

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

Okres realizacji: 2021 r.

Zespół wykonawców projektu:

Lebecka R. r.lebecka@ihar.edu.pl

Sołtys-Kalina D.

Grupa-Urbańska A.

Szajko K.

Marczewski W.



Prace finansowane przez MRiRW w ramach badań podstawowych na rzecz postępu biologicznego w produkcji roślinnej w latach 2021-2027

Cel badań

Zdobycie wiedzy na temat:

- molekularnych uwarunkowań uszkodzenia bulw na skutek zranienia oraz zranienia plus zakażenia przez bakterie *D. solani*, w bulwach, we wczesnej fazie tj. 8 h po inokulacji (cel osiągnięto),
- zawartości glikoalkaloidów w ekstraktach z liści w wybranych genotypach rodzaju *Solanum* (cel osiągnięto),
- zawartości glikoalkaloidów w bulwach skrajnie podatnych i skrajnie odpornych na bakterie *D. solani* genotypów populacji mapującej DS-13 (cel osiągnięto),
- wpływu glikoalkaloidów w ekstraktach z liści roślin genotypów ziemniaka diploidalnego na wzrost bakterii *D. solani* i *P. brasiliense* sp. nov. (cel osiągnięto),
- 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 (cel osiągnięto).

Mierniki zaplanowane i wykonane

Liczba genotypów ziemniaka 10

Liczba testów bulwowych weryfikujących genotypy o skrajnej odporności 185

Liczba testów bulwowych do pobrania fragmentów do izolacji RNA 90

Liczba testowanych genów kandydujących 6

Liczba genotypów 9

Liczba analiz jakościowych 18

Liczba analiz ilościowych 54

Liczba ocenionych genotypów 10

Liczba ekstraktów badanych pod względem wpływu na wzrost bakterii dwóch gatunków na pożywce pełnej LB 9

Liczba ekstraktów badanych pod względem wpływu na wzrost bakterii dwóch gatunków na pożywce minimalnej M9 9

Liczba odmian zbieranych ręcznie testowanych makroskopowo pod względem udziału bulw uszkodzonych mechanicznie i udziału bulw porażonych 12

Liczba odmian uprawianych w systemie konwencjonalnym testowanych makroskopowo pod względem udziału bulw uszkodzonych mechanicznie i udziału bulw porażonych 5

Liczba odmian zbieranych ręcznie testowanych w hot-box 12

Liczba odmian uprawianych w systemie konwencjonalnym testowanych w hot-box 5

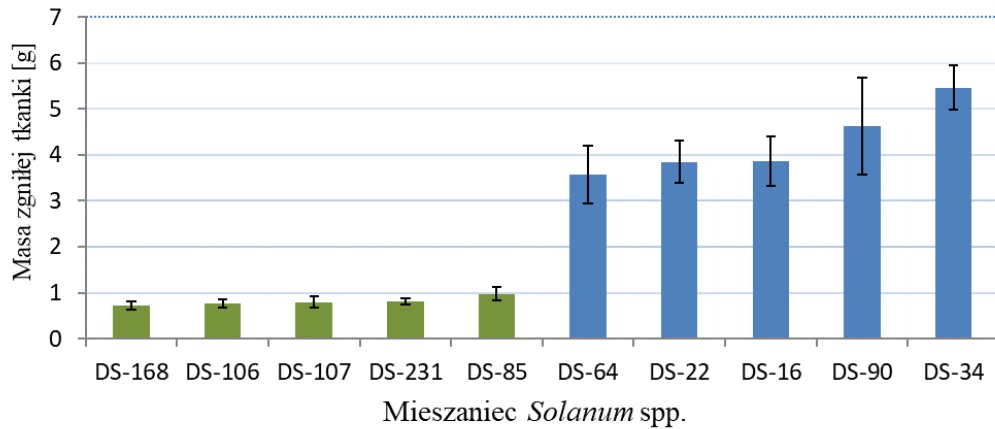
Materiały:

- Mieszkańce *Solanum* spp. (z populacji mapującej DS-13),
- dzikie gatunki *Solanum* (*S. chacoense*, *S. garsiae*, *S. maglia*),
- odmiany ziemniaka (15),
- bakterie *Dickeya solani* i *Pectobacterium brasiliense*.

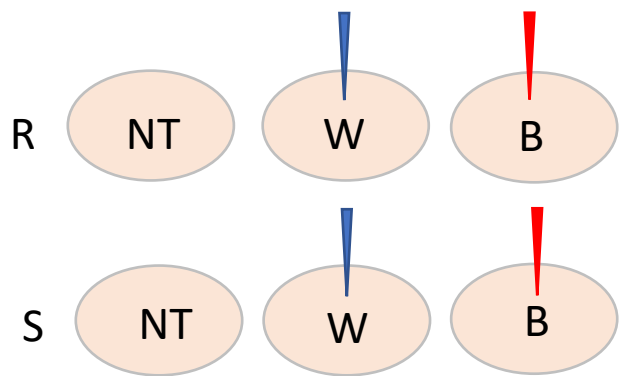
Metody:

- Test punktowej inokulacji bulw ziemniaka,
- oznaczanie ekspresji genów wobec genu referencyjnego α -tubuliny metodą real-time RT-PCR,
- izolacja glikoalkaloidów,
- metoda spektrometrii mas sprzężonej z chromatografią cieczową do oznaczania rodzaju glikoalkaloidów,
- metoda mikropłytkowa badania wzrostu bakterii na pożywkach z dodatkiem glikoalkaloidów,
- ANOVA programem Statistica, uszeregowanie średnich testem Duncana.

Temat badawczy 1. Ocena ekspresji genów kodujących białka różnicowe zidentyfikowane w bulwach form rodzicielskich populacji mapującej 8 h po inokulacji bakteriami *D. solani*. Wyniki i wnioski.



Na podstawie testu wybranych 37 genotypów z populacji mapującej otrzymanej po skrzyżowaniu formy odpornej z podatną na bakterie *D. solani*, do badań ekspresji genów wybrano po 5 genotypów wykazujących skrajne reakcje (zdjęcie obok) na zakażenie bulw bakteriami *D. solani*.



Ekspresję 6 genów oceniano 8 h po inokulacji w bulwach nietraktowanych, zranionych i traktowanych wodą (kolor niebieski) oraz zranionych i inokulowanych bakteriami *D. solani* (kolor czerwony).

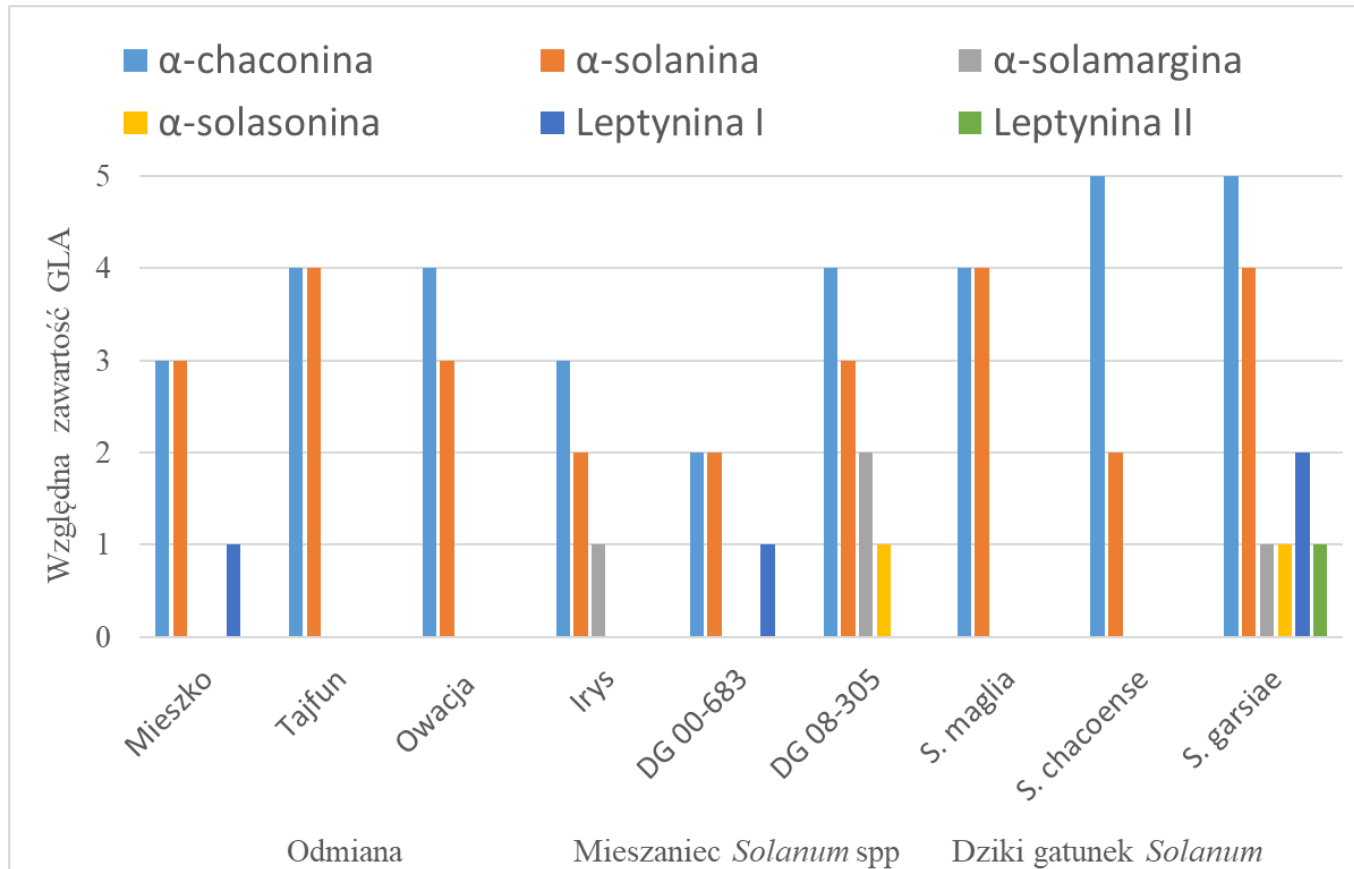
NT – bulwy kontrolne, nietraktowane; W – bulwy zranione traktowane wodą; B – bulwy zranione inokulowane *D. solani*; R – odporny; S – podatny

Istotny wzrost (zielone tło) i spadek (szare tło) względnej ekspresji genów* kodujących białka różnicowe zidentyfikowane w bulwach form rodzicielskich populacji mapującej 8 h po inokulacji bakteriami *D. solani* względem bulw kontrolnych.

Białko	Gen	Ekspresja względem bulw nietraktowanych		Genotyp	
Inhibitor proteinyazy typu 2-K	P1080	2,3	W	107 R	
Inhibitor 1 proteinyazy indukowany zranieniem	P08454	4,2	B	85 R	W – bulwy zranione traktowane wodą
Inhibitor metalokarboksypeptydazy	M0ZJ50	2,7	W	168 R	B – bulwy zranione inokulowane
	M1D4V9	2,7		16 S	
Glutaredoksyna	B3F8F4	2,4	W	16 S	R – odporny
Inhibitor proteinyazy typu 2-K	P1080	0,3	B	106 R	S – podatny
		0,2	B	90 S	
Inhibitor metalokarboksypeptydazy	M0ZJ50	0,5	W B	107 R	Względna ekspresja genów 2 ^{^-} dCt (gen referencyjny α -tubulina).
		0,3	W B	85 R	
		0,2	W B	90 S	
	M1D4V9	0,4	W B	85 R	
		0,4	W B	64 S	
		0,2	W	90 S	
Glutaredoksyna	B3F8F4	0,3	B	64 S	
Oksydaza katecholowa	M1BMR6	różnice statystycznie nieistotne			

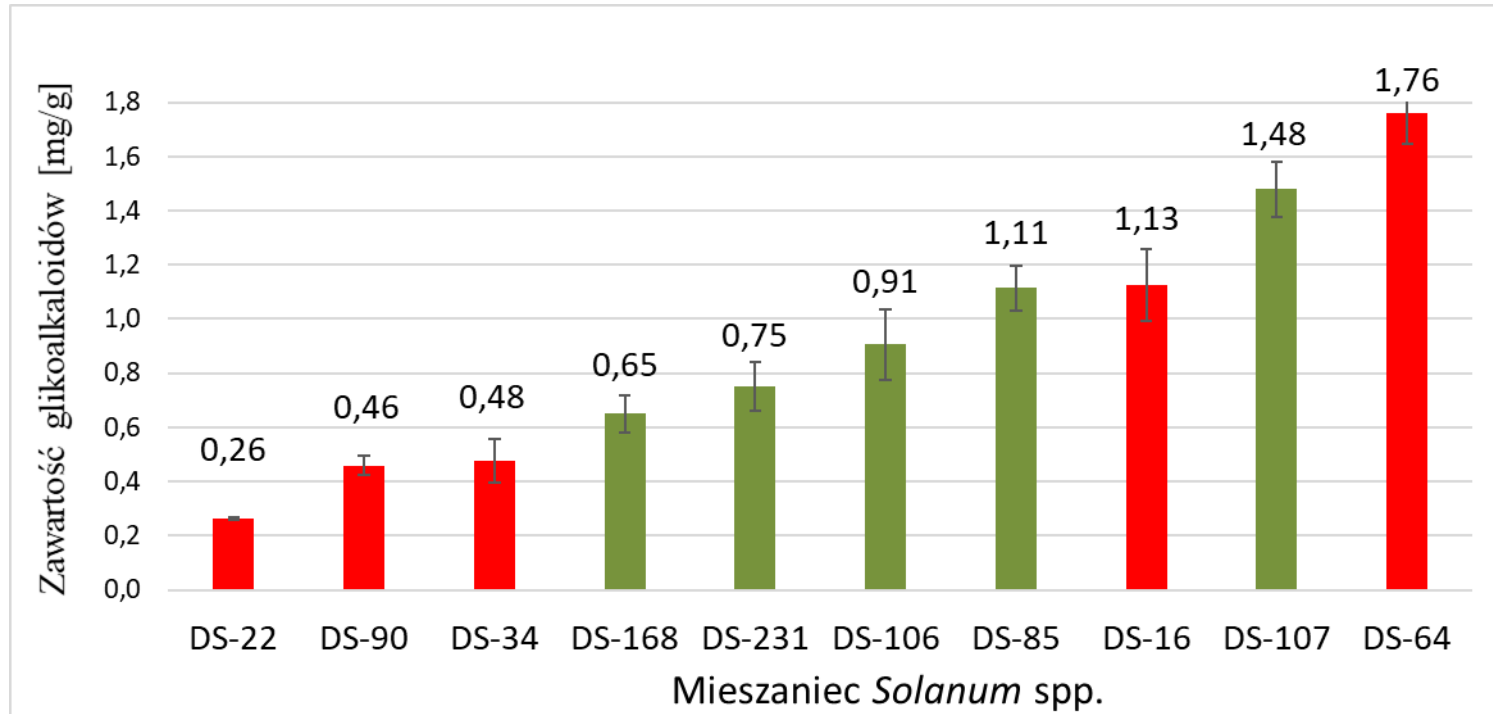
Istotnie różny poziom ekspresji genów względem nietraktowanej kontroli stwierdzono w bulwach niewielu genotypów badanych. Nie potwierdzono istotnego związku badanych genów z odpornością bulw na porażenie bakteriami *D. solani* 8 h po infekcji.

Temat badawczy 2. Analiza jakościowa i ilościowa glikoalkaloidów w ekstraktach z liści w wybranych genotypach rodzaju *Solanum*. Wyniki i wnioski.



Najwyższą zawartością GLA charakteryzują się dzikie gatunki ziemniaka. Natomiast w odmianach ziemniaka uprawnego i diploidalnych genotypach, zawartość GLA jest zależna od badanego genotypu. Wysoka zawartość GLA nie jest bezpośrednio związana ze składem rozpoznanych glikoalkaloidów (np. Tajfun). Dzikie gatunki *S. garsiae* posiadał wszystkie z sześciu zidentyfikowanych GLA. Stwierdzono, że α-solanina razem z α-chaconiną stanowią od 64% (*S. garsiae*) do 100% (Tajfun, Owacja, *S. maglia*) wszystkich rozpoznanych glikoalkaloidów.

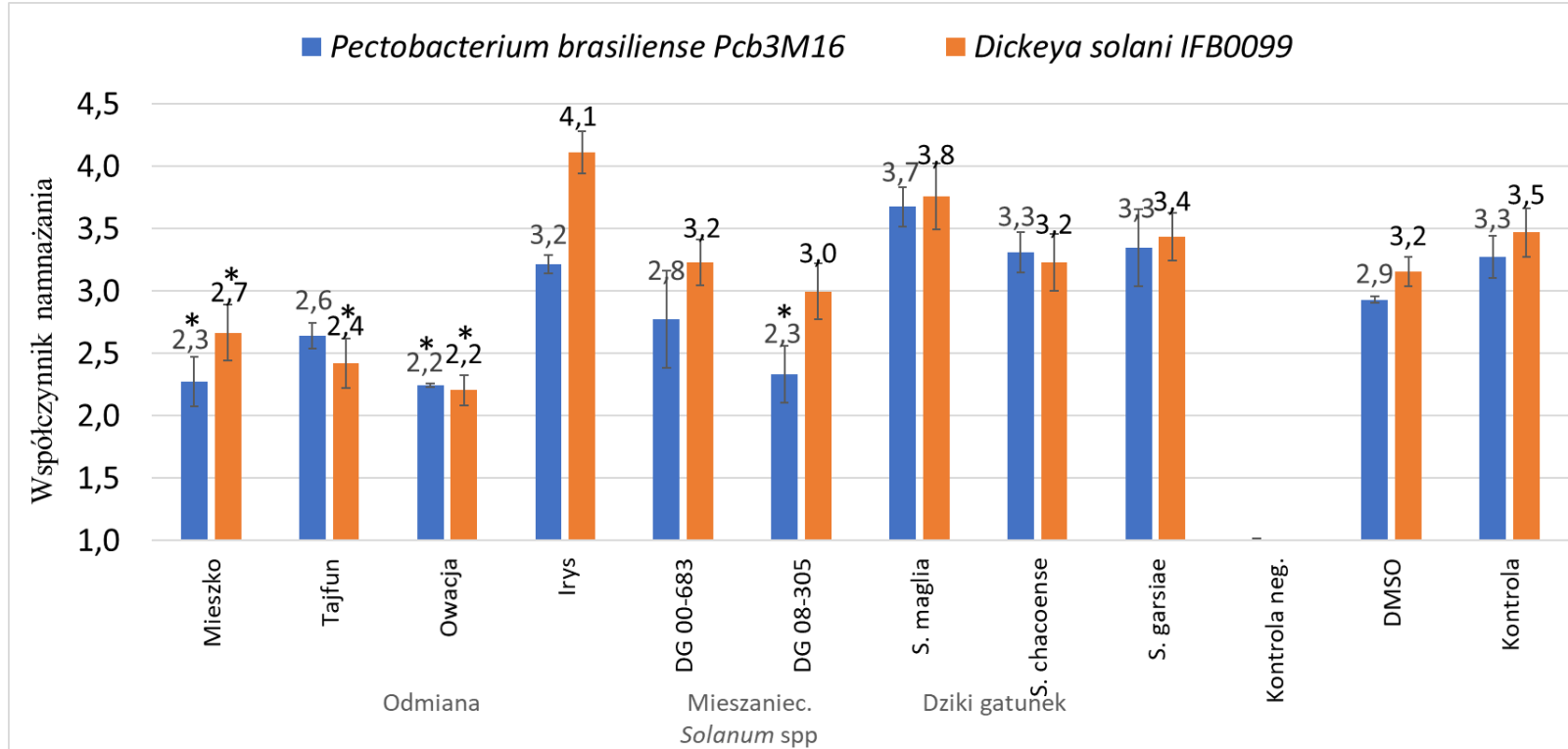
Temat badawczy 3. Analiza ilościowa glikoalkaloidów w bulwach genotypów populacji mapującej DS-13, skrajnie podatnych i skrajnie odpornych na bakterie *D. solani*. Wyniki i wnioski.



Średnia całkowitej zawartości glikoalkaloidów w bulwach mieszańców *Solanum* spp. Kolorem czerwonym zaznaczono genotypy podatne na infekcję *D. solani*, zielonym odporne. Wąsami oznaczono błąd standardowy średnich z trzech powtórzeń biologicznych, każde powtórzenie biologiczne to średnia z dwóch powtórzeń technicznych.

Wyniki nie wskazują jednoznacznie na istotne powiązanie zawartości GLA w bulwach z odpornością na *D. solani*. W celu weryfikacji tej hipotezy konieczna byłaby analiza zawartości GLA w bulwach wszystkich pojedynków populacji DS-13 i ich korelacja z odpornością.

Temat badawczy 4. Ocena wpływu glikoalkaloidów w ekstraktach z liści roślin genotypów ziemniaka diploidalnego na wzrost bakterii *D. solani* i *P. brasiliense* sp. nov. Wyniki i wnioski.



Wzrost bakterii pektynolitycznych w pożywce pełnej LB z dodatkiem glikoalkaloidów po 8h inkubacji w temp. 25 °C. Błąd standardowy średnich z trzech powtórzeń biologicznych, każde powtórzenie biologiczne to średnia z trzech powtórzeń technicznych. *średnie różnią się istotnie od kontroli DMSO.

Istotnie mniejsze namnażanie bakterii stwierdzono dla obu bakterii, z dodatkiem glikoalkaloidów pochodzących z odmian Owacja (Pcb – 76% kontroli, Ds – 68% kontroli) i Mieszko (Pcb – 79% kontroli, Ds – 84 % kontroli). Glikoalkaloidy z diploidalnego mieszańca *Solanum* DG 08-305 hamowały istotnie namnażanie bakterii Pcb (Pcb – 79% kontroli), a glikoalkaloidy z odmiany Tajfun – bakterie Ds (75% kontroli).

W pożywce minimalnej M9 stwierdzono istotnie mniejsze namnażanie bakterii dla obu gatunków, z dodatkiem glikoalkaloidów pochodzących z odmiany Tajfun (Pcb – 64% kontroli, Ds – 67% kontroli). Glikoalkaloidy z diploidalnego mieszańca *Solanum* DG 08-305 hamowały istotnie namnażanie bakterii Ds (Ds – 67% kontroli).

Wpływ glikoalkaloidów na wzrost bakterii zależy od genotypu i zastosowanej pożywki oraz jest wielokierunkowy. Obserwuje się zarówno jego zahamowanie (np. Tajfun, DG 00-683) jak i stymulację (np. Irys).

Zaobserwowaliśmy, że rodzaj pożywki istotnie zmieniał dynamikę wzrostu bakterii. Tylko w przypadku odmiany Tajfun, tendencja hamująca namnażanie bakterii *D. solani* utrzymała się w przypadku obu pożywek. Odmiana ta posiada w tkankach jedynie α -solaninę i α -chaconinę. Jak wskazują dane literaturowe, na aktywność biologiczną ekstraktów roślinnych bogatych w GLA wpływa ich skład (rodzaj GLA), gdyż działania pojedynczych GLA mogą mieć efekt wzajemnie znoszący, addytywny, lub działać synergistycznie. Stwierdzono również, że nie tylko skład ma wpływ na końcowy efekt biologiczny wywołany obecnością GLA, ale i wzajemne proporcje.

Temat badawczy 5. Analiza zdolności przechowalniczej bulw ziemniaka i porażenia przez patogeny ziemniaka powodujące choroby przechowalnicze. I rok badań. Wyniki i wnioski.

Ziemniaki uprawiano systemem konwencjonalnym, na jednym polu uprawiano 12 odmian, które zbierano ręcznie, na drugim – 5 odmian (wybranych z 12), które zbierano kombajnem.

Obserwowano dużą zmienność objawów chorobowych pomiędzy odmianami i pomiędzy miejscem uprawy. W warunkach ciepłego i suchego lata obserwowano silne porażenie odmian ziemniaka parchem zwykłym i ospowatością bulw. Sporadycznie obserwowano porażenie bakteriami pektynolitycznymi wywołującymi mokrą zgniliznę i porażenie zarazą ziemniaka. Obserwowano różnice występowania chorób w zależności od miejsca uprawy i odmiany ziemniaka.

Pobrane losowo 100 bulw każdej odmiany przechowywano przez cztery dni w warunkach hot-box'u (T ok. 22 °C i wilg. wzgl. ok. 80%). Po okresie inkubacji obserwowano występowanie suchej zgnilizny i sporadycznie objawów mokrej zgnilizny. W bulwach zbieranych kombajnem przechowywanych w hotbox'ie stwierdzono znacznie większy udział obitych bulw niż w bulwach zbieranych ręcznie. Bulwy testowanych odmian zostaną ocenione wizualnie po okresie przechowywania, gdyż celem zadania jest sprawdzenie przydatności hot-box'a do przewidywania zdolności przechowalniczej odmian ziemniaka. Bulwy z doświadczenia są obecnie przechowywane.



Zdjęcia:

1. Trzy odmiany w hot-box'ie (po 50 bulw na półce)
2. Zdrowe bulwy odmiany Ismena (po inkubacji)



3. Sucha zgnilizna w odmianie Michalina (po inkubacji)
4. Rizoktonioza w odmianie Irmina (przed inkubacją)

Badania będą kontynuowane, wyniki uzyskane w tym roku badań będą analizowane razem z wynikami uzyskanymi po okresie przechowywania.