

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

Numer Zadania: 28; Nr zadania w IHAR-PIB: 3-1-00-3-04

Okres realizacji projektu: 2021 – 2025

Kierownik Zadania: prof. dr hab. Renata Lebecka, e-mail: [r.lebecka@ihar.edu.pl](mailto:r.lebecka@ihar.edu.pl)

Zespół wykonawców: Lebecka R., Sołtys-Kalina D., Grupa-Urbańska A., Szajko K., Marczewski W.



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



## Osiągnięte cele tematów badawczych realizowanych w 2023 r.:

- (i) zdobycie wiedzy na temat molekularnych uwarunkowań odpowiedzi ziemniaka na uszkodzenie bulw na skutek zranienia oraz jednoczesnego zranienia i zakażenia przez bakterie *D. solani*, we wczesnej i średniej fazie infekcji t.j. 8 i 24 h po inokulacji (mierniki: 18 transkryptomów, 9 transkryptomów różnicowych, 14 genów kandydujących),
- (ii) poznanie wpływu glikoalkaloidów (GA) wyizolowanych z liści wybranych genotypów *Solanum* spp. na wybrane czynniki wirulencji bakterii *D. solani* i *P. brasiliense*: quorum sensing, enzymatyczną zdolność rozkładania pektyn w pożywce, zdolność ruchu i tworzenie biofilmu; (mierniki: 3 GA w badaniu ekspresji genów wirulencji, 8 GA w badaniu pektynolityczności bakterii, 3 GA badania zdolności ruchu i tworzenia biofilmu),
- (iii) określenie 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 (mierniki: 12 odmian zbieranych ręcznie i ocenianych makroskopowo, 5 odmian zbieranych kombajnem i ocenianych makroskopowo, 12 odmian zbieranych ręcznie ocenianych w hot-box, 5 odmian zbieranych kombajnem ocenianych w hot-box).

## Materiały

- 10 genotypów diploidalnych ziemniaka o skrajnie zróżnicowanej odporności bulw na bakterie *D. solani*, wyselekcjonowanych z populacji mapującej,
- Jeden szczep bakterii *D. solani* (wysokoagresywny w stosunku do bulw ziemniaka).
- 14 genów kandydujących
  
- Trzy gatunki dzikiego ziemniaka (*S. maglia*, *S. chacoense*, *S. garsiae*),
- Dwa mieszańce międzygatunkowe *Solanum* (DG 00-683, DG 88-89),
- Trzy odmiany ziemniaka uprawnego *S. tuberosum* (Tajfun, Owacja, Mieszko).
- Dwa izolaty bakterii: *D. solani* i *P. brasiliense*,
- Cztery geny Quorum sensing (*expI*, *expR*, *vfmA*, *vfmE*).
  
- 12 odmian ziemniaka: Bohun, Cedron, Denar, Gardena, Impresja, Irmina, Ismena, Kuba, Michalina, Tacja, Werbena, Widawa.

## Metody

- Sekwencjonowanie RNA-Seq (NovaSeq6000, Illumina),
- Analiza bioinformatyczna,
- Mapowanie do genomu referencyjnego *Solanum tuberosum*,
- Analiza statystyczna ekspresji genów różnicowych.
- qPCR, RT-PCR
  
- Ekstrakcja glikoalkaloidów z liści roślin *Solanum*;
- Ocena wpływu GA z liści roślin *Solanum* na:
  - ✓ enzymatyczną zdolność rozkładania pektyn w pożywce,
  - ✓ zdolność ruchu (ang. swimming ability),
  - ✓ tworzenie biofilmu,
- qPCR
  
- Zbiór bulw ziemniaka ręczny i kombajnem;
- Makroskopowa ocena jakości i porażenia bulw ziemniaka po zbiorze i po okresie inkubacji w hot-box'ie.

## Wyniki i wnioski

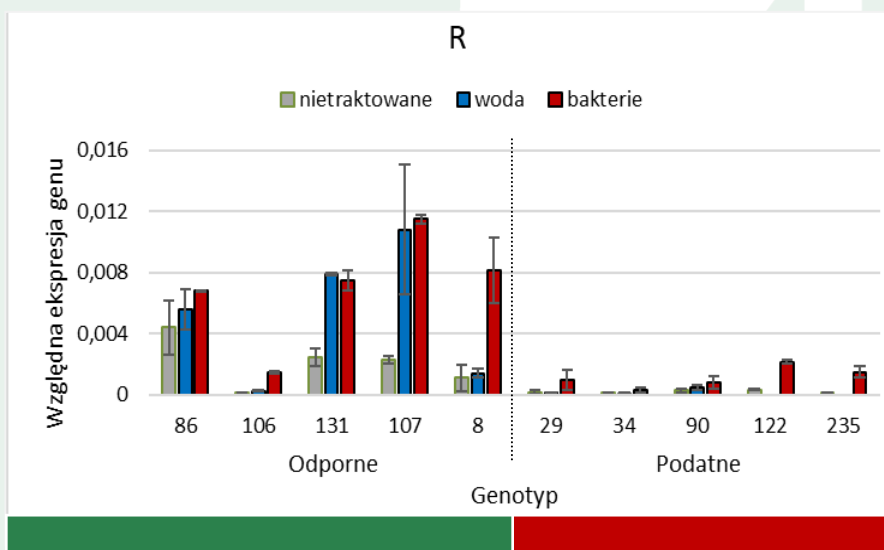
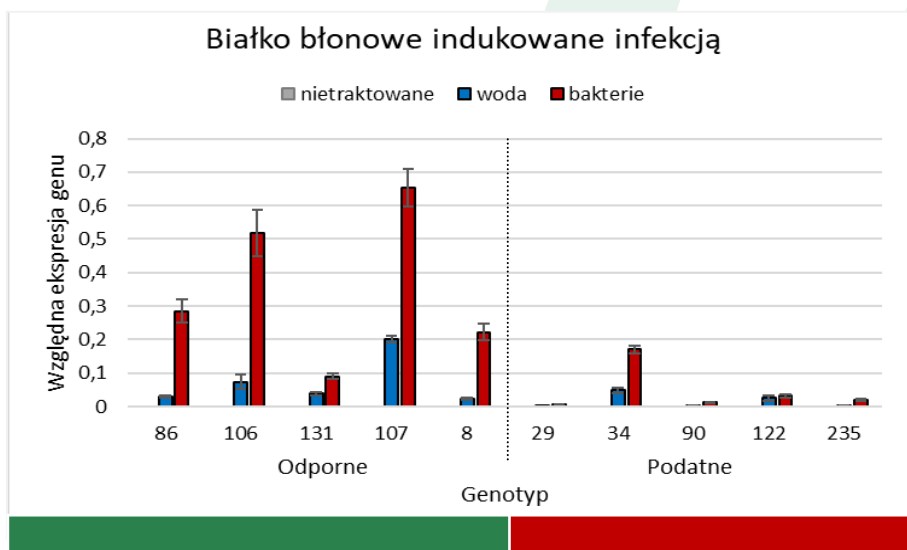
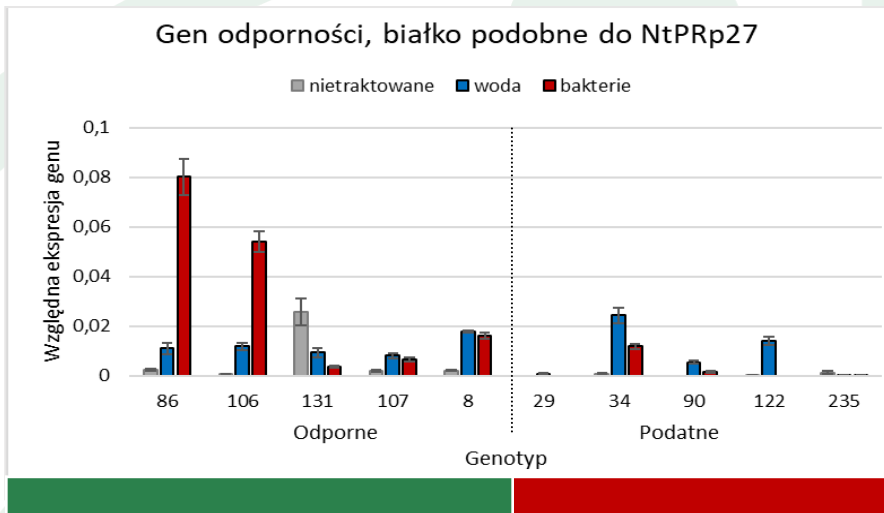
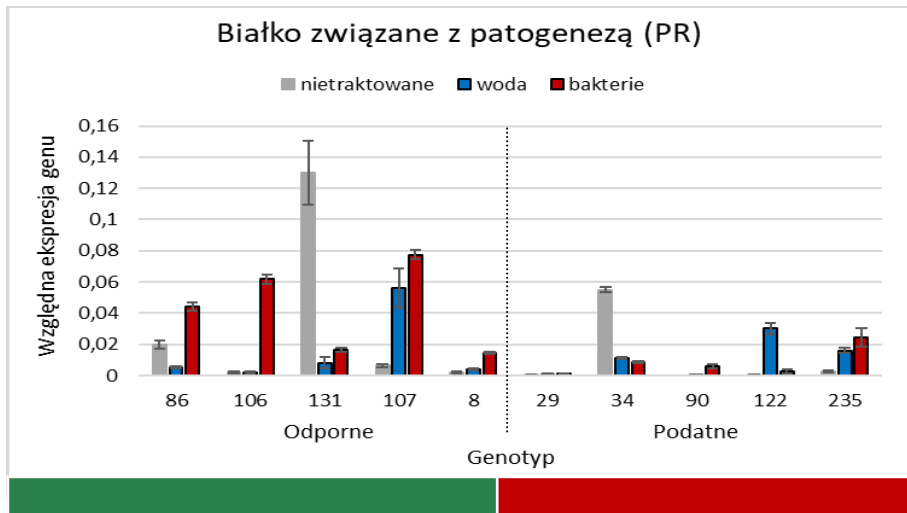
### **T 1: Analiza transkryptomyczna w bulwach w średniej fazie rozwoju infekcji, tj. 24 h po zakażeniu przez *D. solani* Badania ekspresji wybranych genów różnicowych wczesnej fazy rozwoju infekcji tj. 8 h po zakażeniu przez bakterie.**

Analiza głównych składowych na danych DESeq2 dla wszystkich prób wykazała, że profil ekspresji genów różnił się pomiędzy bulwami nietraktowanymi a bulwami poddanymi zranieniu lub inokulowanym w zranienie. Pierwsza składowa wyjaśniała 68 % ogólnej zmienności. Analiza pozwala również na oddzielenie grupy genotypów odpornych od podatnych, na podstawie pierwszej (68%) i drugiej składowej (wyjaśniającej 18 % wariacji).

W bulwach zranionych i inokulowanych przez bakterie *D. solani*, 24 h po inokulacji, liczba genów o statystycznie istotnej różnicy w ekspresji i krotności zmiany co najmniej 2 w próbie złożonej z genotypów ziemniaka o odpornych bulwach na bakterie, w porównaniu do grupy genotypów o bulwach podatnych, wynosiła 1862. Analogicznie, w bulwach zranionych traktowanych wodą i w bulwach nietraktowanych liczba genów różnicowych wynosiła 1159 i 2108.

Wśród genów o istotnie wyższej ekspresji po 24 h od zakażenia znajdują się również geny, które wybrano w 2022 r., po 8 h od zakażenia, jako geny, które mogą być związane z wyższą odpornością na bakterie *D. solani*. Poza tym wśród genów różnicowych znajdują się białka takie jak białka związane z patogenezą (PR) (białka te wykazują właściwości antybiotyczne, indukują zgrubienia ścian komórkowych), białka WRKY, czynniki transkrypcyjne regulujące wiele procesów w roślinach, w tym w obronie roślin przed patogenami, białka oksydaz premnospirodienowych, ograniczających wzrost patogenów, obniżając wielkość porażenia roślin, białka obronne przed patogenami proteazy subtylizynopodobne SBT1.7. Ekspresja wybranych genów będzie weryfikowana w pojedynczych genotypach odpornych i podatnych w kolejnym roku badań..

Na Rysunkach pokazano przykłady weryfikacji ekspresji wybranych genów różnicowych wczesnej fazy rozwoju infekcji tj. 8 h po zakażeniu przez bakterie w pojedynczych genotypach odpornych (kolor zielony) i podatnych (kolor czerwony). Potwierdzono związek wybranych genów kandydujących z wyższą odpornością bulw na bakterie *D. solani*.



**Oznaczenia:**

**Bakterie** – bulwy zranione i inokulowane przez bakterie

**Woda** – bulwy zranione i traktowane wodą

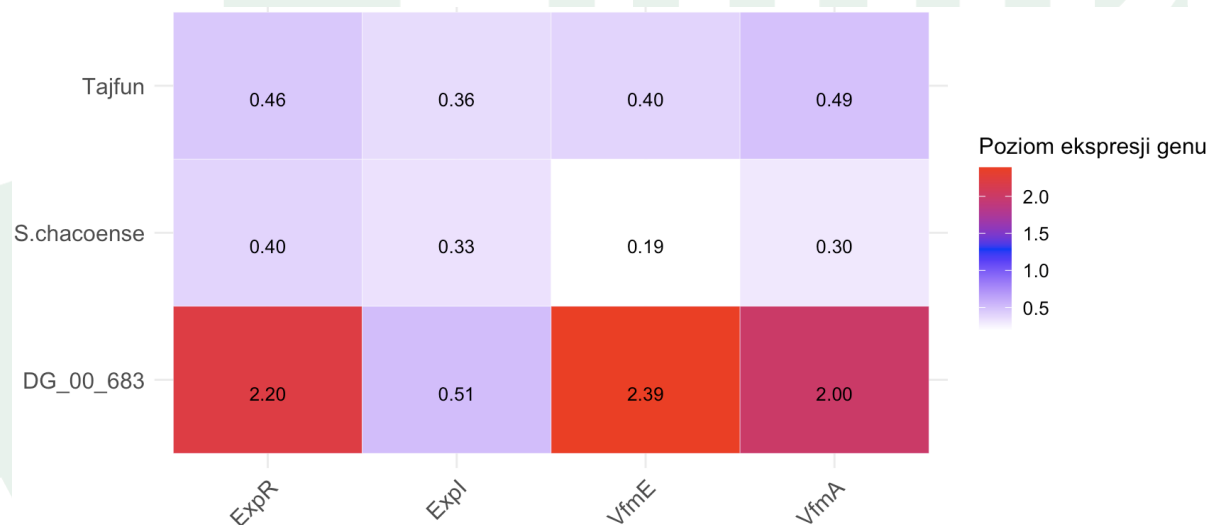
**Nietraktowane** – bulwy niezranione.

**T2: Ocena wpływu glikoalkaloidów z liści roślin wyselekcjonowanych spośród genotypów *Solanum* na czynniki wirulencji bakterii *D. solani* i *P. brasiliense*: **quorum sensing**, enzymatyczną zdolność rozkładania pektyn w pożywce, zdolność ruchu i tworzenie biofilmu.**

GA złożone z czakoniny i solaniny izolowane z *S. chacoense* i odmiany Tajfun wykazywały działanie inhibitorowe na ekspresję genów QS w *D. solani*, najsilniejsze w przypadku genu *vfmE*. Supresja genów QS przez GA może bezpośrednio przyczynić się do osłabienia zdolności *D. solani* do wywołania objawów chorobowych roślin, ponieważ QS reguluje nie tylko PCWDEs, ale także inne czynniki wirulencji.

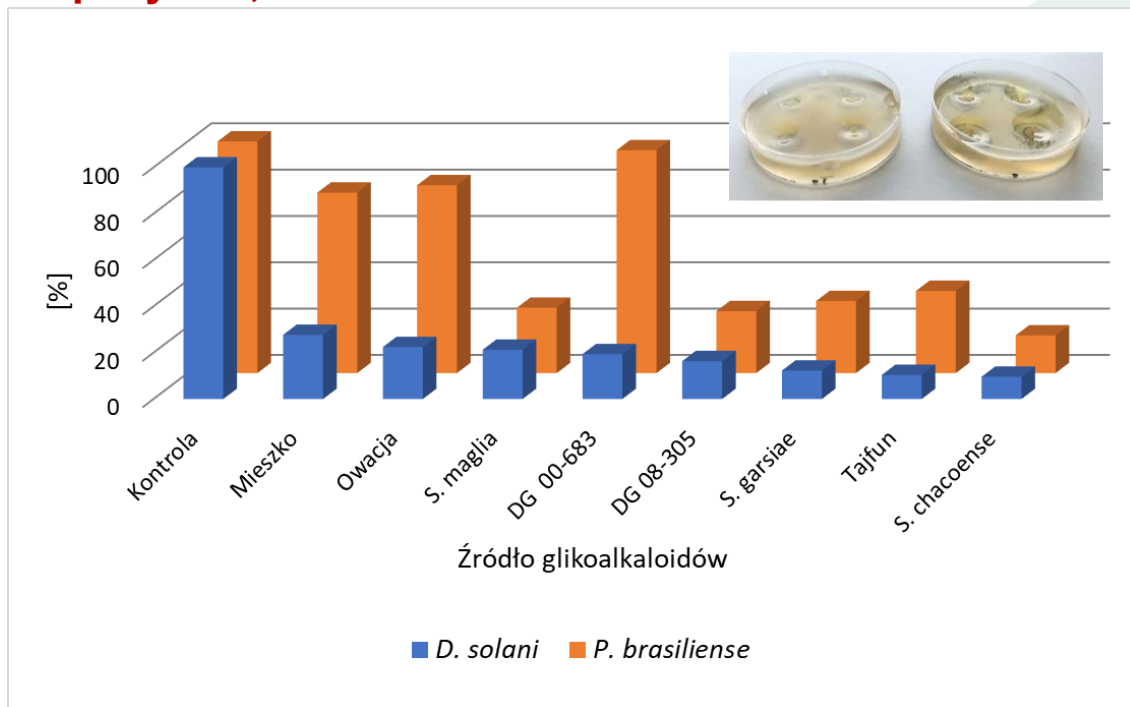
GA z mieszańca międzygatunkowego *Solanum* - DG 00-683, złożone z czakoniny, solaniny i leptyniny I, w *P. brasiliense* indukowały ekspresję genu syntazy AHL *expl* - hamując jednocześnie ekspresję genu białka receptorowego *expR* a w *D. solani* – odwrotnie. Indukowały również ekspresję badanych genów *vfm* w *D. solani*.

GA z różnych źródeł mogą modulować system QS u bakterii patogennych w różny sposób. Wyniki wskazują na złożoną interakcję pomiędzy GA a systemem/systemami QS bakterii, podkreślając potencjał GA jako naturalnych inhibitorów komunikacji bakteryjnej.



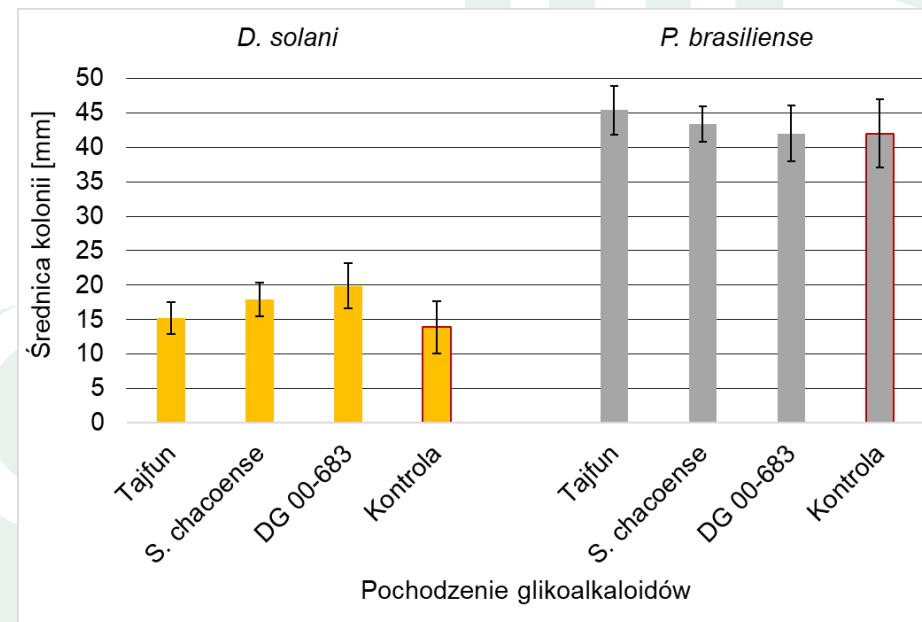
Względna ekspresja genów u bakterii *Dickeya solani* po 8 h inkubacji w pożywce Luria Berthani z dodatkiem glikoalkaloidów pochodzących z liści ziemniaka odmiany Tajfun, dzikiego gatunku *Solanum chacoense* i mieszańca *Solanum* spp. DG 00-683.

**T2: Ocena wpływu glikoalkaloidów z liści roślin wyselekcjonowanych spośród genotypów *Solanum* na czynniki wirulencji bakterii *D. solani* i *P. brasiliense*: quorum sensing, enzymatyczną zdolność rozkładania pektyn w pożywce, zdolność ruchu i tworzenie biofilmu.**



Obniżenie zdolności rozkładania pektyn, mierzone objętością zagłębienia w pożywce CVP, wyrażone jako procent w stosunku do kontroli.

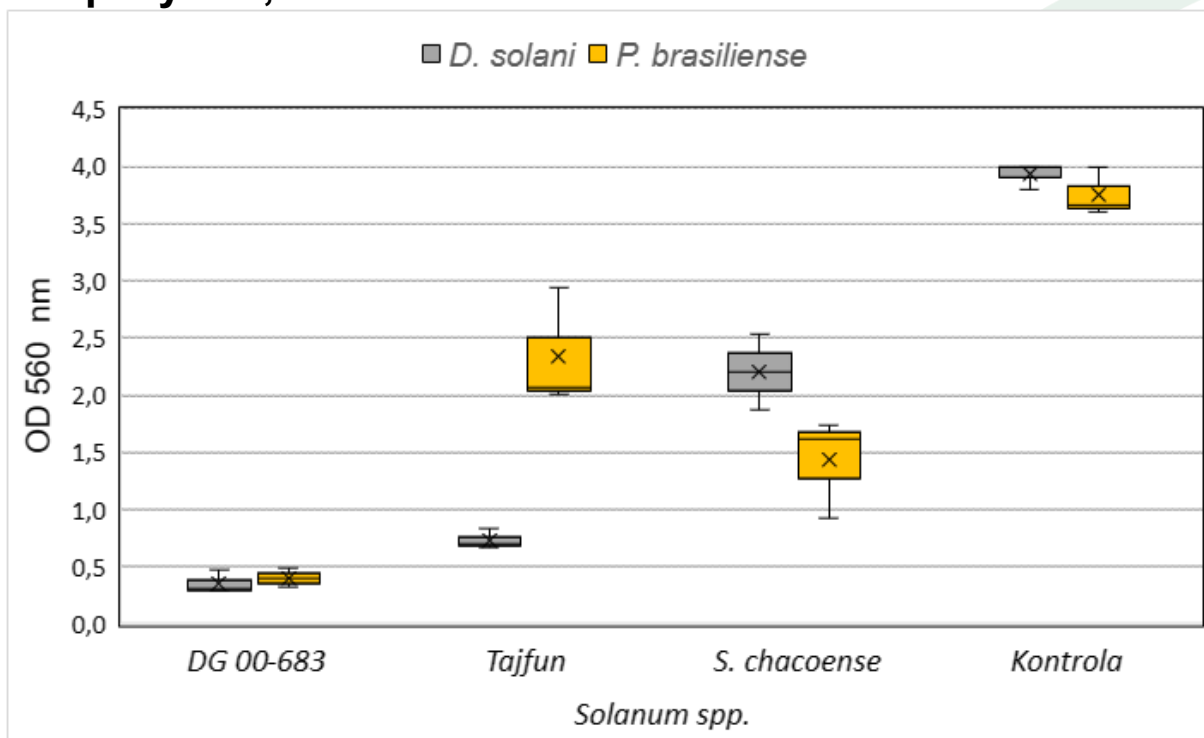
❑ Stwierdzono istotny wpływ testowanych GA na enzymatyczną zdolność rozkładania pektyn w pożywce. Najsilniejszy efekt wystąpił dla GA z *S. chacoense*.



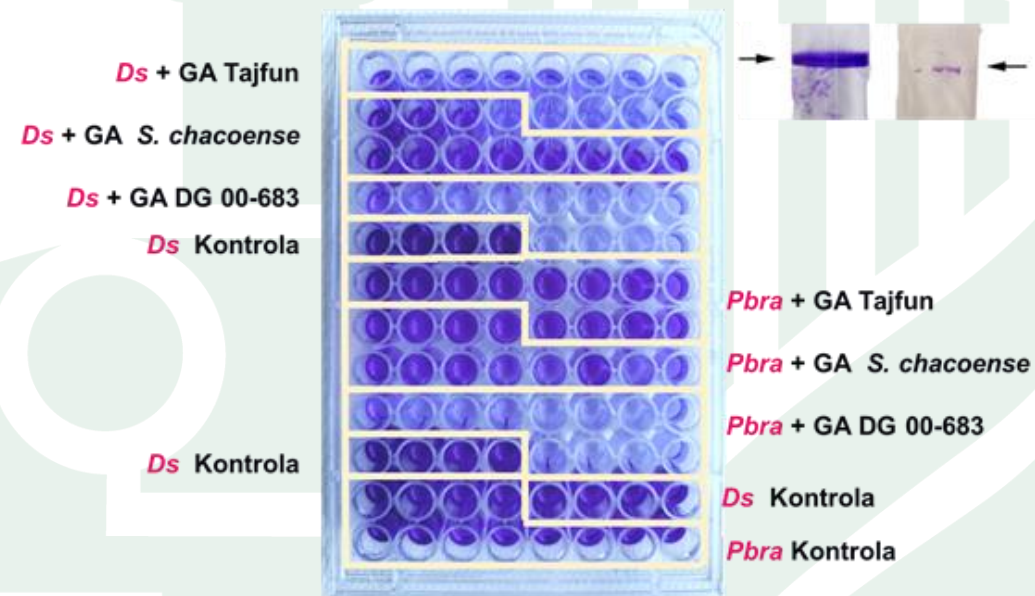
Zdolność ruchu *Dickeya solani* i *Pectobacterium brasiliense* do poruszania się w pożywce Luria Berthani z dodatkiem 0,3% agaru oraz z dodatkiem glikoalkaloidów (lub bez – kontrola) wyrażona średnicą kolonii po 24 h inkubacji w temperaturze 30°C.

❑ Nie stwierdzono wpływu testowanych glikoalkaloidów na zdolność poruszania się (pływania) bakterii.

**T2: Ocena wpływu glikoalkaloidów z liści roślin wyselekcjonowanych spośród genotypów *Solanum* na czynniki wirulencji bakterii *D. solani* i *P. brasiliense*: quorum sensing, enzymatyczną zdolność rozkładania pektyn w pożywce, zdolność ruchu i **tworzenie biofilmu**.**



Tworzenie biofilmu bakterii *Dickeya solani* i *Pectobacterium brasiliense* w pożywce Luria Berthani z dodatkiem glikoalkaloidów po 8 h inkubacji w temperaturze 30° C.



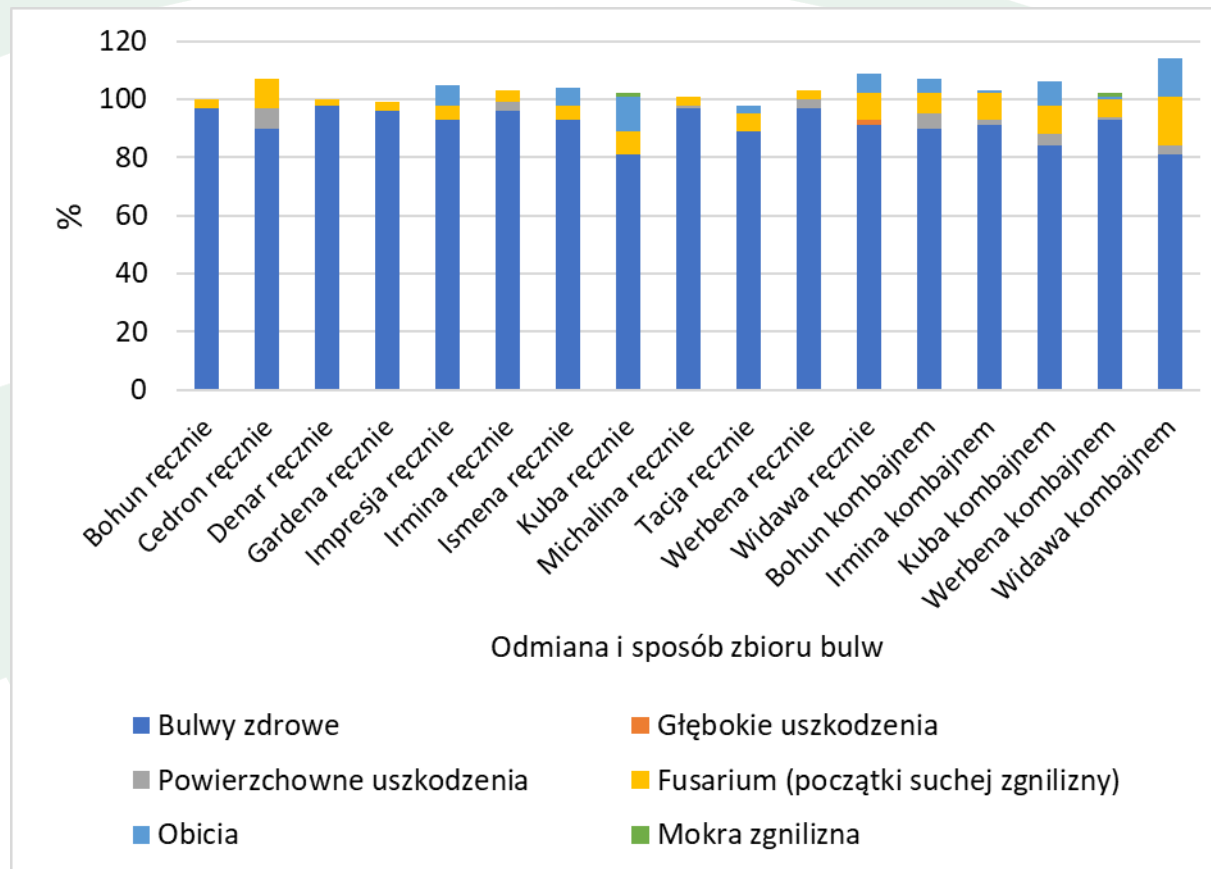
Pośrednia metoda oceny zdolności bakterii *Dickeya solani* i *Pectobacterium brasiliense* do tworzenia biofilmu w pożywce Luria Berthani z dodatkiem glikoalkaloidów po 8 h inkubacji w temperaturze 30° C.

- ❑ **Stwierdzono istotny wpływ testowanych glikoalkaloidów na tworzeniu biofilmu.** Najsilniejsze hamowanie zaobserwowano dla GA z DG 00-683.



### T 3: Analiza zdolności przechowalniczej bulw ziemniaka i porażenia przez patogeny ziemniaka powodujące choroby przechowalnicze

Po zbiorze bulw stwierdzono występowanie objawów suchej zgnilizny we wszystkich 12 testowanych odmianach, zbieranych ręcznie lub kombajnem. Najwyższy udział bulw porażonych w odmianach Widawa (36%) i Denar (29%). Objawy szarych plam pod skórą opisano jako obicia, występowały w niewielkim procencie (średnio 2,9%, od 0 do 12%) w bulwach zbieranych ręcznie, natomiast w większej ilości w bulwach zbieranych kombajnem (średnio 5,6%, od 1% do 13%). Wykryto dwie pojedyncze bulwy porażone mokrą zgnilizną w odmianie Kuba (zbieranej ręcznie) i odmianie Werbena (zbieranej kombajnem). Średnio poziom powierzchniowych uszkodzeń bulw zbieranych kombajnem był wyższy niż bulw zbieranych ręcznie.



W bulwach, przechowywanych w warunkach hot-box'u, obserwowano występowanie suchej zgnilizny. Poza tym inkubacja bulw w ciepłe i wilgoci pozwoliła na wykrycie latentnego porażenia bulw przez bakterie pektynolityczne w jednej odmianie, Gardena. W przypadku tej odmiany, zaleca się obserwowanie przechowywanych bulw pod względem wystąpienia objawów mokrej zgnilizny bulw.

## Publikacja:

- ❑ Sołtys-Kalina, D., Grupa-Urbańska, A., Lebecka, R., Tallant, M., Kellenberger, I., Dupuis, B. 2023. Increase of glycoalkaloid content in potato tubers by greening as a method to reduce the spread of *Pectobacterium* and *Dickeya* spp. in seed production systems. *Microorganisms* 11: 605. <https://doi.org/10.3390/microorganisms11030605> (IF pięcioletni - 4,8; pkt dla czasopisma 40)

## Streszczenia konferencyjne:

- ❑ Lebecka R., Grupa-Urbańska A., Sołtys-Kalina D., Szajko K. 2023. RNAseq expression analysis of resistant and susceptible potato tubers at an early stage of infection with *Dickeya solani*. Streszczenie: EAPR Pathology & Pests Section Meeting, 3rd to 6th September 2023 Arras France, „Dealing with potato pathogens & pests in a context of global change”. Str. 44
- ❑ Grupa-Urbańska A, Sołtys-Kalina D, Lebecka R. 2023. Glycoalkaloids from *Solanum* spp leaves modify virulence factors in *Dickeya solani* and *Pectobacterium brasiliense* sp. nov. Streszczenie: EAPR Pathology & Pests Section Meeting, 3rd to 6th September 2023 Arras France, „Dealing with potato pathogens & pests in a context of global change”. Str. 42
- ❑ Grupa-Urbańska A, Sołtys-Kalina D, Lebecka R. 2023. Glikoalkaloidy *Solanum* spp jako modyfikatory czynników wirulencji w *Dickeya solani* i *Pectobacterium brasiliense* sp. nov . Konferencja „Dni Młodego Naukowca”, 9-10.11.2023 r. Instytut Hodowli i Aklimatyzacji Roślin - Państwowy Instytut Badawczy w Radzikowie (w druku)