of epigenetic landscapes. *Nitric. Oxide* 59, 54–62. doi: 10.1016/j.niox.2016.08.002
- Vasudevan, D., Hickok, J. R., Bovee, R. C., Pham, V., Mantell, L. L., Bahroos, N., et al. (2015). Nitric oxide regulates gene expression in cancers by controlling histone posttranslational modifications. *Cancer Res.* 75, 5299–5308. doi: 10.1158/0008-5472.CAN-15-1582
- Viggiano, L., and de Pinto, M. C. (2017). “Dynamic DNA methylation patterns in stress response,” in *Plant epigenetics RNA technologies*. Eds. N. Rajewsky, S. Jurga and J. Barciszewski (Cham: Springer International Publishing), 281–302. doi: 10.1007/978-3-319-55520-1\_15
- Wendte, J. M., Zhang, Y., Ji, L., Shi, X., Hazarika, R. R., Shahryary, Y., et al. (2019). Epimutations are associated with CHROMOMETHYLASE 3-induced *de novo* DNA methylation. *eLife* 8, e47891. doi: 10.7554/eLife.47891
- West, P. T., Li, Q., Ji, L., Eichten, S. R., Song, J., Vaughn, M. W., et al. (2014). Genomic distribution of H3K9me2 and DNA methylation in a maize genome. *PLoS One* 9, e105267. doi: 10.1371/journal.pone.0105267
- Williams, B. P., Pignatta, D., Henikoff, S., and Gehring, M. (2015). Methylation-sensitive expression of a DNA demethylase gene serves as an epigenetic rheostat. *PLoS Genet.* 11, e1005142. doi: 10.1371/journal.pgen.1005142
- Wurm, C. J., and Lindermayr, C. (2021). Nitric oxide signaling in the plant nucleus: the function of nitric oxide in chromatin modulation and transcription. *J. Exp. Bot.* 72, 808–818. doi: 10.1093/jxb/eraa404
- Yu, A., Lepère, G., Jay, F., Wang, J., Bapaume, L., Wang, Y., et al. (2013). Dynamics and biological relevance of DNA demethylation in *Arabidopsis* antibacterial defense. *Proc. Natl. Acad. Sci.* 110, 2389–2394. doi: 10.1073/pnas.1211757110
- Zafari, S., Vanlerberghe, G. C., and Igamberdiev, A. U. (2022). The role of alternative oxidase in the interplay between nitric oxide, reactive oxygen species, and ethylene in tobacco (*Nicotiana tabacum* L.) plants incubated under normoxic and hypoxic conditions. *Int. J. Mol. Sci.* 23, 7153. doi: 10.3390/ijms23137153
- Zhang, H., Lang, Z., and Zhu, J.-K. (2018). Dynamics and function of DNA methylation in plants. *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* 19, 489–506. doi: 10.1038/s41580-018-0016-z
- Zhao, S., and Fernald, R. D. (2005). Comprehensive algorithm for quantitative real-time polymerase chain reaction. *J. Comput. Biol.* 12, 1047–1064. doi: 10.1089/cmb.2005.12.1047
- Zhao, Y., Ma, W., Wei, X., Long, Y., Zhao, Y., Su, M., et al. (2019). Identification of exogenous nitric oxide-responsive miRNAs from alfalfa (*Medicago sativa* L.) under drought stress by high-throughput sequencing. *Genes (Basel)* 11, 30. doi: 10.3390/genes11010030
- Zhao, Y., Zhang, Y., Sun, H., Maroto, R., and Brasier, A. R. (2017). Selective affinity enrichment of nitrotyrosine-containing peptides for quantitative analysis in complex samples. *J. Proteome Res.* 16, 2983–2992. doi: 10.1021/acs.jproteome.7b00275
- Zhi, P., and Chang, C. (2021). Exploiting epigenetic variations for crop disease resistance improvement. *Front. Plant Sci.* 12. doi: 10.3389/fpls.2021.692328
- Zhou, J.-M., and Zhang, Y. (2020). Plant immunity: Danger perception and signaling. *Cell* 181, 978–989. doi: 10.1016/j.cell.2020.04.028
- Zhu, J.-K. (2009). Active DNA demethylation mediated by DNA glycosylases. *Annu. Rev. Genet.* 43, 143–166. doi: 10.1146/annurev-genet-102108-134205

Poznań, 12.12.2023 r.

mgr Andżelika Drozda  
Katedra Fizjologii Roślin  
Uniwersytet Przyrodniczy w Poznaniu  
ul. Wołyńska 35

### OŚWIADCZENIE

Oświadczam, że w publikacji:

Drozda, A., Kurpisz, B., Arasimowicz-Jelonek, M., Kuźnicki, D., Jagodzick, P., Guan, Y., Floryszak-Wieczorek, J., 2022. Nitric Oxide Implication in Potato Immunity to *Phytophthora infestans* via Modifications of Histone H3/H4 Methylation Patterns on Defense Genes. *International Journal of Molecular Sciences* 23, 4051. (Publikacja 1)

mój udział obejmował:

- mikrorozmnażanie w kulturach *in vitro* oraz prowadzenie uprawy ziemniaka; odmiana 'Sarpo Mira',
- prowadzenie kultur patogenu i przygotowanie zawiesiny zarodników,
- traktowanie liści ziemniaka donorem i zmiataczem tlenu azotu, roztworem inhibitora PRMT5 oraz inokulację zarodnikami *P. infestans*,
- analizę ekspresji kluczowych genów strategii obronnej *NPR1*, *WRKY1*, *PRI*,
- udział w analizie ekspresji genu odporności *R3a* (RT-qPCR),
- analizę ekspresji metylotransferaz lizyny histonu H3 (*CLF* i *TrxG*) oraz metylotransferazy argininy histonu H4 (*PRMT5*); (RT-qPCR),
- oznaczenie aktywności białka metylotransferazy argininy po zastosowaniu inhibitora PRMT5 (test ELISA),
- analiza wpływu inhibitora PRMT5 na rozwój infekcji i ekspresję genów obronnych (*R3a* i *HSR203J*); (RT-qPCR),
- udział w analizie immunoprecypitacji chromatyny (ChIP-qPCR) liści ziemniaka wyprowadzonych z kultur *in vitro*,
- udział w analizie Western blot liści ziemniaka potraktowanych inhibitorem PRMT5,
- udział w analizie statystycznej wyników,
- udział w interpretacji uzyskanych wyników oraz przygotowaniu ww. manuskryptu.

Swój wkład oceniam na 54%

Andżelika Drozda

Poznań, 12.07.2023 r.

Dr inż. Barbara Kurpisz

Zakład Genetyki i Interakcji Środowiskowych

Instytut Dendrologii PAN

Ul. Parkowa 5

62-035 Kórnik

### OŚWIADCZENIE

dotyczące udziału w pracach wspólnych z mgr Andżeliką Drozda stanowiących podstawę  
rozprawy doktorskiej

W związku z zamiarem włączenia przez mgr Andżelikę Drozda publikacji:

Drozda, A., Kurpisz, B., Arasimowicz-Jelonek, M., Kuźnicki, D., Jagodzick, P., Guan, Y.,  
Floryszak-Wieczorek, J., 2022. Nitric Oxide Implication in Potato Immunity to *Phytophthora*  
*infestans* via Modifications of Histone H3/H4 Methylation Patterns on Defense Genes.  
*International Journal of Molecular Sciences* 23, 4051. (Publikacja 1)

do Jej rozprawy doktorskiej oświadczam, że mój wkład w powstawanie powyższej publikacji  
był związany z analizą immunoprecypitacji chromatyny (ChIP-qPCR) liści ziemniaka  
wyprowadzonych z kultur *in vitro*.

Swój wkład oceniam na 10%

Barbara Kurpisz

Poznań 29.11.2023r

Prof. dr hab. Magdalena Arasimowicz-Jelonek

Zakład Ekofizjologii Roślin

Wydział Biologii UAM w Poznaniu

ul. Uniwersytetu Poznańskiego 6

61-614 Poznań

### OŚWIADCZENIE

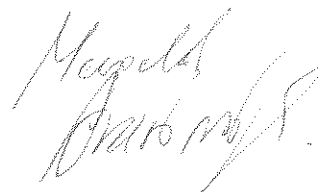
dotyczące udziału w pracach wspólnych z mgr Andżeliką Drozda stanowiących podstawę  
rozprawy doktorskiej

W związku z zamiarem włączenia przez mgr Andżelikę Drozda publikacji:

Drozda, A., Kurpisz, B., Arasimowicz-Jelonek, M., Kuźnicki, D., Jagodzik, P., Guan, Y.,  
Floryszak-Wieczorek, J., 2022. Nitric Oxide Implication in Potato Immunity to  
*Phytophthora infestans* via Modifications of Histone H3/H4 Methylation Patterns on  
Defense Genes. *International Journal of Molecular Sciences* 23, 4051. (Publikacja 1)

do Jej rozprawy doktorskiej oświadczam, że mój wkład w powstawanie powyższej  
publikacji był związany z udziałem w formułowaniu koncepcji badań realizowanych w  
ramach przyznanego grantu NCN 2017/25/B/NZ9/00905 i korekty ww. manuskryptu, który  
jest efektem realizacji projektu.

Swój wkład oceniam na 5%.



Poznań, 14.07.2023

dr inż. Daniel Kuźnicki  
Zakład Biologii Obliczeniowej Niekodującego RNA  
Instytut Chemii Bioorganicznej PAN  
ul. Z. Noskowskiego 12/14  
61-704 Poznań

### OŚWIADCZENIE

dotyczące udziału w pracach wspólnych z mgr Andżeliką Drozda stanowiących podstawę  
rozprawy doktorskiej

W związku z zamiarem włączenia przez mgr Andżelikę Drozda publikacji:

Drozda, A., Kurpisz, B., Arasimowicz-Jelonek, M., Kuźnicki, D., Jagodzik, P., Guan, Y.,  
Floryszak-Wieczorek, J., 2022. Nitric Oxide Implication in Potato Immunity to *Phytophthora*  
*infestans* via Modifications of Histone H3/H4 Methylation Patterns on Defense Genes.  
*International Journal of Molecular Sciences* 23, 4051. (Publikacja 1)

do Jej rozprawy doktorskiej oświadczam, że mój wkład w powstawanie powyższej publikacji  
był związany z analizą statystyczną wyników.

Swój wkład oceniam na 2%.



Poznań, 16.06.2023 r.

Dr Przemysław Jagodzik

Zakład Genetyki Molekularnej i Klinicznej

Instytut Genetyki Człowieka PAN

ul. Strzeszyńska 32

60-479 Poznań

### OŚWIADCZENIE

dotyczące udziału w pracach wspólnych z mgr Andżeliką Drozda stanowiących podstawę rozprawy doktorskiej

W związku z zamiarem włączenia przez mgr Andżelikę Drozda publikacji:

Drozda, A., Kurpisz, B., Arasimowicz-Jelonek, M., Kuźnicki, D., Jagodzik, P., Guan, Y., Floryszak-Wieczorek, J., 2022. Nitric Oxide Implication in Potato Immunity to *Phytophthora infestans* via Modifications of Histone H3/H4 Methylation Patterns on Defense Genes. *International Journal of Molecular Sciences* 23, 4051. (Publikacja 1)

do Jej rozprawy doktorskiej oświadczam, że mój wkład w powstawanie powyższej publikacji był związany z analizą Western blot liści ziemniaka potraktowanych inhibitorem PRMT5.

Swój wkład oceniam na 2%.





Poznań, 15.06.2023 r.

mgr Yufeng Guan

Zakład Ekofizjologii Roślin

Wydział Biologii UAM w Poznaniu

Ul. Uniwersytetu Poznańskiego 6

61-614 Poznań

### OŚWIADCZENIE

dotyczące udziału w pracach wspólnych z mgr Andżeliką Drozda stanowiących podstawę  
rozprawy doktorskiej

W związku z zamiarem włączenia przez mgr Andżelikę Drozda publikacji:

Drozda, A., Kurpisz, B., Arasimowicz-Jelonek, M., Kuźnicki, D., Jagodzick, P., Guan, Y.,  
Floryszak-Wieczorek, J., 2022. Nitric Oxide Implication in Potato Immunity to  
*Phytophthora infestans* via Modifications of Histone H3/H4 Methylation Patterns on  
Defense Genes. *International Journal of Molecular Sciences* 23, 4051. (**Publikacja 1**)

do Jej rozprawy doktorskiej oświadczam, że mój wkład w powstawanie powyższej  
publikacji był związany z uczestnictwem w analizie ekspresji *R3a*.

Swój wkład oceniam na 2%

Yufeng Guan

Poznań, dnia 29.11. 2023 roku

Prof. dr hab. Jolanta Floryszak-Wieczorek

Katedra Fizjologii Roślin

Uniwersytet Przyrodniczy w Poznaniu

ul. Wołyńska 35

### OŚWIADCZENIE

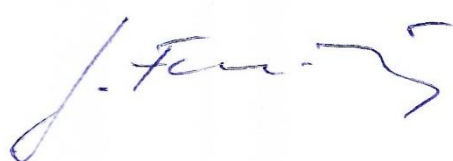
dotyczące udziału w pracach wspólnych z mgr Andżeliką Drozda stanowiących podstawę  
rozprawy doktorskiej

W związku z zamiarem włączenia przez mgr Andżelikę Drozda publikacji:

Drozda, A., Kurpisz, B., Arasimowicz-Jelonek, M., Kuźnicki, D., Jagodzick, P., Guan, Y.,  
Floryszak-Wieczorek, J., 2022. Nitric Oxide Implication in Potato Immunity to *Phytophthora*  
*infestans* via Modifications of Histone H3/H4 Methylation Patterns on Defense Genes.  
*International Journal of Molecular Sciences* 23, 4051. (Publikacja 1)

do Jej rozprawy doktorskiej oświadczam, że mój wkład w powstawanie powyższej publikacji  
był związany z tworzeniem koncepcji badań realizowanych w ramach przyznanego grantu  
NCN 2017/25/B/NZ9/00905, udziałem w pisaniu i korekcie ww. manuskryptu, który jest  
efektem realizacji projektu.

Swój wkład oceniam na 25%



Poznań, 12.12.2023 r.

mgr Andżelika Drozda  
Katedra Fizjologii Roślin  
Uniwersytet Przyrodniczy w Poznaniu  
ul. Wołyńska 35

### OŚWIADCZENIE

Oświadczam, że w publikacji:

Drozda, A., Kurpisz, B., Guan, Y., Arasimowicz-Jelonek, M., Plich, J., Jagodzick, P., Kuźnicki, D., Floryszak-Wieczorek, J., 2022. Insights into the expression of DNA (de)methylation genes responsive to nitric oxide signaling in potato resistance to late blight disease. *Frontiers in Plant Science* 13. (Publikacja 2)

mój udział obejmował:

- mikrorozmnażanie w kulturach *in vitro* oraz prowadzenie uprawy ziemniaka; odmiana 'Sarpo Mira' i linia TG 97-411,
- prowadzenie kultur patogenu i przygotowanie zawiesiny zarodników,
- inokulację liści ziemniaka zarodnikami patogenu,
- traktowanie liści ziemniaka donorem i zmiataczem tlenu azotu oraz nadtlenuazotynu,
- ocenę globalnej metylacji DNA – badanie poziomu 5-mC DNA w dwóch odmianach odpornych ziemniaka (test ELISA),
- analizę ekspresji wszystkich genów związanych z (de)metylacją histonów i DNA; (RT-qPCR),
- udział w detekcji tlenu azotu (na analizatorze chemiluminescencyjnym) oraz analizie ekspresji *R*-genów odporności i *miRNAs* (*miR482e/R3a* i *miR6026/Rpi-phu1*),
- udział w analizie immunoprecypitacji chromatyny (ChIP) liści ziemniaka wyprowadzonych z kultur *in vitro*,
- udział w analizie nitrowania hydrolazy SAHH w liściach ziemniaka,
- udział w analizie statystycznej wyników,
- udział w interpretacji uzyskanych wyników oraz przygotowaniu ww. manuskryptu.

Swój wkład oceniam na 56%

*Andżelika Drozda*

Poznań, 12.07.2023 r.

Dr inż. Barbara Kurpisz

Zakład Genetyki i Interakcji Środowiskowych

Instytut Dendrologii PAN

Ul. Parkowa 5

62-035 Kórnik

### OŚWIADCZENIE

dotyczące udziału w pracach wspólnych z mgr Andżeliką Drozda stanowiących podstawę  
rozprawy doktorskiej

W związku z zamiarem włączenia przez mgr Andżelikę Drozda publikacji:

Drozda, A., Kurpisz, B., Guan, Y., Arasimowicz-Jelonek, M., Plich, J., Jagodzik, P., Kuźnicki, D., Floryszak-Wieczorek, J., 2022. Insights into the expression of DNA (de)methylation genes responsive to nitric oxide signaling in potato resistance to late blight disease. *Frontiers in Plant Science* 13. (Publikacja 2)

do Jej rozprawy doktorskiej oświadczam, że mój wkład w powstanie powyższej publikacji był związany z analizą immunoprecypitacji chromatyny (ChIP) liści ziemniaka wyprowadzonych z kultur *in vitro*.

Swój wkład oceniam na 5%.

Barbara Kurpisz

Poznań, 15.06.2023 r.

mgr Yufeng Guan

Zakład Ekofizjologii Roślin

Wydział Biologii UAM w Poznaniu

Ul. Uniwersytetu Poznańskiego 6

61-614 Poznań

### OŚWIADCZENIE

dotyczące udziału w pracach wspólnych z mgr Andżeliką Drozda stanowiących podstawę rozprawy doktorskiej

W związku z zamiarem włączenia przez mgr Andżelikę Drozda publikacji:

Drozda, A., Kurpisz, B., Guan, Y., Arasimowicz-Jelonek, M., Plich, J., Jagodzik, P., Kuźnicki, D., Floryszak-Wieczorek, J., 2022. Insights into the expression of DNA (de)methylation genes responsive to nitric oxide signaling in potato resistance to late blight disease. *Frontiers in Plant Science* 13. (Publikacja 2)

do Jej rozprawy doktorskiej oświadczam, że mój wkład w powstawanie powyższej publikacji był związany z detekcją tlenu azotu (na analizatorze chemiluminescencyjnym) oraz współudziałem w analizie ekspresji genów *R* i miRNA.

Swój wkład oceniam na 7%.

Yufeng Guan

Poznań 29.11.2023r

Prof. dr hab. Magdalena Arasimowicz-Jelonek

Zakład Ekofizjologii Roślin

Wydział Biologii UAM w Poznaniu

Ul. Uniwersytetu Poznańskiego 6

61-614 Poznań

### OŚWIADCZENIE

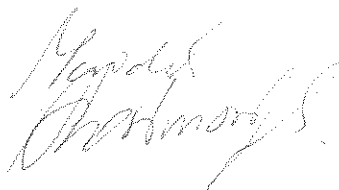
dotyczące udziału w pracach wspólnych z mgr Andżeliką Drozda stanowiących podstawę rozprawy doktorskiej

W związku z zamiarem włączenia przez mgr Andżelikę Drozda publikacji:

Drozda, A., Kurpisz, B., Guan, Y., Arasimowicz-Jelonek, M., Plich, J., Jagodzick, P., Kuźnicki, D., Floryszak-Wieczorek, J., 2022. Insights into the expression of DNA (de)methylation genes responsive to nitric oxide signaling in potato resistance to late blight disease. *Frontiers in Plant Science* 13. (Publikacja 2)

do Jej rozprawy doktorskiej oświadczam, że mój wkład w powstawanie powyższej publikacji był związany z udziałem w formułowaniu koncepcji badań realizowanych w ramach przyznanego grantu NCN 2017/25/B/NZ9/00905 i korekty ww. manuskryptu, który jest efektem realizacji projektu.

Swój wkład oceniam na 5%.



Młochów, 12.06.2023

Dr Jarosław Plich

IHAR-PIB Młochów

Ul. Platanowa 19

05-831 Młochów

### OŚWIADCZENIE

dotyczące udziału w pracach wspólnych z mgr Andżeliką Drozda stanowiących podstawę  
rozprawy doktorskiej

W związku z zamiarem włączenia przez mgr Andżelikę Drozda publikacji:

Drozda, A., Kurpisz, B., Guan, Y., Arasimowicz-Jelonek, M., Plich, J., Jagodzik, P.,  
Kuźnicki, D., Floryszak-Wieczorek, J., 2022. Insights into the expression of DNA  
(de)methylation genes responsive to nitric oxide signaling in potato resistance to late blight  
disease. *Frontiers in Plant Science* 13. (Publikacja 2)

do Jej rozprawy doktorskiej oświadczam, że mój wkład w powstawanie powyższej  
publikacji był związany ze współudziałem w analizie linii TG 97-411, wyprowadzonej w  
IHAR-PIB Młochów.

Swój wkład oceniam na 5%



Poznań, 16.06.2023 r.

Dr Przemysław Jagodzick

Zakład Genetyki Molekularnej i Klinicznej

Instytut Genetyki Człowieka PAN

ul. Strzeszyńska 32

60-479 Poznań

### OŚWIADCZENIE

dotyczące udziału w pracach wspólnych z mgr Andżeliką Drozda stanowiących podstawę  
rozprawy doktorskiej

W związku z zamiarem włączenia przez mgr Andżelikę Drozda publikacji:

Drozda, A., Kurpisz, B., Guan, Y., Arasimowicz-Jelonek, M., Plich, J., Jagodzick, P.,  
Kuźnicki, D., Floryszak-Wieczorek, J., 2022. Insights into the expression of DNA  
(de)methylation genes responsive to nitric oxide signaling in potato resistance to late blight  
disease. *Frontiers in Plant Science* 13. (Publikacja 2)

do Jej rozprawy doktorskiej oświadczam, że mój wkład w powstawanie powyższej  
publikacji był związany z analizą nitrowania tyrozyny hydrolazy SAHH w liściach  
ziemniaka.

Swój wkład oceniam na 2%.



Poznań, 14.07.2023

dr inż. Daniel Kuźnicki  
Zakład Biologii Obliczeniowej Niekodującego RNA  
Instytut Chemii Bioorganicznej PAN  
ul. Z. Noskowskiego 12/14  
61-704 Poznań

### OŚWIADCZENIE

dotyczące udziału w pracach wspólnych z mgr Andżeliką Drozda stanowiących podstawę  
rozprawy doktorskiej

W związku z zamiarem włączenia przez mgr Andżelikę Drozda publikacji:

Drozda, A., Kurpisz, B., Guan, Y., Arasimowicz-Jelonek, M., Plich, J., Jagodzick, P., Kuźnicki, D., Floryszak-Wieczorek, J., 2022. Insights into the expression of DNA (de)methylation genes responsive to nitric oxide signaling in potato resistance to late blight disease. *Frontiers in Plant Science* 13. (Publikacja 2)

do Jej rozprawy doktorskiej oświadczam, że mój wkład w powstawanie powyższej publikacji był związany z udziałem w analizach statystycznych.

Swój wkład oceniam na 2%

Daniel Kuźnicki

Poznań, dnia 29.11. 2023 roku

Prof. dr hab. Jolanta Floryszak-Wieczorek

Katedra Fizjologii Roślin

Uniwersytet Przyrodniczy w Poznaniu

ul. Wołyńska 35

### OŚWIADCZENIE

dotyczące udziału w pracach wspólnych z mgr Andżeliką Drozda stanowiących podstawę rozprawy doktorskiej

W związku z zamiarem włączenia przez mgr Andżelikę Drozda publikacji:

Drozda, A., Kurpisz, B., Guan, Y., Arasimowicz-Jelonek, M., Plich, J., Jagodzik, P., Kuźnicki, D., Floryszak-Wieczorek, J., 2022. Insights into the expression of DNA (de)methylation genes responsive to nitric oxide signaling in potato resistance to late blight disease. *Frontiers in Plant Science* 13. (Publikacja 2)

do Jej rozprawy doktorskiej oświadczam, że mój wkład w powstawanie powyższej publikacji był związany z tworzeniem koncepcji badań realizowanych w ramach przyznanego grantu NCN 2017/25/B/NZ9/00905, udziałem w pisaniu i korekcie ww. manuskryptu, który jest efektem realizacji projektu.

Swój wkład oceniam na 18%.



Formularz P.159\_F1

**Oświadczenie autora pracy doktorskiej o jej oryginalności,  
samodzielności jej przygotowania i o nienaruszeniu praw autorskich**

ANDZE LIKA DROZDA  
imię i nazwisko doktoranta

Niniejszym oświadczam, że przedłożoną pracę doktorską pt.:

WZDZIAŁ... ILENKO... AZOTU... W... EPIGENETYCZNEJ... REGULACJI... ODPORNOŚCI... ZIEMNIAKA  
(SOLANUM TUBEROSUM L.)... NA... PHYTOPHTHORA INFESTANS (MONT)... DE... BARY.....

napisałem samodzielnie, tj.

- nie zleciłem opracowania pracy lub jej części innym osobom,
- nie przepisałem pracy lub jej części z innych opracowań i prac związanych tematycznie z moją pracą,
- korzystałem jedynie z niezbędnych konsultacji,
- wszystkie elementy pracy, które zostały wykorzystane do jej realizacji (cytaty, ryciny, tabele, programy itp.), a nie będące mojego autorstwa, zostały odpowiednio zaznaczone oraz zostało podane źródło ich pochodzenia,
- praca nie była wcześniej podstawą nadania stopnia doktora innej osobie.

Mam świadomość, że złożenie nieprawdziwego oświadczenia skutkować będzie niedopuszczeniem do dalszych czynności przewodu doktorskiego lub cofnięciem decyzji o nadaniu mi stopnia doktora oraz wszczęciem postępowania dyscyplinarnego.

12. 12. 2023. Andżelika Drozda  
data i czytelny podpis autora

Formularz P.159\_F2

**Oświadczenie autora o zgodności  
elektronicznej wersji pracy z jej formą wydrukowaną**

ANDZELIKA DROZDA  
imię i nazwisko doktoranta

Niniejszym oświadczam, że załączona, wydrukowana wersja mojej pracy doktorskiej pt.

UDZIAŁ TLENKU AZOTU W EPIGENETYCZNEJ REGULACJI ODPORNOŚCI ZIEMNIAKA .....  
(SOLANUM TUBEROSUM L.) NA PHYTOPHTHORA INFESTANS (MONT.) DE BARY .....

jest zgodna z plikiem w wersji elektronicznej, znajdującym się na załączonym nośniku, przeznaczonym do sprawdzenia w systemie antyplagiatowym.

12.12.2023i. Andzelika Drozda  
data i czytelny podpis autora

Formularz P.159\_F3

**Oświadczenie autora o przekazaniu uczelni prawa do eksploatacji pracy  
w systemie antyplagiatowym**

ANDZELIKA DROZDA  
imię i nazwisko doktoranta

Niniejszym oświadczam, że udzielam nieodpłatnie i na czas nieokreślony Uniwersytetowi Przyrodniczemu w Poznaniu prawa do wykorzystania mojej pracy doktorskiej pt.:

UDZIAK TLENKU AZOTU W EPIGENETYCZNEJ REGULACJI ODPORNOŚCI ZIEMNIAKA  
(SOLANUM TUBEROSUM L.) NA PHYTOPHTHORA INFESTANS (MONT.) DE BARY

.....  
w następującym zakresie:

- wprowadzanie i przetwarzanie tekstu pracy doktorskiej w systemie antyplagiatowym. Przez przetwarzanie należy rozumieć wyłącznie porównywanie przez system antyplagiatowy treści pracy doktorskiej z innymi dokumentami oraz przygotowanie przez ten system *Raportu Podobieństwa*.
- wprowadzenie pracy doktorskiej do elektronicznej uczelnianej bazy danych,
- udostępnienie pracy doktorskiej dodanej do uczelnianej elektronicznej bazy danych innym uczelniom wyższym, w celu wykorzystania jej tekstu do wykonania analizy porównawczej dokonywanej za pomocą systemu antyplagiatowego. Uczelnia może upoważnić inną osobę do korzystania z tej licencji.

12.12.2023r. Andzelika Drozda  
data i czytelny podpis autora