

RENATA LEBECKA¹
ZOFIA MURAWSKA¹
KATARZYNA SZAJKO¹
JANUSZ DĘBSKI²
MICHAŁ KISTOWSKI²
WALDEMAR MARCZEWSKI¹
EWA ZIMNOCH-GUZOWSKA¹

¹ Instytut Hodowli i Aklimatyzacji Roślin — Państwowy Instytut Badawczy, Radzików, Oddział w Młochowie

² Instytut Biochemii i Biofizyki Polskiej Akademii Nauk, Warszawa

Kierownik Tematu: dr hab. Renata Lebecka prof. Instytut Hodowli i Aklimatyzacji Roślin — Państwowy Instytut Badawczy, Radzików, Oddział w Młochowie, ul. Platanowa 19, 05-831 Młochów, tel. (22) 7299248 w. 207, e-mail: r.lebecka@ihar.edu.pl

Prace zostały wykonane w ramach badań podstawowych na rzecz postępu biologicznego w produkcji roślinnej na podstawie decyzji Ministra Rolnictwa i Rozwoju Wsi nr HOR.hn.802.19.2018, Zadanie 56.

Badania ekspresji i genetyczna charakterystyka odporności na bakterie *Dickeya solani* w wyróżnionych źródłach odporności w ziemniaku na poziomie diploidalnym

**Research on the expression and genetic characterization of the resistance to bacteria
Dickeya solani in selected for resistance diploid potato**

Słowa kluczowe: białka ziemniaka, *Dickeya solani*, loci cech ilościowych, mokra zgnilizna bulw ziemniaka, odporność

CEL PODJĘTEGO TEMATU I PROWADZONYCH BADAŃ

Mokra zgnilizna bulw ziemniaka to choroba powodowana przez kilka gatunków bakterii pektynolitycznych należących do dwóch rodzajów: *Pectobacterium* i *Dickeya*. Bakterie *Dickeya* spp. są bardziej agresywne od innych bakterii pektynolitycznych (Czajkowski i in., 2013). Straty ekonomiczne powodowane przez bakterie pektynolityczne to: obniżenie wielkości plonu bulw, utrata części plonu w czasie przechowywania, wystąpienie czarnej nóżki w czasie sezonu wegetacyjnego, koszty związane z degradacją plantacji nasiennych. Nie stosuje się ochrony chemicznej

do zwalczania bakterii wywołujących choroby ziemniaka. Odporność bulw ziemniaka na bakterie pektynolityczne jest cechą poligeniczną (Zimnoch-Guzowska i in., 2000).

Celem tematu jest:

- (1) zmapowanie odporności na bakterie *D. solani* w diploidalnej nieselekcjonowanej populacji ziemniaka, otrzymanej po skrzyżowaniu formy wysoko odpornej z formą o niskiej odporności na te bakterie oraz
- (2) znalezienie różnic w profilach białkowych odmian ziemniaka, różniących się między sobą poziomem odporności bulw na zakażenie bakteriami *D. solani*, 8 lub 48 godzin po inokulacji.

CEL (1). OPIS WYNIKÓW

Przeprowadzono analizę markerów DArTseq 186 osobników potomnych i ich form rodzicielskich, wykonano ocenę fenotypową odporności bulw na bakterie *D. solani* (Lebecka, 2017) oraz oceniono zawartość skrobi w bulwach ziemniaka w populacji mapującej (Zgórska, 2001). Testowana cecha przyjmowała rozkład normalny. Średnia masa zgniłej tkanki genotypów potomstwa populacji mapującej wynosiła 2,3 g, zakres cechy od 0,0 do 7,6 g, u odpornej formy rodzicielskiej DG 00-270 wynosiła 0,8 g, a u podatnej formy, DG 08-305 — 5,9 g. Zawartość skrobi w formach rodzicielskich populacji mapującej wynosiła 20,5% w DG 00-270 i 17,3% w DG 08-305. Zakres badanej cechy w potomstwie wynosił od 11,4% do 23,9%, ze średnią populacji 17,7%.

CEL (1). WNIOSKI Z PROWADZONYCH BADAŃ

Testowanie porażenia bulw w teście sztucznej inokulacji będzie powtórzone w trzecim (ostatnim) roku badań. Dane będą wykorzystane do mapowania *loci* cech ilościowych (QTLs) odporności bulw na bakterie *D. solani*. Ocena zawartości skrobi w kolejnym roku badań umożliwi zbadanie związku zawartości skrobi z odpornością bulw na mokrą zgniliznę. Badania będą kontynuowane.

CEL (2). OPIS WYNIKÓW

Na podstawie trzyletniej oceny porażenia bulw w testach laboratoryjnych przeprowadzonych w poprzednich latach tego projektu (Lebecka, 2017) do badań proteomicznych wybrano dwie odmiany o wysokiej odporności (Bea i Humalda) i trzy odmiany o niższej odporności (Katahdin, Ulster Supreme i Irys). Próbkę z pięciu odmian ziemniaka pobierano z bulw zranionych inokulowanych bakteriami *D. solani*, z bulw zranionych traktowanych wodą (8 i 48 h po inokulacji) oraz z bulw nieranionych (8 h po inokulacji). Doświadczenia prowadzono w dwóch terminach. Pobierano od dwóch do czterech fragmentów z każdej kombinacji doświadczenia. Białka izolowano według protokołu opracowanego w poprzednich latach tego projektu (Murawska i in., 2017). Analizę próbek wykonano metodą wysokosprawnej chromatografii cieczowej sprzężonej z tandemowym spektrometrem mas (LC-MS/MS). Programem Diffprot (Malinowska i in., 2012) porównano listy peptydów danych grup eksperymentalnych pomiędzy sobą,

obliczając zależności statystyczne i typując białka, których poziom ekspresji pomiędzy badanymi grupami różnił się w sposób istotny ($P \leq 0,1$), co najmniej 1,5 razy. (1) Porównano białka z bulw inokulowanych bakteriami *D. solani* z białkami bulw zranionych i traktowanych wodą. Przeprowadzono cztery porównania, dla grupy odmian odpornych i podatnych, po 8 i 48 h po inokulacji. Wyróżniono wyłącznie jedno białko różnicowe, peroksydazę, w grupie odmian odpornych, 48 godzin po inokulacji. (2) Porównano białka z bulw odmian odpornych z podatnymi. We wczesnej fazie infekcji, 8 godzin po inokulacji, wyróżniono 4 białka (patatyny, inhibitory proteinaz w tym inhibitor chymotrypsyny), których ekspresja była istotnie wyższa w odmianach odpornych, w próbkach pobranych zarówno z bulw inokulowanych bakterią jak i traktowanych wodą, natomiast w bulwach nieranionych istotnie większą ekspresję stwierdzono dla białka patatyny. Wyższą ekspresją w odmianach odpornych, tylko po inokulacji, charakteryzowały się dwa białka, inhibitor proteinazy PTI i syntetaza tiaminotiazolowa. W późniejszej fazie infekcji w odmianach odpornych w obu rodzajach bulw, inokulowanych i traktowanych wodą, było istotnie więcej inhibitorów proteinaz, patatyny (tak samo jak po 8 h) i inhibitorów proteazy serynowej. Wyróżniono białka o wyższej ekspresji w odmianach odpornych wyłącznie po inokulacji bakteriami, inhibitory proteazy aspartylowej, oksydazy polifenolowe i endoplazminy.

Wykonano dwie analizy głównych składowych dla wszystkich prób z doświadczenia (1) po 8 h oraz (2) po 8 i 48 h. Analiza próbek z doświadczenia po 8 h wyjaśnia 19% zmienności a analiza po 48 h — 26% zmienności, mimo to analiza po 8 h pozwala na oddzielenie odmian odpornych od podatnych na podstawie drugiej składowej (PC2). Po 48 h różnice pomiędzy jedną z odpornych odmian, a pozostałymi odmianami podatnymi zaczynają się zacierać.

CEL (2). WNIOSKI Z PROWADZONYCH BADAŃ

Wykazano różnice w białkach pomiędzy odpornymi i podatnymi odmianami na moką zgniliznę bulw, w początkowej i późniejszej fazie infekcji. Większość białek różnicowych występuje w bulwach inokulowanych bakteriami w zranienia i w bulwach zranionych traktowanych wodą. W bulwach nieranionych 8 h po inokulacji, spośród białek różnicowych wykrytych w początkowej i późniejszej fazie infekcji, tylko patatyny występowały w większej ilości w odmianach odpornych w porównaniu z podatnymi. Na podstawie analizy głównych składowych 8 h oraz 8 i 48 h po inokulacji zakładamy, że różnice obserwowane w czasie wczesnej fazy infekcji, 8 h po inokulacji, mogą odgrywać większą rolę w hamowaniu rozwoju objawów choroby.

LITERATURA

- Czajkowski R., De Boer W. J., Van der Zouwen P.S., Kastelein P., Jafra S., de Haan E.G., Van den Bovenkamp G. W., Van der Wolf J. M. 2013. Virulence of '*Dickeya solani*' and *Dickeya dianthicola* biovar-1 and -7 strains on potato (*Solanum tuberosum*). Plant Pathol. 62: 597 — 610.
- Lebecka R. 2017. Screening for potato resistance to blackleg and soft rot. Plant Breed Seed Sci 75: 97 — 104 DOI:10.1515/plass-2017-00013.

- Malinowska A., Kistowski M., Bakun M., Rubel T., Tkaczyk M., Mierzejewska J., Dadlez M. 2012. Diffprot — software for non-parametric statistical analysis of differential proteomics data. *J. Proteomics* 75 (13): 4062 — 4073.
- Murawska Z., Dębski J., Szajko K., Lebecka R. 2017. Isolation of proteins from potato tubers. *Plant Breed Seed Sci* 75: 23 — 27 DOI: 10.1515/plass-2017-0005.
- Zgórska K. 2001. Oznaczanie zawartości skrobi w bulwach ziemniaka. W: *Monografie i Rozprawy Naukowe IHAR Radzików*, 10a: 113 — 116.
- Zimnoch-Guzowska E., Marczewski W., Lebecka R., Flis B., Schäfer-Pregl R., Salamini F., Gebhardt C. 2000. QTL analysis of new sources of resistance to *Erwinia carotovora* ssp. *atroseptica* in potato done by AFLP, RLFP, and resistance-gene-like markers. *Crop Sci.* 40: 1156 — 1167.