

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

Okres realizacji 2024 r.

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

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

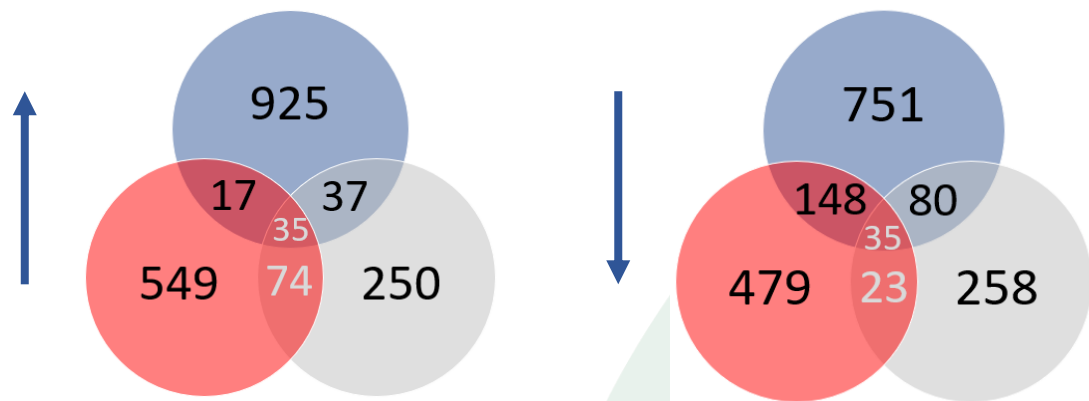


Osiągnięte cele tematów badawczych realizowanych w 2024 r.:

- ❖ zdobycie wiedzy na temat molekularnych uwarunkowań odpowiedzi ziemniaka na uszkodzenie bulw na skutek zranienia oraz jednoczesnego zranienia i zakażenia przez bakterie *D. solani*, w średniej i późnej fazie infekcji t.j. 24 i 48 h po inokulacji;
- ❖ (i) poznanie wpływu glikoalkaloidów wyizolowanych z liści wybranych genotypów *Solanum* na geny *ohrR* i *fis*, które mają istotne znaczenie w regulacji cech związanych z wirulencją tych bakterii;
(ii) sprawdzenie, czy wyższy poziom glikoalkaloidów w bulwach ziemniaka poddanych zielenieniu w warunkach sztucznego oświetlenia obniży wielkość gnicia i porażenie roślin czarną nóżką w testach laboratoryjnych;
- ❖ ocena zdolności przechowalniczej oraz odporności odmian ziemniaka na bakterie *D. solani* i *P. brasiliense*, powodujące mokrą zgniliznę bulw ziemniaka.

Temat	Materiały	Metody
1.	<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), ➤ 14 genów kandydujących. 	<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, ➤ qPCR, RT-PCR.
2.	<ul style="list-style-type: none"> ➤ Trzy genotypy <i>Solanum</i>: dziki gatunek ziemniaka (<i>S. chacoense</i>), mieszańiec międzygatunkowy <i>Solanum</i> (DG 00-683), odmiana ziemniaka uprawnego <i>S. tuberosum</i> (Tajfun), ➤ Dwa izolaty bakterii: <i>D. solani</i> i <i>P. brasiliense</i>, ➤ Dwa geny bakterii (<i>ohR</i> i <i>fis</i>). 	<ul style="list-style-type: none"> ➤ Ekstrakcja glikoalkaloidów (GA) z liści roślin i bulw <i>Solanum</i>, ➤ Ocena wpływu GA na: ekspresję genów bakterii (qPCR), ➤ Ocena wielkości porażenia „zielenionych” w świetle sztucznym bulw ziemniaka w teście punktowej inokulacji bulw, ➤ Ocena porażenia roślin ziemniaka wyrosłych z „zielenionych” w świetle sztucznym bulw porażonych bakteriami przez zanurzenie bulw w zawieszynie bakterii w podciśnieniu.
3.	<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"> ➤ Ocena odporności bulw ziemniaka na bakterie <i>D. solani</i> w teście punktowej inokulacji.

T 1: Analiza transkryptomyczna w bulwach w późnej fazie rozwoju infekcji, tj. 48 h po zakażeniu przez *D. solani*. Badania ekspresji wybranych genów kandydujących średniej fazy rozwoju infekcji tj. 24 h po zakażeniu przez bakterie.



Liczba genów o istotnie różnej ekspresji w porównywanych transkryptomach:

(**BS vs BR**) vs (**WS vs WR**) vs (NTS vs NTR)

Oznaczenia:

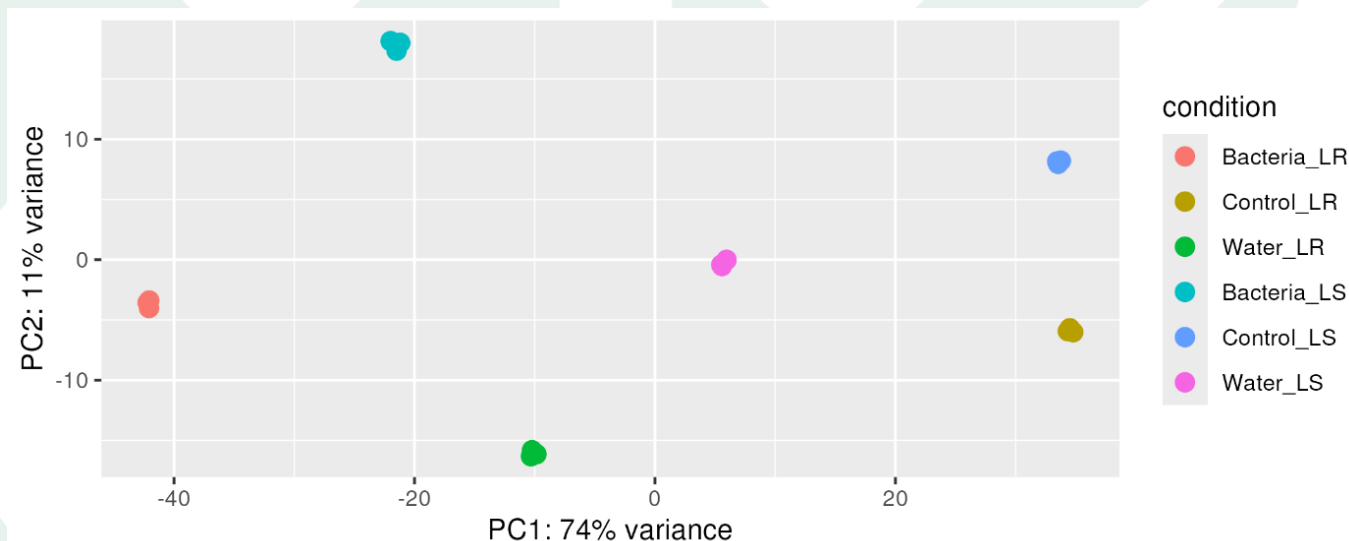
B – bulwy ranione, inokulowane zawiesiną bakterii,

W – bulwy ranione, traktowane wodą,

NT – bulwy nietraktowane,

R – genotypy odporne, **S** – genotypy podatne.

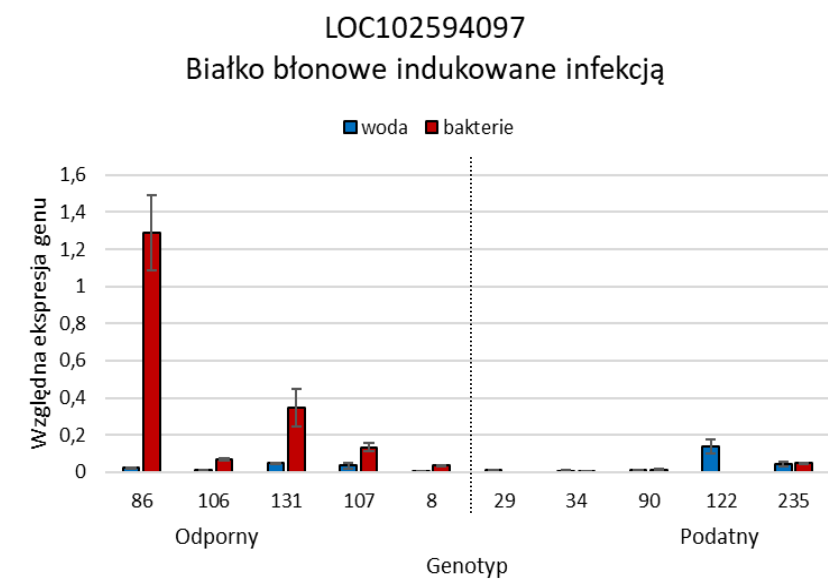
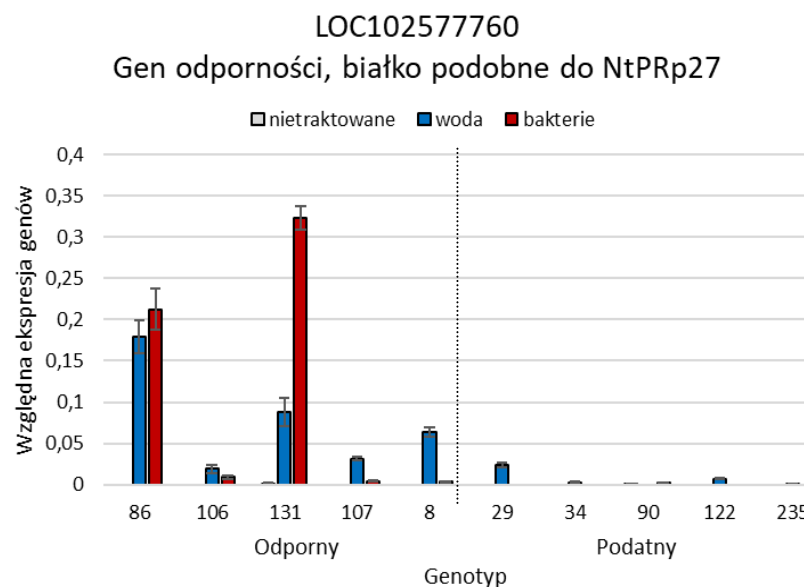
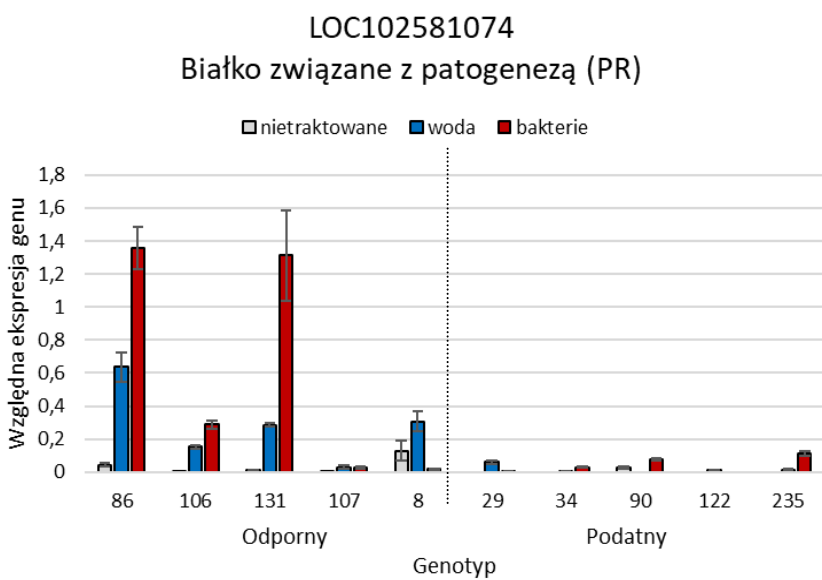
Analiza głównych składowych (PCA) na danych DESeq2 dla wszystkich prób z doświadczenia (54 prób). Największe różnice w profilu ekspresji genów obserwowano pomiędzy bulwami nietraktowanymi (podatnymi i odpornymi) a bulwami inokulowanymi w zranienie. W oparciu o drugą składową, wyjaśniającą 11 % wariacji, możliwe jest oddzielenie genotypów odpornych od podatnych.



Geny różnicowe średniej fazy rozwoju infekcji tj. 24 h po zakażeniu przez bakterie, do weryfikacji ekspresji w pojedynczych genotypach.

L.P.	Nazwa genu	Krotność zmiany BS vs BR (log2 >2) po inkubacji:		Funkcja
		24 h	48 h	
1	LOC102594097	4,22	5,04	Gen białka podobnego do CASP PIMP1, odporność na bakterie, białko błonowe indukowane infekcją patogena (Hong et al. 2008; Vining i Pandelova 2022)
2	LOC102601676	4,32	4,24	Gen białka podobnego do CASP 1E2, odporność na bakterie, białko błonowe indukowane infekcją patogena
3	LOC102581074	3,07	5,04	Białko związane z patogenezą (PR, ang. pathogen related) podobne do P2
4	POPA	3,99	5,35	Peroksydaza anionowa związana z suberynizacją
5	LOC102585228	6,31	4,61	Gen białka podobnego do acetylotransferazy 3 acylowanego cukru
6	LOC102599527	8,70	2,99	Prawdopodobnie białko 23 endotransglukozylaza/hydrolaza ksyloglukanu
7	LOC102598565	6,25	2,53	Przeciwmikrobowy peptyd 2-3 podobny do wiciliny
8	LOC102582593	4,86	-	Gen nieaktywnego białka podobnego do RESTRICTED TEV MOVEMENT 1 (blokującego transport wirusa TEV)
9	LOC102590684	4,67	-	Czynnik transkrypcyjny podobny do 1B wrażliwy na etylen
10	LOC102587891	3,88	-	Gen białka G1 podobnego do syntazy celulozy
11	LOC102584775	4,12	-	Gen białka podobnego do syntazy koenzymu A hydroksymetylglutarylu
12	LOC102605428	3,96	5,73	Gen podobny do kwasowej izoformy PR-Q' endo-1,3-beta-glukozydazy glukanu
13	LOC102605226	3,87	2,48	Gen podobny do zasadowej izoforma 1 endo-1,3-beta-glukozydazy glukanu
14	LOC102577760	7,36	3,05	Białko podobne do NtPRp27; gen odporności
	Gen R	Gen odporności z rodziny NBS-LRR zmapowany na 11 chromosomie o nr PGSC0003DMT400002320		

Względna ekspresja genów kandydujących 8 i 24 h po inokulacji w 5 odpornych i 5 podatnych genotypach na bakterie *D. solani*

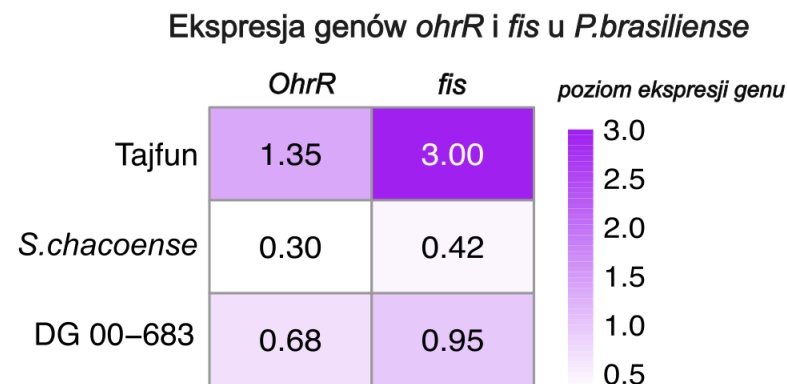
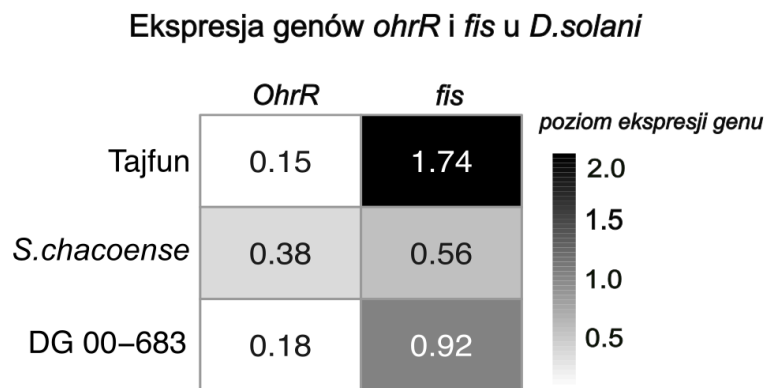


- ❖ Zweryfikowano ekspresję genów w pojedynczych genotypach odpornych i podatnych, wybranych na podstawie ich wyższej ekspresji w próbach zbiorczych (odpornej i podatnej) 24 h po inokulacji.
- ❖ Wyróżniono geny o wyższej ekspresji w próbie zbiorczej genotypów odpornych na bakterie pektynolityczne w porównaniu do ekspresji w próbie zbiorczej genotypów podatnych, 48 h po inokulacji.

T2. (i) Ocena wpływu glikoalkaloidów z liści roślin wyselekcjonowanych spośród genotypów *Solanum* na geny związane z czynnikami wirulencji bakterii *D. solani* i *P. brasiliense*

Gen **ohrR** (ang. organic hydroperoxide reductase regulator) jest kluczowym regulatorem odpowiedzi bakterii na stres oksydacyjny, który aktywuje mechanizmy obrony przed reaktywnymi formami tlenu (ang. reactive oxygen species - ROS) oraz wpływa na produkcję różnych czynników wirulencji, takich jak enzymy zewnątrzkomórkowe i biofilm.

Gen **fis** (factor for inversion stimulation) pełni rolę globalnego regulatora transkrypcji, który wpływa na produkcję fitotoksyny (zeaminy), egzopolisacharydów (extracellular polymeric substances - EPS), zdolność poruszania się bakterii oraz tworzenie biofilmu.

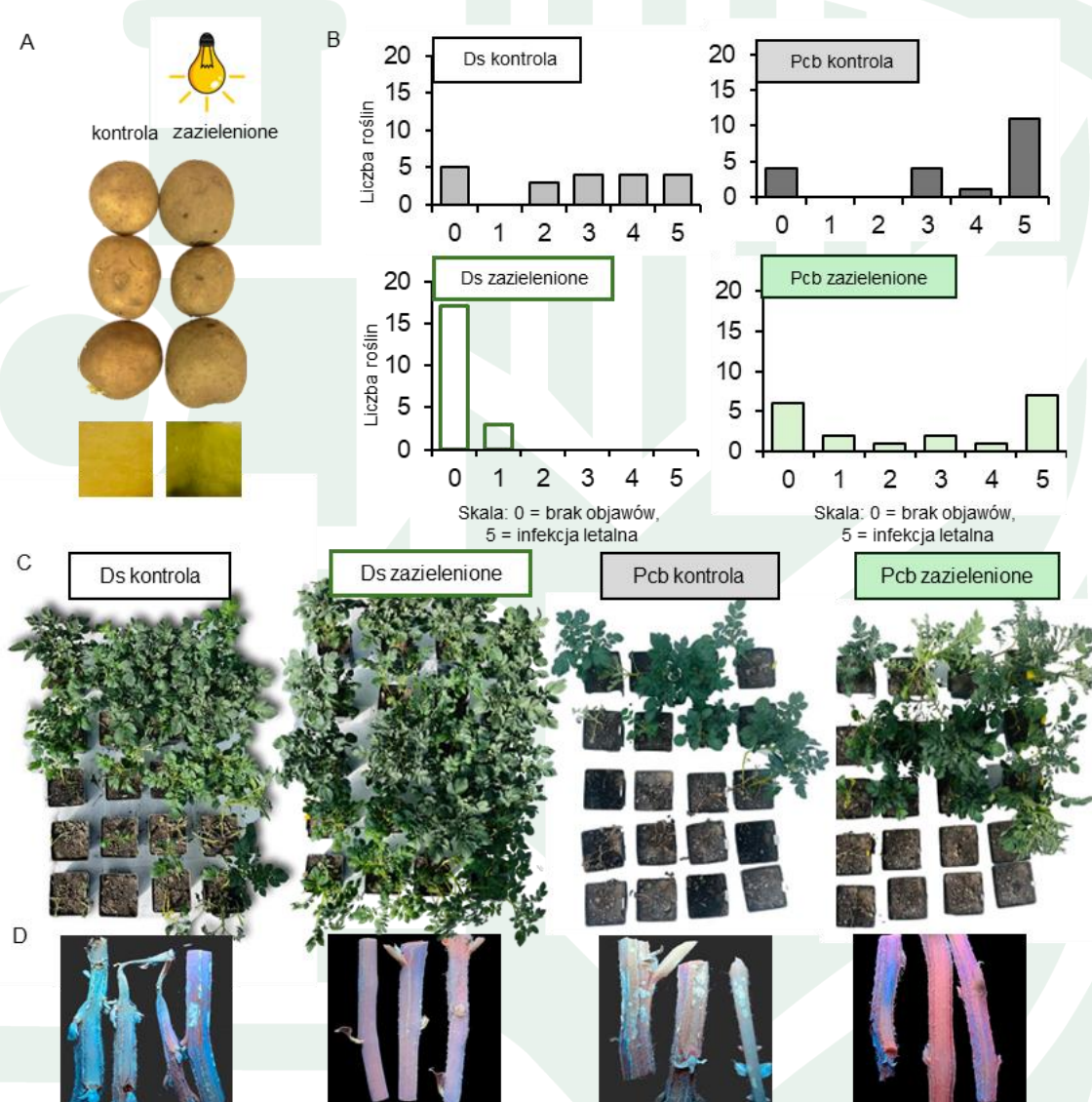


- ❖ Wykazano zróżnicowane działanie GA pochodzących z liści różnych form *Solanum* na stres oksydacyjny u badanych bakterii. Najwyższą ekspresję tego genu zaobserwowano u *P. brasiliense* po inkubacji z GA z odmiany Tajfun.
- ❖ GA z dzikiego gatunku *S. chacoense* oraz z DG 00-683 wywoływały obniżenie ekspresji genu *fis* bakterii, co może sugerować, że działają hamująco na wirulencję bakterii, ograniczając ich zdolność do wywoływania infekcji.

T2. (ii) Ocena wpływu glikoalkaloidów w bulwach ziemniaka po procesie zazielenienia na rozwój czarnej nóżki ziemniaka po zakażeniu przez bakterie *D. solani* i *P. brasiliense* w warunkach laboratoryjnych.

Objawy czarnej nóżki w 3-tygodniowych roślinach ziemniaka odmiany Tajfun, otrzymanych z i niezazielenionych bulw inokulowanych w podciśnieniu bakteriami *D. solani* (Ds) i *P. brasiliense* (Pcb). A) Wygląd bulw kontrolnych i zazielenionych B) Histogramy częstości rozkładu roślin z według nasilenia objawów czarnej nóżki w skali od 0 do 5, gdzie 0 znaczy brak objawów porażenia a 5 letalną infekcją. C) Wygląd roślin w testowanych grupach: Ds kontrola, Ds zazielenione, Pcb kontrola i Pcb zielone. D) Objawy porażenia łodyg obserwowane w świetle UV, wskazujące na silniejsze objawy porażenia w roślinach kontrolnych w porównaniu z roślinami otrzymanymi z bulw zazielenionych.

- ❖ Wykazano potencjał zazieleniania bulw jako element naturalnej metody ochrony ziemniaka przed czarną nóżką ziemniaka. Znaczące ograniczenie porażenia *D. solani* w roślinach uzyskanych z zazielenionych bulw przemawia za zastosowaniem tej metody jako element integrowanej, niechemicznej strategii zwalczania. Zmienna reakcja na *P. brasiliense*, bardziej agresywny szczep, sugeruje, że potrzebne są dodatkowe środki kontroli.

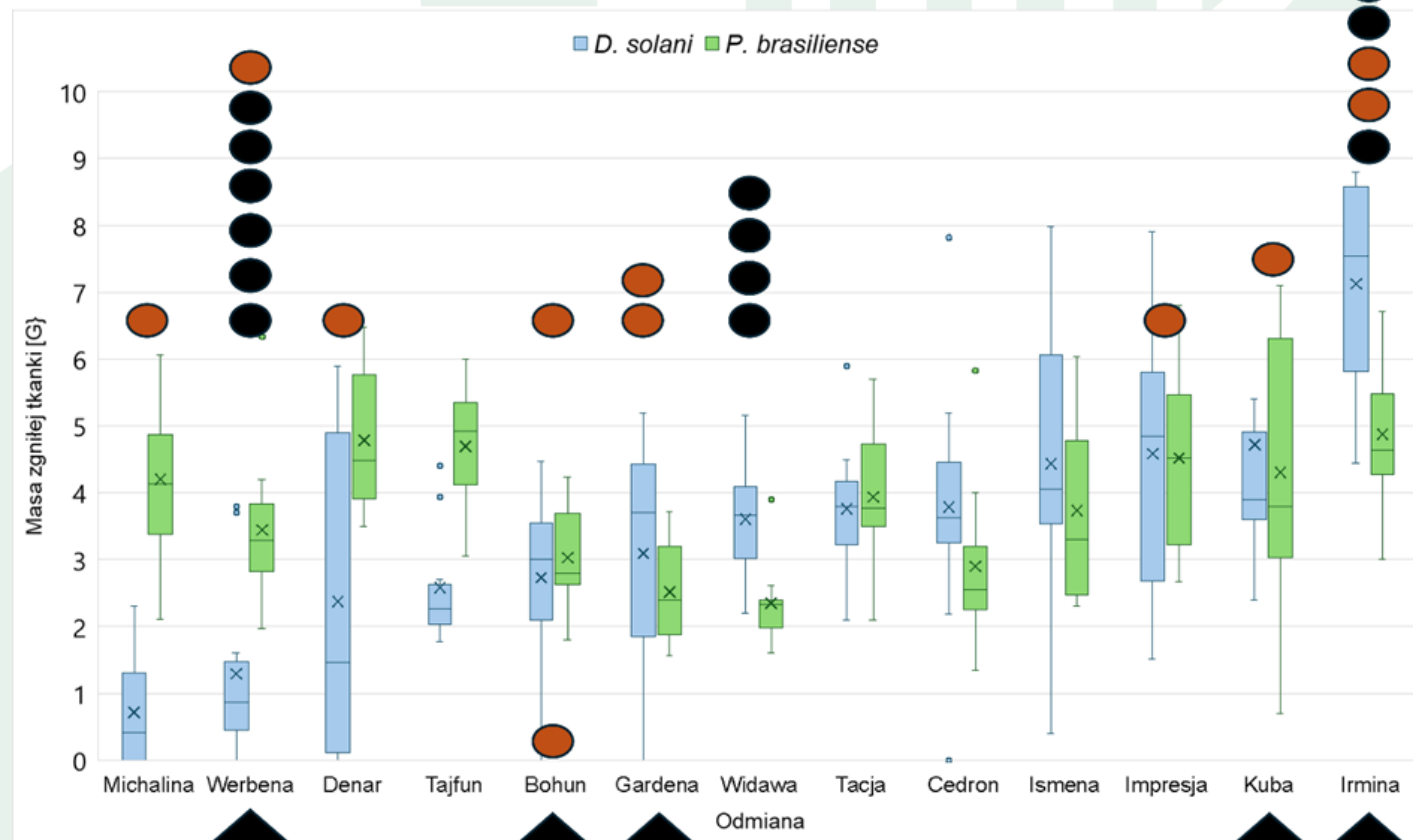


T3. Analiza zdolności przechowalniczej bulw ziemniaka i porażenia przez patogeny ziemniaka powodujące choroby przechowalnicze.

Liczba bulw z objawami gnicia spowodowanymi przez bakterie pektynolityczne, na dole – 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.

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



Publikacje

- ❖ Grupa-Urbańska A., R. Lebecka, D. Sołtys-Kalina. 2024. Effect of potato tuber greening on blacklign development by *Dickeya solani* and *Pectobacterium brasiliense*. Journal of Plant Protection Research. Accepted 22.10.2024. (JPPR-02226-2024-02) **IF = 0,7; Punkty MNiSW 100**

Złożona do Plant Pathology 4 września 2024 r. (PP-24-438)

- ❖ Grupa-Urbańska A., R. Lebecka, D. Sołtys-Kalina. Antimicrobial activity of glycoalkaloids from *Solanum* spp. and their potential for control of *Dickeya solani* and *Pectobacterium brasiliense* sp.

Doniesienia konferencyjne

- ❖ R. Lebecka i in. 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
- ❖ A. Grupa-Urbańska i in. „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 popularno-naukowy

- ❖ R. Lebecka. Czy zielone bulwy ziemniaka są jadalne? „Święto Ziemniaka” w Oficynie Kultury Nadarzyńskiego Ośrodka Kultury w Młochowie 21 września 2024 r.