



SusCrop – ERA-NET
Cofund on Sustainable Crop Production
FACCEIPI



Narodowe Centrum
Badań i Rozwoju

MIĘDZYNARODOWY PROJEKT POTATOMETABIOME – OPIS WYKONYWANYCH PRAC

INTERNATIONAL PROJECT POTATOMETABIOME – DESCRIPTION OF THE WORK PERFORMED

dr hab. Krzysztof Treder¹, mgr inż. Dorota Michałowska¹,
mgr inż. Anna Pawłowska¹, dr Janusz Urbanowicz¹, dr Jacek Panek²,
prof. dr hab. Magdalena Frąc², prof. Joana Falcao Salles³

¹IHAR-PIB, Oddział w Boninie

²Instytut Agrofizyki im. Bohdana Dobrzańskiego PAN, ul. Doświadczalna 4,
20-290 Lublin

³Department of Microbial Ecology, Center for Evolutionary and Ecological Studies,
University of Groningen, 9700 CC, Groningen, The Netherlands

Autor korespondencyjny: k.treder@ihar.edu.pl

Streszczenie

Publikacja przedstawia raport ze stanu realizacji projektu międzynarodowego potatoMETABIOME przez zespół badawczy z oddziału IHAR-PIB w Boninie oraz Instytut Agrofizyki PAN w okresie 2019-2020. Opisano zakres prac wykonanych w celu selekcji odmian ziemniaka posiadających cechy korzystne do indukowania interakcji z mikroorganizmami glebowymi oraz ogólnie omówiono prace nad wpływem naturalnego mikrobiomu glebowego na reakcję odmian ziemniaka na stres biotyczny i abiotyczny. W bieżącym roku wykonane zostanie doświadczenie polowe, którego plon będzie analizowany w roku 2022.

Słowa kluczowe: mikrobiom, potatoMETABIOME, ziemniak

Abstract

The publication presents a report on implementing the international potatoMETABIOME project by the research team from the Bonin Research Center (part of Plant Breeding and Acclimatization Institute – National Research Institute, Poland) and Institute of Agrophysics, PAS in the period 2019-2020. The paper describes the scope of work carried out to identify potato cultivars with microbiome interaction traits (MIT) favorable for inducing interactions with soil microorganisms and generally discusses the impact of the natural soil microbiome on the response of potato cultivars to biotic and abiotic stress. This year, a field experiment will be performed, the yield of which will be analyzed in 2022.

Keywords: microbiome, potatoMETABIOME, potato

Oddział IHAR-PIB w Boninie oraz Instytut Agrofizyki PAN od marca 2019 roku są członkami konsorcjum międzynarodowego realizującego projekt o akronimie potatoMETABIOME pt. „Wykorzystanie interakcji ziemniak-mikrobiom dla

rozwoju zrównoważonych strategii hodowlanych i produkcyjnych” (ang. Harnessing the potato-microbiome interactions for development of sustainable breeding and production strategies). Kierownikiem całego konsorcjum jest prof. Joana Falcao Salles

(University of Groningen-GELIFES, Niderlandy). Nadzór nad realizacją badań w Polsce prowadzi Narodowe Centrum Badań i Rozwoju. Kierownikiem konsorcjum utworzonego przez polskie instytucje naukowe jest prof. dr hab. Magdalena Frąc z Instytutu Agrofizyki PAN w Lublinie. Badania realizowane przez zespół w IHAR-PIB w Boninie koordynuje dr hab. Krzysztof Treder. Czas realizacji projektu obejmuje lata 2019-2022. Na realizację badań zespół w Boninie uzyskał 625 694 zł, a zespół IA PAN 417 131 zł z programu badawczo-rozwojowego Unii Europejskiej Horyzont 2020 w ramach działania SusCrop sieci ERA-NET. Szczegółowy opis celów i założeń projektu przedstawiono w osobnej publikacji (Treder 2019).

Celem niniejszej pracy jest prezentacja bieżącego stanu badań prowadzonych w oddziale IHAR-PIB w Boninie oraz IA PAN bez szczegółowego opisu wyników, które będą publikowane w specjalistycznych czasopismach naukowych.

Oddział IHAR-PIB w Boninie był źródłem wszystkich roślin *in vitro* użytych do badań wykonywanych przez konsorcjantów z Austrii, Francji, Niderlandów, Irlandii i Niemiec. Jednocześnie wykonywane były doświadczenia, których celem była ocena wpływu mikroorganizmów glebowych na odpowiedź odmian ziemniaka na stres abiotyczny (susza) i biotyczny (rizoktonioza). Ponadto Oddział w roku 2021 wykonuje doświadczenie polowe, którego wyniki będą analizowane po zakończeniu sezonu. Część doświadczeń będzie wykonywana na zebranych bulwach. Ich wyniki będą analizowane w roku 2022. W wymienionych badaniach współuczestniczy wraz ze swoim zespołem kierownik polskiej części projektu – prof. dr inż. Magdalena Frąc z Instytutu Agrofizyki PAN w Lublinie. Efektem badań wykonywanych przez zespół prof. Magdaleny Frąc jest szczegółowa mikrobiologiczna i genomowa charakterystyka mikrobiomu strefy korzeniowej badanych odmian ziemniaka z wykorzystaniem systemu BIOLOG oraz głębokiego sekwencjonowania (Panek i in. 2020).

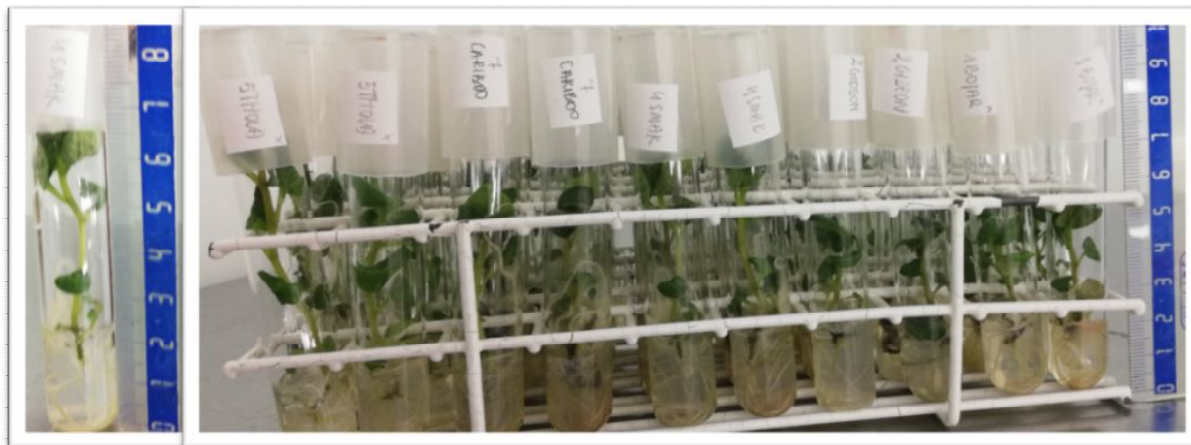
Jak wspomniano wyżej, prace w oddziale IHAR-PIB w Boninie koncentrują się na re-

alizacji dwóch głównych zadań: wytwarzaniu roślin *in vitro* do selekcji genotypów o cechach korzystnych do tworzenia interakcji z korzystnymi mikroorganizmami oraz badaniach nad wpływem mikrobiomu glebowego na odpowiedź odmian ziemniaka na stres abiotyczny (susza) i biotyczny (patogen). Efekty tych prac zostaną omówione szczegółowo poniżej.

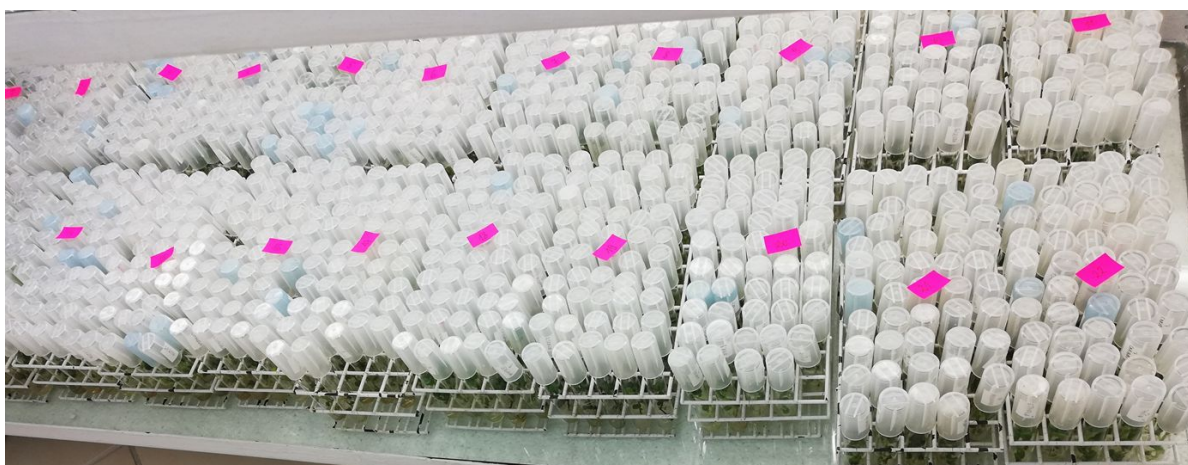
Wybór odmian ziemniaka o cechach korzystnych pod względem ich potencjalnej współpracy z promującymi wzrost roślin mikroorganizmami glebowymi

W celu identyfikacji odmian z potencjalnymi cechami wzmagającymi interakcję roślin ziemniaka z korzystnymi dla wzrostu roślin mikroorganizmami (MIT) wykonano zestawienie szeregu cech dla 1537 genotypów ziemniaka przechowywanych w Banku Genów Ziemniaka w Pracowni Zasobów Genowych i Kultur *in Vitro* (oddział IHAR-PIB w Boninie). Zestawienie obejmowało:

- informację o obecności endofitów w roślinach *in vitro* danej odmiany;
- poziom odporności na wirusy ziemniaka Y (PVY), liściozwoju (PLRV) oraz M (PVM), *Synchytrium endobioticum* (rak ziemniaka), liści, łodyg i bulw na *Phytophthora infestans* (zaraza ziemniaka), na bakterie pektynolityczne (odporność na czarną nóżkę), bulw na *Helminthosporium solani* (parch srebrzysty), bulw na *Streptomyces scabies* (parch zwykły), nicienie z rodzaju *Globodera*, bulw na zgnilizny przechowalnicze, bulw na uszkodzenia mechaniczne;
- informację o odmianach rodzicielskich, z krzyżowania których powstała dana odmiana, o klasie wczesności ziemniaków, kierunku użytkowania (jadalne/skrobiowe), typie kulinarnym (A-C), przydatności na frytki, przydatności na chipsy, zawartości skrobi, kolorze skórki, kształcie bulwy, głębokości oczek;
- dane na temat kraju pochodzenia, twórcy odmiany, daty wytworzenia, daty rejestracji odmiany w Polsce, daty wprowadzenia do banku.



Fot. 1. Rośliny *in vitro* namnożone z roślinek przechowywanych w banku. Z boku przyłożono linijkę w celu zobrazowania wielkości (fot. D. Michałowska)



Fot. 2. Roślinki *in vitro* po namnożeniu, przygotowane do wysłania do Niderlandów. Część z dwustu przygotowanych genotypów (fot. D. Michałowska)

Bazę danych przesłano do koordynator projektu międzynarodowego prof. Joany Falcao Salles, której zespół wykonał selekcję odmian przy użyciu analiz wieloczynnikowych. Na ich podstawie zespół ten wybrał grupę dwustu najbardziej obiecujących genotypów. Wybrane odmiany namnożono za pomocą technik *in vitro* z roślin matecznych przechowywanych w Banku Genów Ziemniaka (oddział IHAR-PIB w Boninie). Przygotowano po dziesięć roślinek *in vitro* każdej odmiany. Rośliny zostały przebadane w Centralnym Laboratorium Państwowej Inspekcji Ochrony Roślin i Nasiennictwa (PIO-RiN) w celu potwierdzenia statusu roślin wolnych od chorób i wystawienia paszportu zdrowia roślin. Taki paszport jest wymagany przez polskie prawo dla żywych roślin ziemniaka transportowanych na terenie kraju i za granicę. Rośliny wysłano do koordynator

projektu międzynarodowego, której zespół wykonał badania systemu korzeniowego oraz składu eksudatów korzeniowych i na podstawie uzyskanych wyników wyselekcjonował 50 genotypów reprezentujących pełny zakres zmienności cech występujących w wyjściowej populacji odmian.

W roku 2020 przygotowano i wysłano do partnerów zagranicznych w Niderlandach, Irlandii, Austrii i w Niemczech łącznie 692 roślinki *in vitro*. Do doświadczeń i produkcji bulw wykonanych w oddziale IHAR-PIB w Boninie przygotowano łącznie 1635 roślinek *in vitro*. W roku 2020 planowano wysadzenie 10 genotypów wyselekcjonowanych przez zespół koordynatora projektu prof. Joany Falcao Salles spośród 50 przesłanych przez IHAR-PIB w roku 2019. Niestety z powodu pandemii proces selekcji tych genotypów znacząco się wydłużył i zespół oddziału

IHAR-PIB w Boninie uzyskał informację o tym, które to są genotypy, dopiero w czerwcu 2020.

Namnażanie roślin *in vitro* trwa ok. trzech miesięcy. Dlatego wykonanie doświadczenia polowego w roku 2020 było niemożliwe i zostało ono przełożone na rok 2021. Namnażanie wybranych odmian rozpoczęło w

drugiej połowie czerwca, w związku z czym dopiero w połowie września zaczęto wysadzać roślinki *in vitro* w szklarni w celu uzyskania bulw do doświadczenia polowego. Kolejne partie roślin wysadzano w październiku i bulwy zebrano w kwietniu 2021 r. Odmiany różniły się w sposób istotny zdolnością plonotwórczą.



Fot. 3. Roślinki *in vitro* wysadzone do skrzynek w celu produkcji bulw, wrzesień 2020 (fot. A. Pawłowska)

Strategie mające na celu poprawę odporności ziemniaków na stresy biotyczne i abiotyczne

Jak wspomiano wyżej, zespół prof. Joany Falcao Salles z 200 badanych genotypów na podstawie analizy systemu korzeniowego oraz składu eksudatów korzeniowych wytypował 50. Dla tych 50 genotypów (plus genotyp kontrolny) wykonano w oddziale IHAR-PIB w Boninie doświadczenie w warunkach kontrolowanych, którego celem była ocena wpływu mikroorganizmów glebowych na reakcję badanych odmian na stres biotyczny i abiotyczny (suszę).

Eksperyment wykonano bez stosowania pestycydów i obejmował on trzy warianty:

1. brak patogenu / 60% całkowitej pojemności wodnej (ang. water holding capacity – WHC, kontrola);
2. brak patogenu / 30% WHC (stres abiotyczny – susza);

3. obecność patogenu / 60% WHC (stres biotyczny – patogen).

W celu wykonania doświadczenia pobrano naturalną ziemię z pola, na którym w 2019 r. uprawiano ziemniaki bez ochrony chemicznej. Dla każdej z 51 odmian przygotowano po 15 roślinek *in vitro* (765 łącznie), które wysadzono do doniczek wypełnionych ziemią z pola i aklimatyzowano przez 16 dni. Po tym czasie rośliny podzielono na trzy grupy, po pięć roślin danej odmiany w każdej. Doniczki każdej z pięciu roślin po opisanii randomizowano (ustawiono w przypadkowo wybranych miejscach) w celu wyeliminowania wpływu warunków lokalnych na przebieg doświadczenia.

Rośliny z grupy kontrolnej podlewano przez cały czas trwania doświadczenia, tak by zachować 60% całkowitej pojemności wodnej (WHC, kontrola). Rośliny z grupy poddanej stresowi abiotycznemu podlewano do zachowania 30% WHC (susza). Glebę

roślin poddanych stresowi biotycznemu inokulowano zawiesiną grzybni bezpłciowej (anamorfy) strzępniczka pasożytniczego

(*Thanatephorus cucumeris*), sprawcy rizoktoniozy ziemniaka. Anamorfa tego grzyba znana jest pod nazwą *Rhizoctonia solani*.



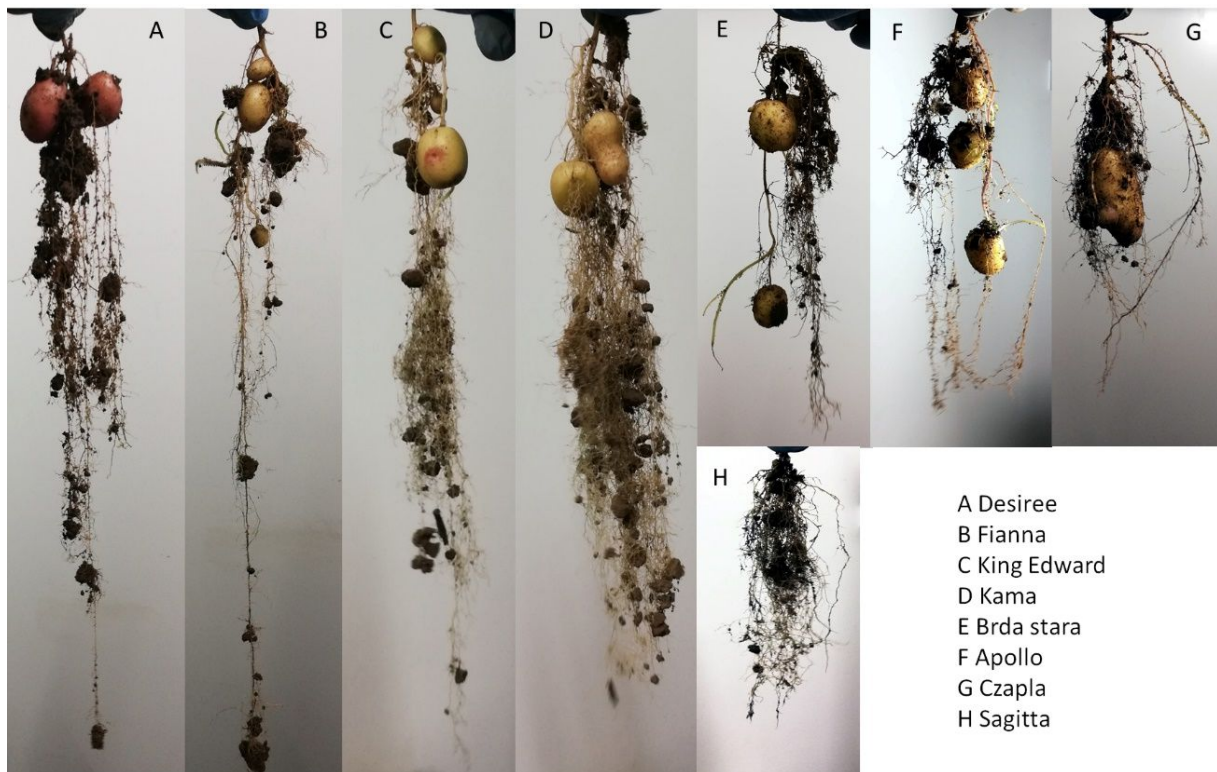
Fot. 4. Zmienność wzrostu na przykładzie 12 odmian dla roślin uprawianych (od lewej do prawej) w warunkach kontrolowanych, w stresie suszy i w obecności patogenu (strzępniczek pasożytniczy). (fot. A. Pawłowska)

W 46. dniu doświadczenia pobrano próby z wszystkich odmian, w tym z trzech roślin kontrolnych, trzech roślin poddanych suszy i trzech roślin inokulowanych patogenem dla każdej z 51 odmian. Próby pobierano bezpośrednio do ciekłego azotu, przechowano w -80°C i wysłano w suchym lodzie do partnera w Niemczech (Central Infrastructure Group Genomics and Transcript Profiling, Max-Planck-Institute of Molecular Plant Physiology, Potsdam), który wykonał analizy metaboliczne i obecnie rozpoczyna badania transkryptomiczne.

Po zebraniu prób zmierzono wzrost roślin i wykonano dokumentację fotograficzną, zestawiając po jednej roślinie kontrolnej, jednej poddanej suszy i jednej inokulowanej patogenem dla każdej odmiany. Reakcje odmian były zróżnicowane. Rośliny kontrolne były zazwyczaj wyższe od roślin poddanych suszy, jednak często podobnego wzrostu lub niższe niż rośliny inokulowane patogenem (fot. 4). Możliwym wyjaśnieniem tej obserwacji jest indukowanie przez patogen wzrostu elongacyjnego roślin. Wyniki analiz metabolicznych wykażą, czy w tej grupie podwyższona była koncentracja hormonów i

metabolitów odpowiedzialnych za taki proces. Po 60 dniach od rozpoczęcia doświadczenia planowano zebranie prób gleby ze strefy przykorzeniowej i przesłanie jej do polskiego lidera projektu – prof. dr hab. Magdaleny Frąc z Instytutu Agrofizyki PAN w Lublinie. Jednak z uwagi na wybuch pandemii i częściowe zamknięcie zarówno Instytutu Agrofizyki, jak i oddziału IHAR-PIB w Boninie próby roślin zebrano 123 dni po rozpoczęciu doświadczenia.

Wykonano pomiary masy części nadziemnej, masy i długości korzeni, liczby bulw oraz ich łącznego ciężaru. Wyniki uśrednione dla 51 odmian wskazują, że zarówno stres abiotyczny, jak i biotyczny miały istotny wpływ na spadek masy korzeni przy niewielkich różnicach w masie części zielonej i długości korzeni. Na te dwa parametry genotyp ziemniaka wpływał w większym stopniu niż zadany stres, niezależnie od jego rodzaju.



Fot. 5. Przykład różnicowania systemów korzeniowych odmian ziemniaka (fot. K. Treder)

Średnia liczba bulw utworzonych przez jedną roślinę była największa w kontroli, jednak stresy abiotyczny i biotyczny tylko nieznacznie obniżały ten parametr. Abiotyczny (susza) drastycznie obniżał masę bulw utworzonych przez jedną roślinę i średnią masę pojedynczej bulwy. Oznacza to, że pomimo nieznacznie mniejszej liczby bulw były one istotnie mniejsze od bulw utworzonych przez rośliny kontrolne, jak również te spod roślin inkubowanych patogenem. Jednocześnie stres biotyczny tylko nieznacznie obniżał masę bulw.

Próbki gleby przesłano do Instytutu Agrofizyki PAN w Lublinie, gdzie wykonane zostały badania zbiorowisk bakterii i grzybów z użyciem markerów molekularnych z wykorzystaniem sekwencjonowania następnej generacji (NGS) oraz analizy profili metabolicznych za pomocą systemu Biolog. Uzyskane wyniki wskazują na duży wpływ zarówno genotypu ziemniaka, jak i obu rodzajów stresu na różnicowanie mikrobiomu i mykobioty strefy przykorzeniowej. Ponadto zebrano i zachowano w -80°C tkankę liści do oznaczeń biochemicznych. Badania te z powodu pandemii nie zostały wykonane w roku 2020 i ich wykonanie planowane jest w roku bieżącym.

Wnioski

Oddział IHAR-PIB w Boninie oraz Instytut Agrofizyki PAN aktywnie uczestniczą w realizacji projektu potatoMETAbiome. IHAR-PIB jest źródłem roślin *in vitro* do badań prowadzonych przez wszystkich partnerów projektu. Badane odmiany ziemniaka wykazały zróżnicowaną odpowiedź na warunki stresowe. Genotyp odmian wpływał na masę części zielonej, długość korzeni oraz liczbę bulw z rośliny w większym stopniu niż czynniki stresowe. Jednocześnie stresy abiotyczny i biotyczny miały istotny wpływ na spadek masy korzeni. Abiotyczny (susza) miał bardzo duży wpływ na obniżenie wielkości i całkowitej masy bulw. Na bioróżnorodność mikrobiomu ziemniaka miały wpływ zarówno rodzaj odmiany (genotyp), jak i zadane stesy. Uprawa w niekorzystnym dla wzrostu roślin sezonie jesienno-zimowym w przypadku części badanych odmian dwukrotnie wydłużyła czas potrzebny na wiązanie bulw i obniżała ich zdolność plonotwórczą. Na skutek pandemii COVID-19, wywołanej przez wirus SARS-CoV-2, realizacja projektu potatoMETAbiome wydłużyła się o rok. Doświadczenie połowe planowane na rok 2020 jest wykonywane w roku 2021.

Podziękowania

Autorzy dziękują Marii Fedczak, Alicji Przewłóce, Jerzemu Osowskiemu, Hannie Gawińskiej-Urbaniowicz, Alinie Gapik oraz Teresie Rak za pomoc w wykonywaniu doświadczeń. Projekt potatoMETABIOME jest realizowany w ramach działania SusCrop sieci ERA-NET i otrzymał finansowanie z programu badawczo-rozwojowego Unii Europejskiej Horyzont 2020, nr umowy: No 771134. W Polsce środki są przekazywane zespołom badawczym przez NCBiR, nr umowy: SU-SCROP//POTATOMETABIOME/01/2019.

Literatura

1. Treder K. 2019. Cele projektu badawczego potatoMETABIOME "Wykorzystanie interakcji ziemniak-mikrobiom do opracowania strategii zrównoważonej hodowli i produkcji ziemniaka. – Ziemn. Pol. 3: 3-6; **2. Panek J., Frąc M., Treder K., Pawłowska A., Michałowska A., Falcao Salles J. 2020.** Bioróżnorodność mikrobiomu ryzosfery ziemniaka. [W:] Bioróżnorodność środowiska glebowego – wskaźniki oceny. *Konf. Nauk. On-line. Puławy, 5.11.2020. Mater. konf. poster nr 34: 38*



SusCrop – ERA-NET
Cofund on Sustainable Crop Production
FACCEJPI



Narodowe Centrum
Badań i Rozwoju