

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

2021-2025

Lebecka R., Sołtys-Kalina D., Grupa-Urbańska A., Szajko K., Michalak K.,
Marczewski W.

e-mail: r.lebecka@ihar.edu.pl

Przyznane środki 1 885 000, zł



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

CELE tematów badawczych realizowanych w latach 2021-2025 r.:

Zdobycie wiedzy na temat:

- 1) molekularnych uwarunkowań uszkodzenia bulw na skutek zranienia oraz zranienia plus zakażenia przez bakterie *D. solani*, w bulwach, we wczesnej, średniej i późnej fazie tj. 8, 24 i 48 h po inokulacji,
- 2) zawartości glikoalkaloidów w ekstraktach z liści w wybranych genotypach rodzaju *Solanum*,
- 3) wpływu glikoalkaloidów na wzrost, żywotność, enzymatyczną zdolność rozkładania pektyn, zdolność ruchu, tworzenie biofilmu, quorum sensing, geny *ohrR* i *fis* u bakterii *D. solani* i *P. brasiliense* sp. nov.,
- 4) wpływ glikoalkaloidów w bulwach ziemniaka poddanych zielenieniu w warunkach sztucznego oświetlenia na wielkość gnicia i porażenie roślin czarną nóżką,
- 5) wpływu α -solaniny i α -czakoniny na aktywność pomp efflux, żywotność i dynamikę tworzenia biofilmu u bakterii *D. solani* i *P. brasiliense* sp. nov.,
- 6) 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,
- 7) występowanie bakteryjnych infekcji latentnych w roślinach *in-vitro* po termoterapii - odmian i zaawansowanych rodów hodowlanych.



1) Molekularne uwarunkowania reakcji bulw ziemniaka na zranienie i zakażenie *Dickeya solani*

Fazy odpowiedzi ziemniaka: wczesna (8 h), średnia (24 h), późna (48 h)

Odpowiedź wczesna (8 h)

W bulwach odpornych stwierdzono aktywację szlaków wtórnego metabolizmu, zwłaszcza:

- biosyntezy fenylopropanoidów,
- metabolizmu fenyloalaniny i tyrozyny,
- metabolizmu aminocukrów, nukleotydów cukrowych i glutationu.

Wskazuje to na **wczesne uruchomienie lignifikacji i suberynizacji**, pełniących funkcję bariery obronnej tkanki.

Odpowiedź średnia (24 h)

Utrzymywała się podwyższona aktywność szlaków obronnych, w tym fenylopropanoidów oraz metabolizmu glutationu.

Reakcja obserwowana w 8 h jest kontynuowana i stabilizowana.

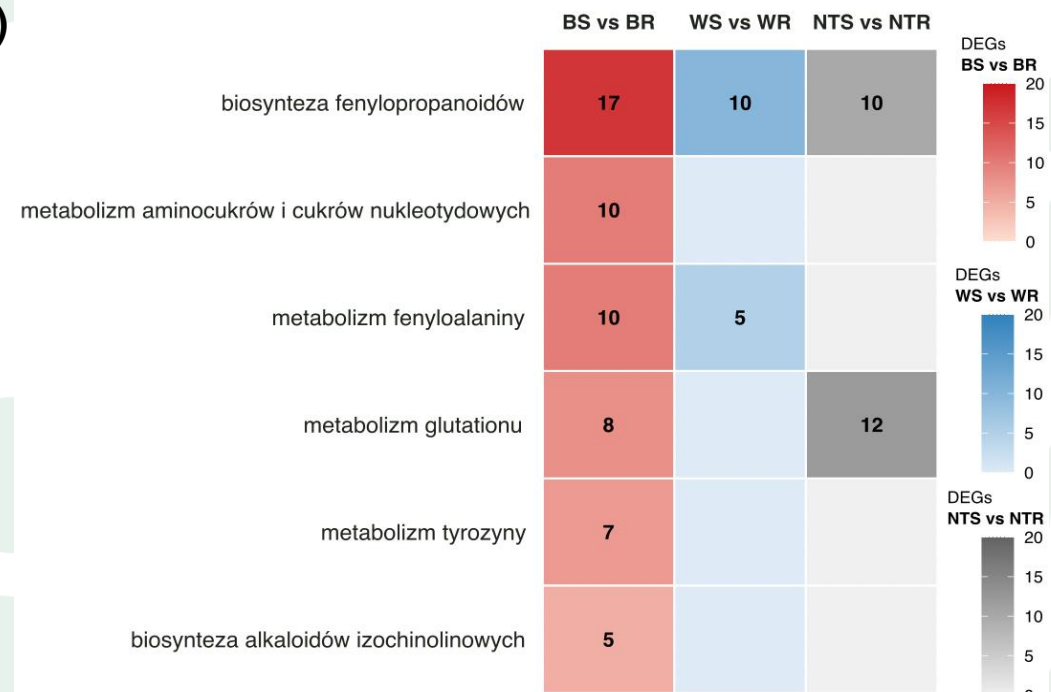
Odpowiedź późna (48 h)

Dominowały procesy związane z utrwalaniem odpowiedzi obronnej, m.in.:

- wzmacnianie ściany komórkowej (peroksydazy),
- lignifikacja i suberynizacja,
- reakcje oksydacyjno-redukcyjne.

Prowadzi to do trwałego wzmocnienia bariery przeciwbakteryjnej.

Gen PoPA (LOC102577694, chromosom II), związany z suberynizacją, wykazywał podwyższoną ekspresję w bulwach odpornych i został zlokalizowany w QTL odporności, co wskazuje na jego rolę jako **genu kandydującego**.



Najsilniej wzbogacone szlaki KEGG 8 godzin po inokulacji. Kolory przedstawiają liczbę genów różnicowo ekspresjonowanych (DEGs) w porównaniach: BS vs BR (bulwy podatne vs odporne, ranione i inokulowane), WS vs WR (bulwy podatne vs odporne, ranione i traktowane wodą) oraz NTS vs NTR (bulwy podatne vs odporne, nietraktowane).



Przykład reakcji na bakterie *D. solani* bulw inokulowanych w zranienie genotypów „odpornego” (24) i „podatnego” (16), trzy dni po inokulacji.

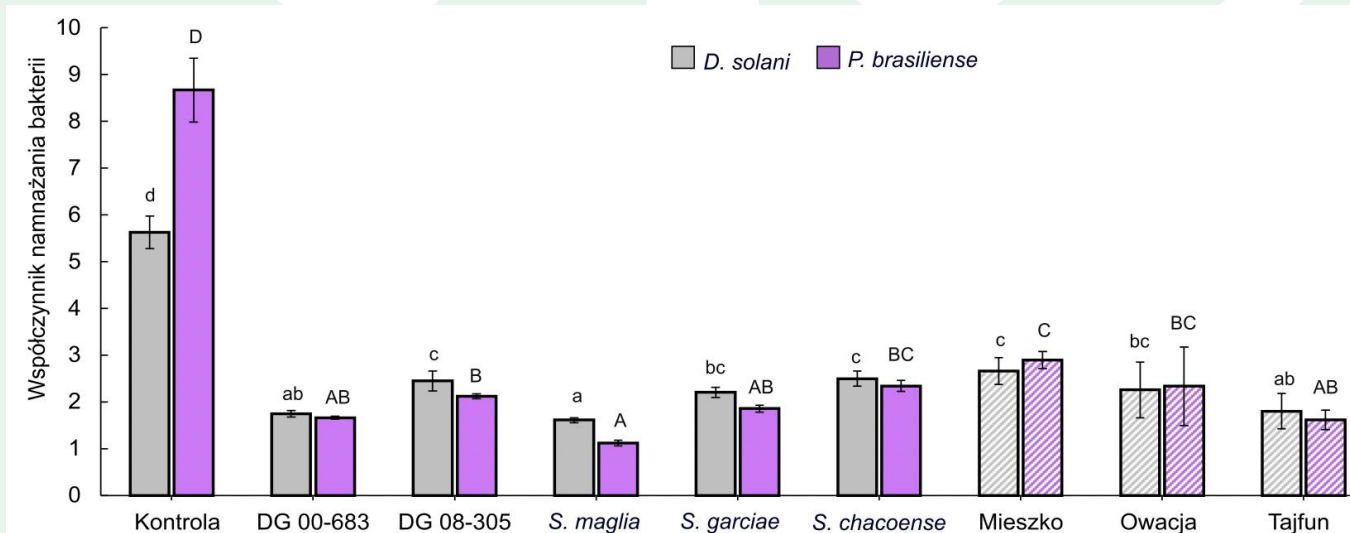
2) Zawartość glikoalkaloidów (GLA) w ekstraktach z liści w wybranych formach ziemniaka: mieszańcach *Solanum* spp., dzikich gatunkach ziemniaka i odmianach ziemniaka.

Formy ziemniaka	Glikoalkaloidy					
	Leptynina I	Leptynina II	Solasonina	Solamarginina	α-Solanina	α-Czakonina
DG 08-305	0	0	1	2	3	4
DG 00-683	1	0	0	0	2	2
<i>S. maglia</i>	0	0	0	0	4	4
<i>S. chacoense</i>	0	0	0	0	2	5
<i>S. garciae</i>	2	1	1	1	4	5
Tajfun	0	0	0	0	4	4
Owacja	0	0	0	0	3	4
Mieszko	1	0	0	0	3	3

Ilość GLA oznaczono metodą HPLC–MS; skala: 0 = brak; 1 = 0 < C < 25 000; 2 = 25 000 < C < 50 000; 3 = 50 000 < C < 75 000; 4 = 75 000 < C < 100 000; 5 = C > 100 000.

3) Wpływ ekstraktów zawierających glikoalkaloidy na wzrost *D.solani* i *P. brasiliense*

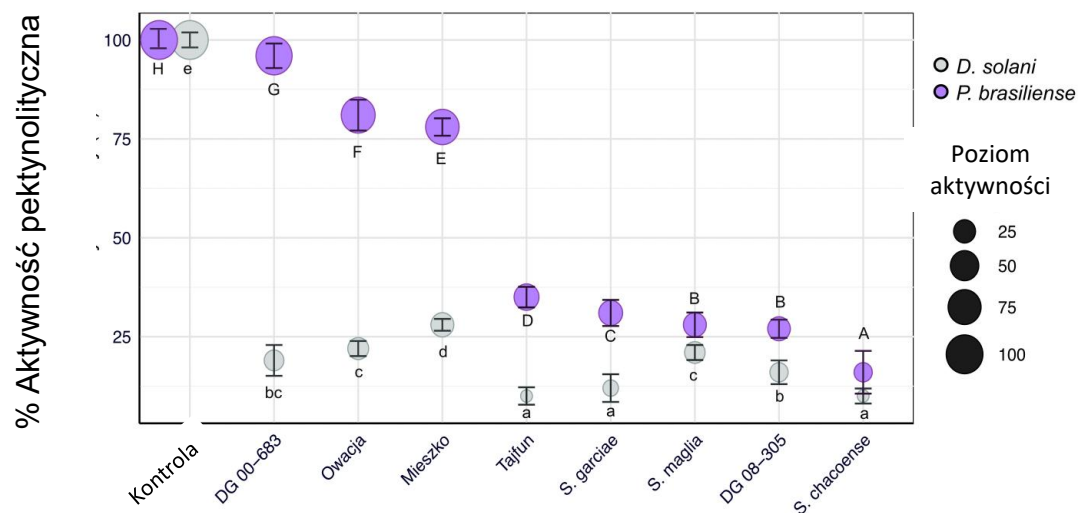
- Ekstrakty zawierające glikoalkaloidy istotnie obniżały współczynnik namnażania u obu gatunków bakterii, a najsilniejsze działanie wykazały GLA pochodzące z *S. maglia*.



Współczynnik namnażania bakterii *D. solani* i *P. brasiliense* po 24 h inkubacji z glikoalkaloidami pozyskanymi z liści wybranych form ziemniaka. Różne litery oznaczają istotne różnice ($p < 0,05$, test Duncana).

3) Wpływ ekstraktów zawierających glikoalkaloidy na żywotność i zdolność rozkładania pektyn *D.solani* i *P. brasiliense*

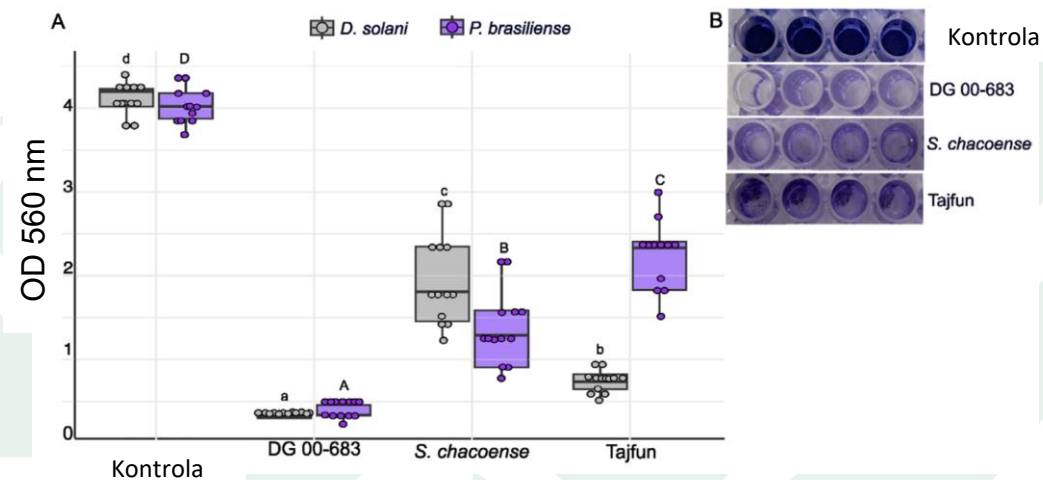
- Ekstrakty zwiększały odsetek martwych komórek obu bakterii. Najsilniejszy efekt obserwowano dla ekstraktów z *S. chacoense* i *S. maglia*, które powodowały najwyższą śmiertelność zarówno u *P. brasiliense*, jak i *D. solani*.
- Ekstrakty zawierające glikoalkaloidy obniżały aktywność pektynolityczną bakterii, a najsilniejsze zahamowanie obserwowano dla ekstraktów pochodzących z *S. chacoense*.



Aktywność pektynolityczna *D. solani* i *P. brasiliense* (CVP) po 48 h inkubacji w obecności ekstraktów z glikoalkaloidami. Wyniki przedstawiono jako procent wartości kontrolnej; różne litery oznaczają istotne różnice (test Duncana, $p < 0,05$).

4) Wpływ ekstraktów na tworzenie biofilmu, quorum sensing, geny *ohrR* i *fis* u bakterii *D. solani* i *P. brasiliense*

- Ekstrakty zawierające glikoalkaloidy hamowały tworzenie biofilmu.



A–B. Tworzenie biofilmu przez *D. solani* i *P. brasiliense* po 6 h inkubacji w obecności ekstraktów z glikoalkaloidami; OD₅₆₀, różne litery oznaczają istotne różnice ($p < 0,05$).

- Ekstrakty zawierające glikoalkaloidy zaburzały funkcjonowanie systemów quorum sensing; największe obniżenie ekspresji genów QS (*expI*, *expR*, *vfmA*, *vfmE*) wywołały ekstrakty z *S. chacoense* oraz odmiany Tajfun.

3) Wpływ ekstraktów zawierających glikoalkaloidy na geny *ohrR* i *fis* u bakterii *D. solani* i *P. brasiliense*

- Ekstrakty wpływały na ekspresję genów *ohrR* i *fis*. Najwyższą ekspresję tych genów indukowały ekstrakty z odmiany Tajfun, natomiast ekstrakty z *S. chacoense* i DG 00-683 obniżały ekspresję *fis*, co wskazuje na ich działanie ograniczające wirulencję bakterii.

Ekspresja genów *ohrR* i *fis* u *D. solani*

	<i>OhrR</i>	<i>fis</i>	poziom ekspresji genu
Tajfun	0.15	1.74	2.0
<i>S. chacoense</i>	0.38	0.56	1.5
DG 00-683	0.18	0.92	1.0

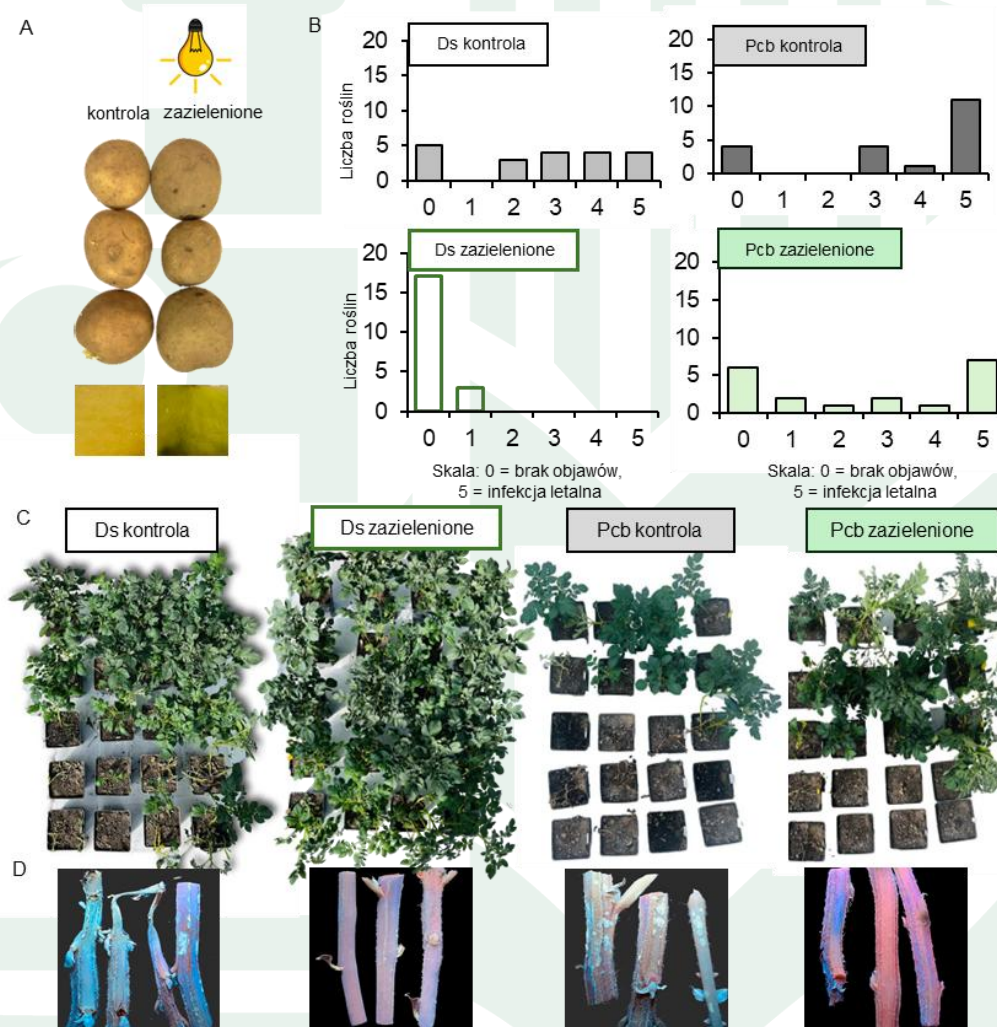
Ekspresja genów *ohrR* i *fis* u *P. brasiliense*

	<i>OhrR</i>	<i>fis</i>	poziom ekspresji genu
Tajfun	1.35	3.00	3.0
<i>S. chacoense</i>	0.30	0.42	2.0
DG 00-683	0.68	0.95	1.0

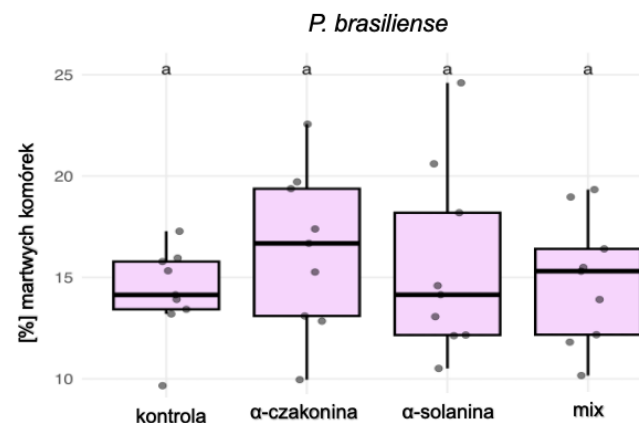
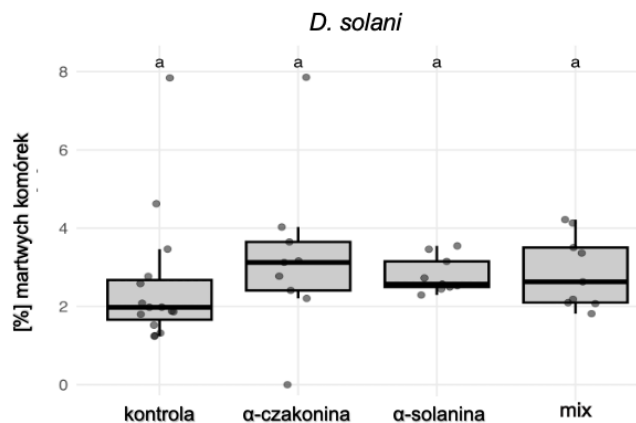
Ekspresja genów *ohrR* i *fis* u *D. solani* i *P. brasiliense* po 8 h ekspozycji na glikoalkaloidy ($2^{-\Delta Ct}$).

- Zazielenienie bulw wyraźnie ograniczało rozwój czarnej nóżki wywołanej przez *D. solani*: większość roślin z bulw zielonych nie wykazywała objawów choroby, a porażenie łodyg było wyraźnie słabsze, co potwierdzają obserwacje wizualne i pod UV.
- W przypadku *P. brasiliense* efekt ochronny był mniej wyraźny.

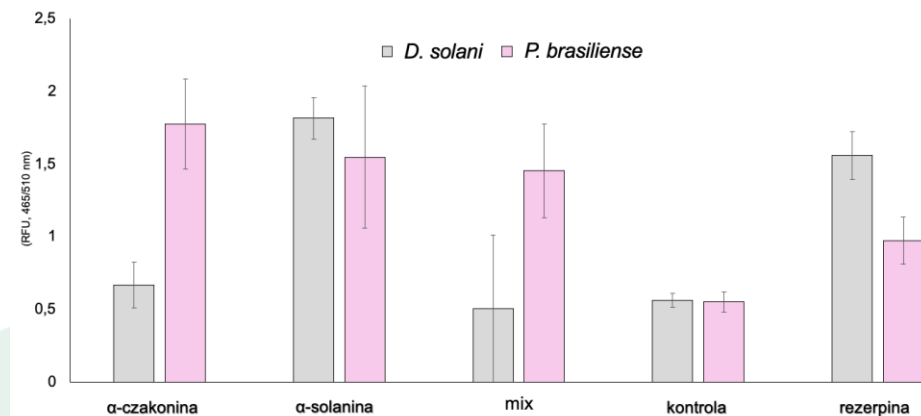
4) Wpływ glikoalkaloidów w bulwach ziemniaka poddanych zazielenieniu w warunkach sztucznego oświetlenia na wielkość gnicia i porażenie roślin czarną nóżką



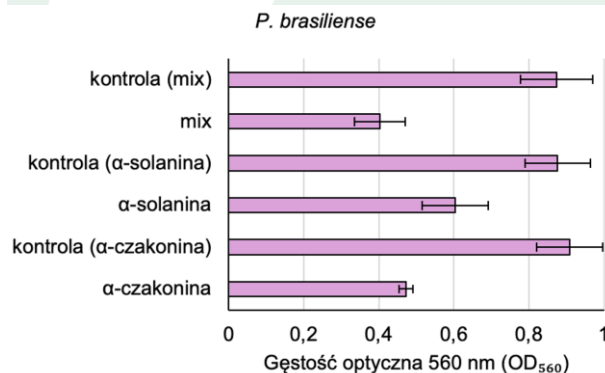
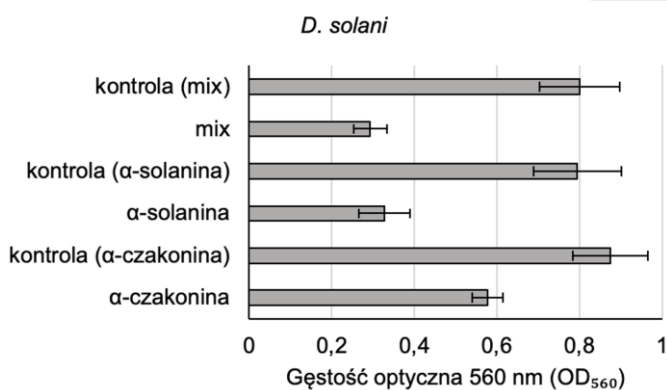
5) wpływu α -solaniny i α -czakoniny na aktywność pomp efflux, żywotność i dynamikę tworzenia biofilmu u bakterii *D. solani* i *P. brasiliense*



Liczba martwych komórek *D. solani* i *P. brasiliense* po 24 h inkubacji z α -solaniną, α -czakoniną i mieszaniną 1:1; brak różnic istotnych ($p \geq 0,05$).



Akumulacja EtBr w komórkach *D. solani* i *P. brasiliense* po 24 h w obecności GLA; wyższe RFU wskazuje na osłabienie aktywności pomp efflux. Rezerpina = kontrola pozytywna.



Tworzenie biofilmu przez *D. solani* i *P. brasiliense* po 24 h inkubacji z GLA; różne litery oznaczają różnice istotne (test Duncana, $p < 0,05$).

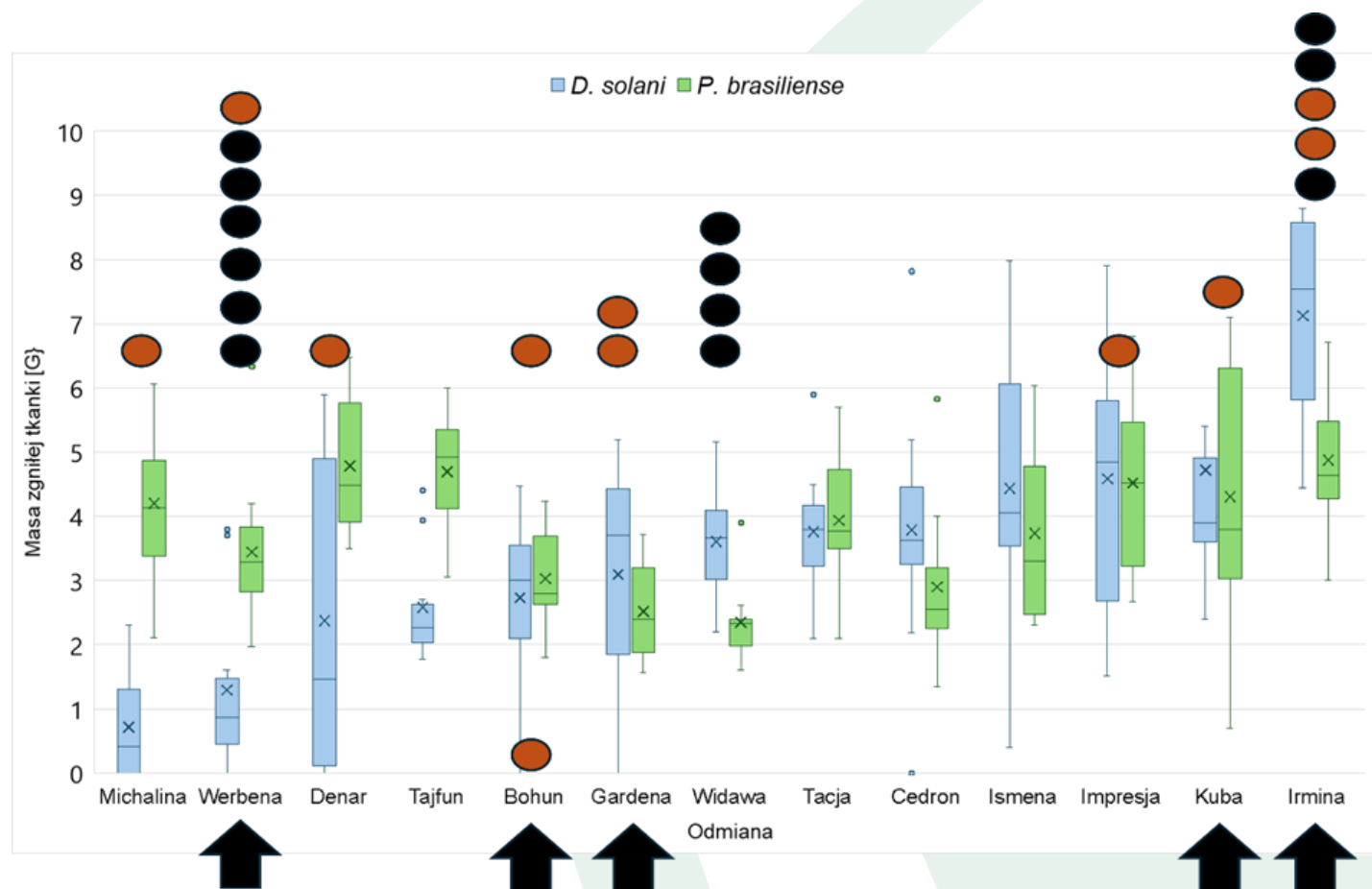
α -solanina i α -czakonina:

- nie zwiększały śmiertelności komórek,
- osłabiały aktywność pomp efflux,
- istotnie redukowały tworzenie biofilmu.

6) Analiza zdolności przechowalniczej bulw ziemniaka i porażenia przez patogeny ziemniaka powodujące choroby przechowalnicze.

Porażenie bulw odmian ziemniaka przez bakterie *D. solani* i *P. brasiliense* w teście punktowej inokulacji bulw, trzy dni po inkubacji w temperaturze 27 °C.

- Liczba bulw z objawami gnicia spowodowanymi przez bakterie pektynolityczne, na dole rysunku – po zbiorze bulw, na górze – po przechowywaniu bulw w hot-box (7 dni w temperaturze 23 °C, wilgotność względna 80 – 85%). Bulwy zbierane ręcznie – brązowe (300 bulw w latach 2021-2023), bulwy zbierane kombajnem - czarne (300 bulw). Odmiany zbierane kombajnem oznaczono czarną strzałką.
- Nie wykazano związku pomiędzy poziomem odporności bulw odmian ziemniaka na porażenie przez bakterie pektynolityczne a występowaniem porażenia latentnego bulw. Stosowanie hot-boxu pozwala na wyróżnienie odmian ziemniaka, które należy monitorować w czasie przechowywania.



7) Występowanie infekcji latentnej bakterii w roślinach *in-vitro* odmian i zaawansowanych rodów hodowlanych po termoterapii

Badania obejmowały: rośliny *in vitro* 30 odmian ziemniaka, liście 23 zaawansowanych rodów hodowlanych ziemniaka po zastosowaniu termoterapii (5 tygodni w temperaturze dnia 16h, 38 °C i nocy 8h, 32 °C).

Na podstawie sekwencjonowania regionu V3-V4 16S rRNA wykryto bakterie w dwóch spośród 30 badanych odmian ziemniaka i we wszystkich 23 próbach z zaawansowanych rodów hodowlanych.

W wielu próbach dominowały bakterie endofityczne, takie jak *Enterobacter*, *Paenibacillus* i *Pseudomonas*, które mogą występować naturalnie w tkankach roślinnych. Niektóre z przedstawicieli tych rodzajów wykazują jednak potencjał patogeniczny wobec bulw ziemniaka, n.p.: *Enterobacter cloacae* (mokra zgnilizna ziemniaka, Irak), *Pseudomonas marginalis* (Iran), *Pseudomonas palleroniana*, *Pseudomonas fluorescens* (Chiny). W jednej z odmian wykryto sekwencje rodziny *Erwiniaceae*, do której należą patogeny pektynolityczne, m.in. *Pantoea agglomerans* – sprawca mokrej zgnilizny warzyw (kapusta chińska, pochrzyn). W materiałach rodów hodowlanych wykryto także bakterie rodzaju *Paenibacillus*, *Bacillus pumilus* (mokra zgnilizna bulw ziemniaka, Tunezja).

- **W żadnej z 53 prób nie wykryto bakterii kwarantannowych patogenicznych dla ziemniaka.**
- **Nie wykryto bakterii z rodzajów *Pectobacterium* ani *Dickeya*, głównych sprawców mokrej zgnilizny bulw w Polsce.**
- Wykryte bakterie należały głównie do endofitów, jednak część z nich (np. *Enterobacter*, *Pseudomonas*) wykazuje potencjał patogeniczny.
- Termoterapia nie eliminuje całkowicie bakterii endofitycznych – część z nich może przetrwać w roślinach *in vitro*.
- Wyniki wskazują na potrzebę **rutynowego badania roślin *in vitro* po termoterapii** w celu wykrywania infekcji latentnych.
- Zasadne jest wprowadzenie **rozszerzonej diagnostyki mikrobiologicznej** materiałów hodowlanych, wykraczającej poza wykrywanie organizmów kwarantannowych.
- Wyniki mają charakter wstępny i wymagają dalszych analiz w celu szczegółowej identyfikacji wykrytych gatunków.

Publikacje

- Sołtys-Kalina D., et al. Increase of glycoalkaloid content in potato tubers by greening as a method to reduce the spread of *Pectobacterium* and *Dickeya* spp. in seed production system. 2023. MDPI, **Microorganisms** 2023, 11, 605, **IF = 4,926; Punkty MNiSW 40**
- Grupa-Urbańska A., et al. 2025. Effect of potato tuber greening on blackleg development by *Dickeya solani* and *Pectobacterium brasiliense*. **Journal of Plant Protection Research**, 65(2), 274-279, <https://doi.org/10.24425/jppr.2025.153826> **IF = 0,7; Punkty MNiSW 100**
- Grupa-Urbańska A., et al. 2025. Antimicrobial activity of glycoalkaloids from *Solanum* spp. and their potential for 4 control of *Dickeya solani* and *Pectobacterium Brasiliense*, **Plant Pathology**, 74:2715-2727, <https://doi.org/10.1111/ppa.70043> **IF = 2,8; Punkty MNiSW 140**
- Grupa-Urbańska A., et al. 2025. New insights into the role of secondary metabolic pathways in resistance of potato to *Dickeya solani*. MDPI International Journal of Molecular Sciences, 26(17),8370, DOI: [10.3390/ijms26178370](https://doi.org/10.3390/ijms26178370) **IF = 5,7; Punkty MNiSW 140**

Doniesienia konferencyjne

- Lebecka R., et al.: RNAseq expression analysis of resistant and susceptible potato tubers at an early stage of infection with *Dickeya solani*. 2023. EAPR, Pathology & Pests Section Meeting, „Dealing with potato pathogens & pests in a context of global change”. 3-7 września, 2023 (plakat)
- Grupa-Urbańska A, et al. 2022. Wpływ glikoalkaloidów z liści różnych *Solanum* spp. na enzymy pektynolityczne u bakterii *Dickeya solani* i *Pectobacterium brasiliense*. "Nowoczesne spojrzenie na fitopatologię" Konferencja PTFiT, Poznań 7-8.09.2022 (wykład)
- Grupa-Urbańska A, et al. 2023. Glycoalkaloids from *Solanum* spp leaves modify virulence factors in *Dickeya solani* and *Pectobacterium brasiliense* sp. nov. 2023. EAPR, Pathology & Pests Section Meeting, „Dealing with potato pathogens & pests in a context of global change”. 3-7 września, 2023 (wykład)
- Grupa-Urbańska A, et al. 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. IHAR-PIB w Radzikowie, (plakat)
- Sołtys-Kalina D., et al. 2021. Influence of glycoalkaloids in leaf extract of different *Solanum* plants on the growth of *Dickeya solani* and *Pectobacterium brasiliense* 21st Triennial Conference Kraków, July 4-8, 2022 (plakat)
- Lebecka R.et al. 2024. RNAseq expression analysis of potato tubers differing in resistance to soft rot caused by bacteria *Dickeya solani*. 22nd EAPR Triennale Conference, 7-12 lipiec, 2024, Oslo, Norwegia (wykład)
- Grupa-Urbańska A. et al. 2024 „Antybakteryjne działanie glikoalkaloidów z *Solanum* spp.: na *Dickeya solani* i *Pectobacterium brasiliense*.” Konferencja PTFiT 2024 pt. „Zdrowie roślin w dobie aktualnych wyzwań”, 24-26 września w Warszawie (wykład)
- Lebecka R. et al. 2025. Bulk segregant RNA-seq reveals key genes associated with potato resistance to *Dickeya solani*. 20th Joint Meeting of the EAPR "Breeding and Varietal Assessment" and EUCARPIA "Potatoes,, 15-18.06.2025 St Andrews, UK. (plakat)
- Grupa-Urbańska A. et al. 2025 The effects of α -solanine and α -chaconine on the activity of bacterial efflux pumps and biofilm formation in pectinolytic bacteria, 14th Conference of the European Foundation for Plant Pathology (EFPP2025), 2-5 czerwca 2025, Uppsala, Szwecja (plakat)

Wykład popularno-naukowy i publikacja w czasopiśmie Warzywa

- Lebecka R. Czy zielone bulwy ziemniaka są jadalne? „Święto Ziemniaka” w Oficynie Kultury Nadarzyńskiego Ośrodka Kultury w Młochowie 21 września 2024 r.
- Grupa-Urbańska A. i Lebecka R. 2025. Czarna nóżka i mokra zgnilizna – uciążliwy duet. *Warzywa* 5: 96-98.