

Ocena interakcji ziemniaka z bakteriami *Dickeya solani* na poziomie fenotypowym i molekularnym - identyfikacja genów kandydujących związanych z reakcją odporności

Okres realizacji 2022 r

Lebecka R., Sołtys-Kalina D., Grupa-Urbańska A., Szajko K., Marczewski W.
e-mail: r.lebecka@ihar.edu.pl



Project finansowany przez Ministerstwo Rolnictwa i Rozwoju Wsi, w ramach badań podstawowych na rzecz postępu biologicznego w 2021-2027.

Osiągnięte CELE tematów badawczych (T) realizowanych w 2022 r.:

T1: zdobycie wiedzy na temat molekularnych uwarunkowań uszkodzenia bulw ziemniaka na skutek zranienia oraz zranienia i zakażenia przez bakterie *D. solani*, we wczesnej fazie infekcji, tj. 8 h po inokulacji,

T2: poznanie wpływu glikoalkaloidów w ekstraktach z liści w wybranych genotypach rodzaju *Solanum* na wzrost bakterii pektynolitycznych,

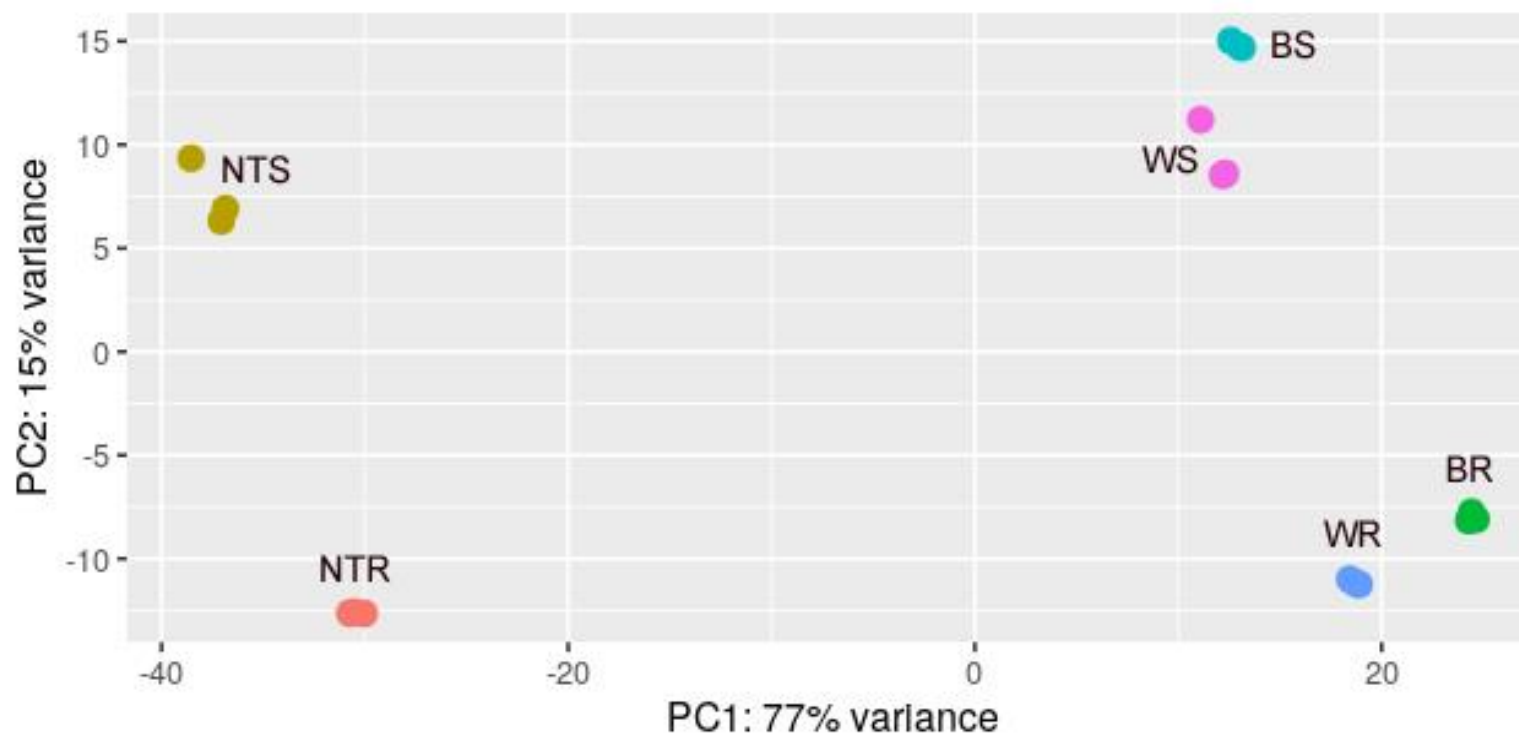
T3: poznanie wpływu glikoalkaloidów w ekstraktach z liści w wybranych genotypach rodzaju *Solanum* na żywotność bakterii pektynolitycznych,

T4: zdobycie wiedzy na temat możliwości określenia zdolności przechowalniczej bulw ziemniaka i porażenia przez patogeny ziemniaka powodujące choroby przechowalnicze na podstawie testu przechowywania wybranej próby bulw w warunkach prowokacyjnych do rozwoju patogenów.

	Materiały	Metody
T1	<ul style="list-style-type: none"> 10 genotypów diploidalnych ziemniaka o skrajnie zróżnicowanej odporności bulw na bakterie <i>Dickeya solani</i>, wyselekcjonowanych z populacji mapującej, Jeden szczep bakterii <i>D. solani</i> (wysokoagresywny w stosunku do bulw ziemniaka). 	<ul style="list-style-type: none"> Sekwencjonowanie RNA-Seq (NovaSeq6000, Illumina), Analiza bioinformatyczna, Mapowanie do genomu referencyjnego <i>Solanum tuberosum</i>, Analiza statystyczna ekspresji genów różnicowych.
T2	<ul style="list-style-type: none"> Trzy gatunki dzikie ziemniaka: <i>S. maglia</i>, <i>S. chacoense</i>, <i>S. garsiae</i>, dwa mieszańce międzygatunkowe <i>Solanum</i>, cztery odmiany ziemniaka uprawnego, 	<ul style="list-style-type: none"> Ekstrakcja glikoalkaloidów z liści roślin <i>Solanum</i>; Ocena wzrostu <i>in-vitro</i> bakterii w dwóch pożywkach płynnych, pożywce pełnej LB i w pożywce minimalnej M9 w spektrofotometrze TECAN.
T3	<ul style="list-style-type: none"> dwa izolaty bakterii: <i>D. solani</i> i <i>P. brasiliense</i>. 	<ul style="list-style-type: none"> Ocena żywotności bakterii w dwóch pożywkach płynnych, pożywce pełnej LB i w pożywce minimalnej M9 metodą zliczania wybarwionych bakterii żywych i martwych w cytometrze przepływowym.
T4	<ul style="list-style-type: none"> 12 odmian ziemniaka: Bohun, Cedron, Denar, Gardena, Impresja, Irmina, Ismena, Kuba, Michalina, Tacja, Werbena, Widawa. 	<ul style="list-style-type: none"> Zbiór bulw ziemniaka ręczny i kombajnem; Makroskopowa ocena jakości i porażenia bulw ziemniaka po zbiorze i po okresie inkubacji w hot-box'ie.

T 1: Analiza transkryptomyczna i walidacja prób do badania ekspresji wybranych genów w bulwach we wczesnej fazie rozwoju infekcji po zakażeniu przez *D. solani*.

Analiza głównych składowych (PCA, ang Principal Component Analysis) na danych DESeq2 dla wszystkich prób z doświadczenia wykazała, że największe różnice w profilu ekspresji genów obserwowano pomiędzy bulwami nietraktowanymi (NTS - podatnymi, NTR - odpornymi) a bulwami poddanymi zranieniu (WS, WR) lub inokulowanymi w zranienie (BS, BR). Pierwsza składowa wyjaśnia 77 % ogólnej zmienności. W oparciu o drugą składową, która wyjaśnia 15 % wariacji, możliwe jest oddzielenie genotypów odpornych od podatnych. Różnice w ekspresji genów pomiędzy bulwami zranionymi a inokulowanymi w zranienie w oparciu o pierwszą składową są widoczne wyłącznie w grupie genotypów o odpornych bulwach.



Liczba genów o statystycznie istotnej różnicy w ekspresji względem próby kontrolnej

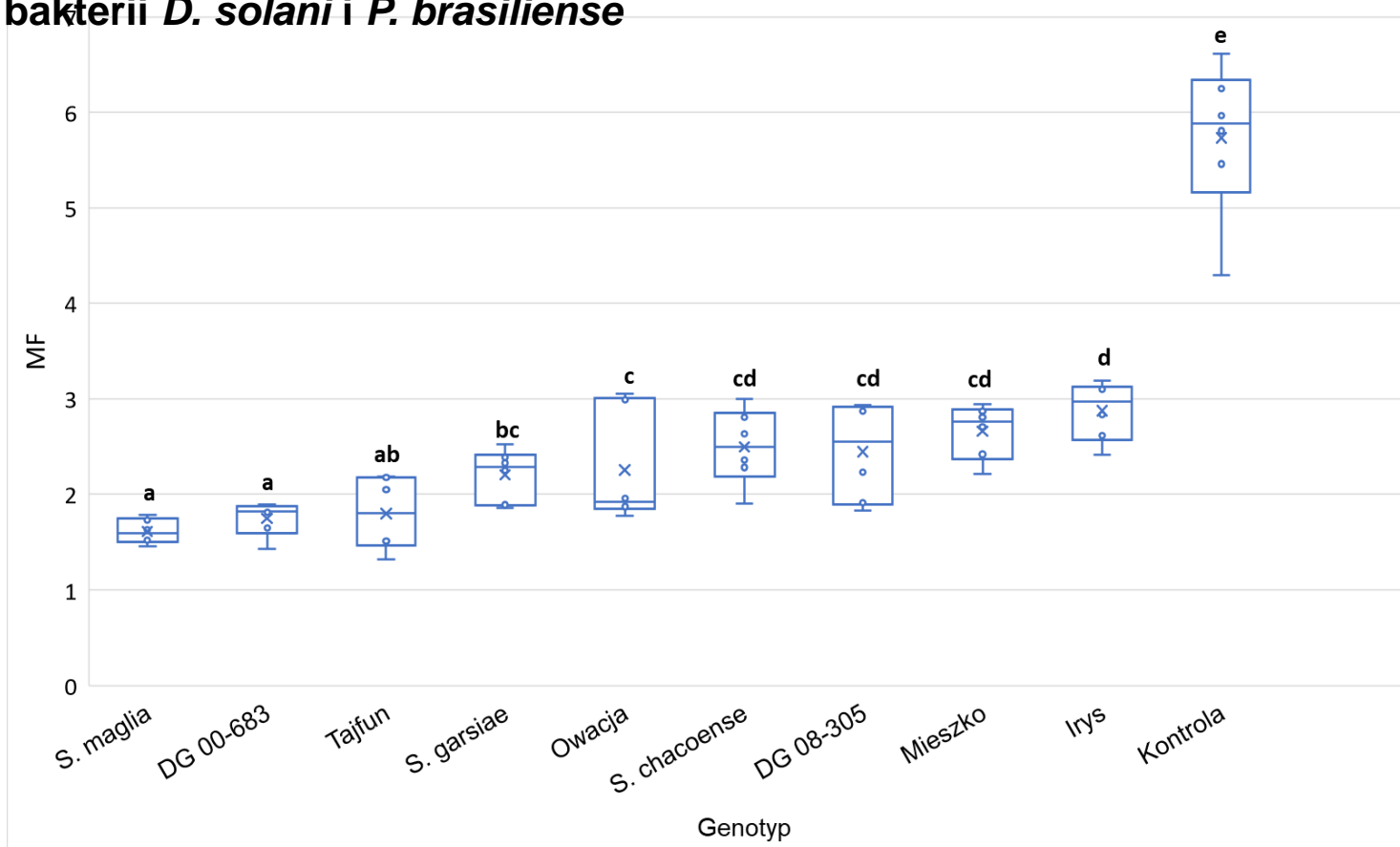
Porównania	Wzrost ekspresji	Zmiana krotności > = 2	Obniżenie ekspresji	Zmiana krotności > = 2
BS vs. BR	3114	1525	3345	707
WS vs. WR	2000	713	2457	543
NTS vs. NTR	2768	1066	2937	806
NTR vs. BR	4354	2326	4043	1259
NTS vs. BS	4362	2183	3709	1038
NTR vs. WR	4404	2257	4104	994
NTS vs. WS	4129	2270	3433	682
WR vs. BR	1165	140	923	133
WS vs. BS	1537	110	1368	537

Geny o zwiększonej ekspresji w bulwach odpornych inokulowanych w zranienia, w porównaniu do bulw zranionych traktowanych wodą (WR vs. BR), porównano z genami różnicowymi o zwiększonej ekspresji w genotypach podatnych inokulowanych w zranienia, w porównaniu do bulw zranionych traktowanych wodą (WS vs. BS). Otrzymane w ten sposób geny porównano z genami różnicowymi bulw inokulowanych odpornych w porównaniu do genów bulw podatnych (BS vs. BR). **Wyselekcjonowano 14 genów, które mogą mieć związek z wysoką odpornością bulw ziemniaka na bakterie *D. solani*** (dwa z nich są niescharakteryzowane).

Geny kandydujące

Nazwa genu	Krotność zmiany	Funkcja
LOC102584751	95	Białko homologiczne MADS-box AGL9, białka odpowiedzi na stres (Saha et al. 2015)
LOC102594433	81	Białko podobne do CASP PIMP1, odporność na bakterie, białko błonowe indukowane infekcją patogena (Hong et al. 2008; Vining i Pandelova 2022)
LOC102594097	7,5	
LOC102581074	15	Białko związane z patogenezą (PR, ang. pathogen related) podobne do P2
LOC102577760	11	Białko podobne do NtPRp27; gen odporności (Graham et al. 2002)
LOC102584051	7,3	Białko podobne do esterazy acetylowanej ajmaliny – kluczowa rola w późnym stadium biosyntezy alkaloidu ajmaliny (Ruppert et al. 2005)
LOC102604093	7,2	Białko podobne do białka 21 z domeną U-box; ubikwitynacja, potranslacyjna modyfikacja białek przez przyłączenie ubikwityny, mechanizmy obronne (Gonzalez-Lamothe et al. 2006)
LOC102593434	6,1	Prawdopodobnie czynnik transkrypcyjny WRKY 53; odporność na bakterie <i>Pseudomonas syringae</i> (Hu et al. 2012)
LOC102579343	6	Białko podobne do UDP-glycosyltransferase 74G1-like; metabolizm kwasu salicylowego (Richman et al. 2005; Mariotti et al. 2018)
LOC102589706	5,2	Proteaza podobna do subtylizyny SBT1.2; rozpoznawanie patogenów roślin i priming immunologiczny (Figueiredo et al. 2014)
LOC102582137	4,2	Białko podobne do glukozylotransferazy 7-dezoksyloganetyny, udział w procesach gojenia po zranieniu (Fofana et al. 2020)
LOC102579526	4,2	Białko podobne do czynnika transkrypcyjnego 5 GATA (wiązanie DNA przez palce cynkowe)

T 2: Ocena wpływu glikoalkaloidów w ekstraktach z liści roślin w wybranych genotypach rodzaju *Solanum* na wzrost bakterii *D. solani* i *P. brasiliense*



Współczynnik namnażania bakterii *D. solani* w pożywce LB z dodatkiem glikoalkaloidów pochodzących z różnych genotypów *Solanum* spp. po 24 h inkubacji w temp. 25°C i przy prędkości wytrząsania 150 rpm. Kontrolą w obu doświadczeniach był wariant bez glikoalkaloidów: bakterie + pożywka + etanol (użyty jako rozpuszczalnik glikoalkaloidów) oraz bakterie + pożywka.

- Namnażanie bakterii było **hamowane przez wszystkie testowane GLA**, w obu testowanych pożywkach, z tym, że efekt hamowania w pożywce minimalnej M9 był mniej wyraźny niż w przypadku wzrostu bakterii w pożywce pełnej LB.
- **Najsilniejsze** hamowanie bakterii obu gatunków, Pcb i Ds w pożywce LB, zaobserwowano w przypadku GLA izolowanych z liści ***S. maglia***, **mieszańca międzygatunkowego DG 00-683** i **odmiany Tajfun**.
- ***S. maglia*** i **odmiana Tajfun** charakteryzowały się wysoką zawartością α -czakoniny and α -solaniny w równych proporcjach. Skład GLA w międzygatunkowym mieszańcu **DG 00-683** był bardziej złożony: α -czakonina, α -solanina, leptynina I.
- Hamujący efekt GLA na wzrost bakterii był podobny w obu testowanych izolatach Pcb i Ds (współczynnik korelacji $r = 0,98$, $P < 0,05$).
- Uzyskane wyniki wskazują, że zarówno skład GLA w ekstrakcie, jak i ich wzajemne proporcje mogą wpływać na aktywność biologiczną ekstraktu względem bakterii pektynolitycznych.
- W dalszych badaniach planujemy badanie wpływu GLA na aktywność pektynolityczną bakterii i na aktywność genów wirulencji bakterii.

T 3: Ocena wpływu glikoalkaloidów w ekstraktach z liści roślin w wybranych genotypach rodzaju *Solanum* na żywotność bakterii

Procentowy udział martwych komórek bakterii *Pectobacterium brasiliense* i *Dickeya solani* po 48 h inkubacji w pożywce Luria Berthani, bez dodatku lub z dodatkiem glikoalkaloidów (GLA) otrzymanych z liści różnych roślin *Solanum* spp, oznaczony w cytometrze przepływowym CyFlow Space.

Pochodzenie GLA	<i>Pectobacterium brasiliense</i>				<i>Dickeya solani</i>			
	LB	LB z GLA	LB	LB z GLA	LB	LB z GLA	LB	LB z GLA
<i>S. chacoense</i>	2,6	ab	17,8	f	2,8	abcd	7,5	i
<i>S. maglia</i>	2,1	ab	11,5	e	3,1	bcde	7,8	i
DG 00-683	2,7	ab	9,3	d	3,7	de	6,1	h
Tajfun	1,7	a	6,1	c	1,7	a	2,6	abc
<i>S. garsiae</i>	1,5	a	5,4	c	2,1	ab	4,7	fg
Irys	2,6	ab	4,3	bc	3,0	bcd	5,6	gh
Owacja	2,3	ab	4,1	bc	2,4	abc	3,3	cde
Mieszko	2,2	ab	2,9	ab	2,6	abcd	4,1	ef
DG 08-305	1,1	a	2,4	ab	1,8	a	8,5	i

Glikoalkaloidy otrzymane z liści różnych form ziemniaka **wpływają w sposób istotny na zahamowanie wzrostu bakterii pektynolitycznych jak również ich żywotności**. Siła tego oddziaływania zależy od pochodzenia GLA, gatunku bakterii oraz rodzaju pożywki

T 4: Analiza zdolności przechowalniczej bulw ziemniaka i porażenia przez patogeny ziemniaka powodujące choroby przechowalnicze

Po zbiorze oceniono makroskopowo 200 bulw każdej odmiany a następnie oceniano 100 bulw każdej odmiany po trzech dniach inkubacji w hot-boxie w temp. 22 °C i wilg. wzgl. ok. 80%.

Obserwowano dużą zmienność objawów chorobowych głównie w zależności od miejsca uprawy a powodowanych przez patogeny znajdujące się w glebie, *Streptomyces* spp i *Rizoctonia solani*. Zbiór kombajnem powodował większy udział bulw z objawami obicia (na rysunku pokazano wyniki dla wybranych odmian).

Inkubacja bulw w ciepłe i wilgoci **umożliwiła wykrycie latentnego porażenia bulw przez bakterie pektynolityczne**. Pojedyncze bulwy porażone mokrą zgnilizną wystąpiły w odmianach zbieranych ręcznie: Denar, Gardena, Impresja, Bohun Michalina i w bulwach odmian zbieranych kombajnem, Irmina, Widawa (2 bulwy porażone), Werbena (6 bulw porażonych). W przypadku tych odmian, **zaleca się obserwowanie bulw pod względem wystąpienia objawów choroby w trakcie przechowywania**.

Publikacje:

PLAKAT na międzynarodowej konferencji Europejskiego Stowarzyszenia do Badań nad Ziemniakiem: Sołtys-Kalina D., Grupa-Urbańska A., Lebecka R. Influence of glycoalkaloids in leaf extract of different *Solanum* plants on the growth of *Dickeya solani* and *Pectobacterium brasiliense*. EAPR 21st Triennial Conference Kraków, July 4-8, 2022

