

Lp. w zał. do Rozporządzenia MRiRW: 56.

Tytuł zadania: **Badania ekspresji i genetyczna charakterystyka odporności na bakterie „*Dickeya solani*” w wyróżnionych źródłach odporności w ziemniaku na poziomie diploidalnym.**

Kierownik zadania: *dr hab. R. Lebecka prof. IHAR-PIB*

Cel zadania:

Dickeya solani (Wolf et al., 2014) to nowy gatunek bakterii powodujący czarną nóżkę i mokrą zgniliznę bulw ziemniaka. Celem projektu jest zidentyfikowanie genów/*loci* cech ilościowych odporności na bakterie *D. solani* w populacji mapującej ziemniaka diploidalnego, scharakteryzowanie reakcji odpornościowej bulw i roślin 2x mieszańców międzygatunkowych ziemniaka w zależności od temperatury oraz zbadanie zdolności do systemicznej kolonizacji wysokoodpornej rośliny ziemniaka przez bakterie *D. solani* i możliwości przenoszenia tej infekcji na bulwy potomne.

W 2014 r. celem pracy było: (a) ustalenie warunków testowania odporności bulw ziemniaka na bakterie *D. solani*, (b) ocena odporności bulw diploidalnych (2x) mieszańców międzygatunkowych *Solanum* oraz (c) określenie ich płodności w celu wybrania form rodzicielskich populacji mapującej.

(a) Ustalenie warunków testowania odporności bulw ziemniaka na bakterie *D. solani*.

Materiały i metody:

Odmiany ziemniaka: Głada (standard w testach odporności bulw na mokrą zgniliznę, ocena 5 w skali 9 stopniowej, gdzie 9 = najodporniejszy), Irys (standard podatny - ocena 3), Gandawa (5 w badaniach własnych), Sonda (odmiana skrobiowa, nie testowana). Bakterie: szczep IFB0099 gatunku *D. solani* otrzymano z kolekcji bakterii Międzyuczelnianego Wydziału Biotechnologii Uniwersytetu Gdańskiego i Akademii Medycznej w Gdańsku.

Zastosowano modyfikowaną metodę punktowej inokulacji bulw i metodę oceny wirulencji bakterii. Bakterie namnażano na pożywce Lysogeny Broth z dodatkiem agaru, inkubowano je w temperaturze 25°C przez 48 godzin a następnie splukiwano destylowaną wodą i doprowadzano do absorbancji 0,1 przy długości fali 600 nm w spektrofotometrze Hitachi U-1900. Zawiesinę bakterii trzymano na mieszadle magnetycznym przez okres inokulacji. Bulwy ziemniaka przechowywano po zbiorze co najmniej jeden miesiąc. Dzień przed testem bulwy myto, moczo w 1% roztworze podchlorynu sodu przez 15 minut, ponownie myto i układano do wyschnięcia. W dniu testowania bulwy kluto za pomocą stalowego pręta o długości 10 mm i średnicy 2 mm. Do otworu wprowadzano 10 µl inokulum a po wprowadzeniu otwór zaklejało wazeliną umieszczoną na kawałku parafilmu. Bulwy układano w pojemnikach, zraszano wodą destylowaną za pomocą spryskiwacza i pojemniki zamykano szczelną pokrywką. Bulwy umieszczono w czterech różnych temperaturach: 20°C, 23°C, 26°C i 30°C. Czas inkubacji został dostosowany do reakcji podatnej odmiany wzorcowej Irys i średnio-odpornej odmiany Głada. Doświadczenie przeprowadzono w dwóch terminach. W każdym doświadczeniu testowano po 10 bulw czterech odmian, w dwóch powtórzeniach, w czterech temperaturach (łącznie 640 bulw). Po okresie inkubacji zgniłą tkankę ważono w bulwach krojonych wzdłuż miejsca inokulacji.

Do analizy ocen porażenia bulw zastosowano trzyczynnikową analizę wariancji, oraz test Tuckeya do uszeregowania średnich (STATISTICA)

Wyniki i dyskusja:

Bakterie pektynolityczne wywołujące mokrą zgniliznę bulw ziemniaka z rodzaju *Pectobacterium* i *Dickeya*, różnią się między sobą optymalną temperaturą wzrostu. Dla wzrostu bakterii *P. atrosepticum* i *P. carotovorum* subsp. *carotovorum* optymalna temperatura wynosi 24-27°C oraz 28-30°C odpowiednio, a dla bakterii z rodzaju *Dickeya* wynosi 34-37°C (Perombelon i Kelman, 1980). Optymalna temperatura wzrostu bakterii *D. solani* szczepu IFB0099 na pożywce pełnej płynnej LB wynosi 33-35°C (badania własne, projekt POTPAT, 2014). Optymalna temperatura dla patogeniczności *P. atrosepticum* wynosi 20°C (Latour et al. 2007), a do produkcji enzymów pektynolitycznych 12-24°C (Smadja et al. 2004). Stopień porażenia bulw przez bakterie rośnie wraz ze wzrostem temperatury i czasem inkubacji. Na stopień porażenia ma także wpływ odporność bulw, w tym przypadku szereg enzymów ma swoje optimum działania w niższych temperaturach. W warunkach dobrego zaopatrzenia w tlen bulwy potrafią wytworzyć suberynę w miejscu zranienia i zahamować rozwój bakterii. Celem przeprowadzonego testu było wybranie warunków optymalnych

do oceny odporności bulw ziemniaka na bakterie *D. solani*. Na podstawie otrzymanych wyników wybrano temperaturę 26°C i czas inkubacji trzy dni. Test w tych warunkach pokazał największe różnice pomiędzy porażeniem podatnej odmiany Irys a innymi odmianami o wyższej odporności.

Przeprowadzono trzyczynnikową analizę wariancji wyników porażenia bulw przez bakterie gatunku *D. solani*, szczepu IFB0099. Porażenie wyrażane było masą zgniłej tkanki bulwy. Analiza wariancji wykazała istotny wpływ odmiany, warunków testu oraz ich interakcji na cechę badaną. Termin testu nie miał istotnego wpływu na średnią porażenia. Najsilniejsze porażenie bulw wystąpiło w temperaturze 26°C po trzech dniach inkubacji. Podatna na *Pectobacterium* odmiana Irys była istotnie najsilniej porażona we wszystkich temperaturach, z wyjątkiem temperatury 20°C. W tej temperaturze średnie porażenie odmiany Irys nie różniło się istotnie od porażenia średnioodpornych na *Pectobacterium* odmian Gandawy i Glady. W temperaturze 20°C porażeniu uległo 28,8% testowanych bulw, w temperaturze 23°C – wskaźnik ten wynosił 76,9%. W 30°C porażeniu uległy wszystkie bulwy, podobnie w temperaturze 26°C, w której jedna bulwa ze 160 testowanych nie uległa porażeniu. Na podstawie otrzymanych wyników, do testowania odporności bulw ziemniaka na *D. solani* wybrano temperaturę 26°C i czas inkubacji trzy dni. Test w tych warunkach pokazał największe różnice pomiędzy porażeniem podatnej odmiany Irys a innymi odmianami o wyższej odporności.

(b) Ocena odporności bulw diploidalnych (2x) mieszańców międzygatunkowych *Solanum*.

Materiały i metody:

Odmiany Irys i Glada, 26 2x mieszańców międzygatunkowych ziemniaka, które w uprzednich badaniach charakteryzowały się wysoką odpornością na bakterie pektynolityczne z rodzaju *Pectobacterium*, 13 podatnych mieszańców, jeden mieszaniec somatyczny USA 249, złożony z diploidalnego *S. brevidens* (gatunku nietuberyzującego) i *S. tuberosum* (wzorzec wysokiej odporności na bakterie z rodzaju *Pectobacterium*).

Bakterie: opisano powyżej.

Metody: opisano powyżej. Inkubacja trwała trzy dni w temperaturze 26°C. Doświadczenie przeprowadzono w trzech terminach, w każdym terminie testowano po 10 bulw z każdego klonu i po 20 bulw wzorców (odmiany Irys i Glady). Porażenie wyrażono masą zgniłej tkanki.

Bulwy 13 klonów podatnych na *Pectobacterium* testowano metodą punktowej inokulacji bulw w jednym terminie, po 10 bulw każdego klonu. Porażenie wyrażono średnicą zgniłej tkanki w mm.

Wyniki i dyskusja:

W pierwszym terminie testu podatna odmiana Irys uległa silnemu porażeniu, które wynosiło 11,1g zgniłej tkanki, natomiast porażenie średnio-odpornej odmiany Glada wynosiło 2,3g. Ze względu na słabe porażenie odmiany Irys w drugim i trzecim terminie po trzech dniach inkubacji test wydłużono o jeden dzień. Analiza wariancji otrzymanych wyników wykazała istotne różnice w porażeniu testowanych genotypów ziemniaka, brak istotnych różnic w porażeniu badanych form w różnych terminach testu oraz brak istotnej interakcji pomiędzy terminem testu i genotypem. Średnia porażonej masy tkanki podatnej odmiany Irys wynosiła 12,94g, średnio-odpornej odmiany Glada – 4,69g, jeden klon diploidalny był silniej porażony od odmiany Glada, a jeden klon – słabiej, oba klony nie różniły się od niej istotnie, a średnia porażenia masy tkanki tych klonów wynosiła odpowiednio 4,81g i 2,35g. Pozostałe klony (24) charakteryzowały się wysoką odpornością, a średnia porażenia masy tkanki klonów wynosiła od 0,01 do 2,00g. Testowane podatne mieszańce 2x uległy porażeniu od słabego do silnego. Średnie porażenie pozwoliło na wyróżnienie pięciu grup. Podatna odmiana Irys uległa najsilniejszemu porażeniu, średnia wynosiła 28 mm (średnica zgniłej tkanki na przekroju bulwy wzdłuż miejsca inokulacji), drugim silnie porażonym klonem był DG 07-104, którego porażenie wynosiło 22,5 mm.

(c) Określenie płodności 2x mieszańców *Solanum* w celu wybrania form rodzicielskich populacji mapującej.

Materiały i metody:

27 mieszańców 2x *Solanum*. Pyłek zebrano z kilku dojrzałych kwiatów paru roślin. Po zabarwieniu pyłku kwaśną laktoufuksyną określono procentowy udział wybarwionych na kolor ciemnoróżowy, niezdeformowanych ziaren pyłku, przy powiększeniu 200x, w kilku polach widzenia, wśród 100-200 ziaren.

Wyniki i dyskusja:

Wszystkie klony diploidalne charakteryzowały się płodnością pyłku, a średnia płodność wynosiła 65% (zakres od 30% do 90%). Pyłek wybarwiony przynajmniej w 30% jest płodny i może być efektywnym zapylaczem w programie krzyżowań (Abdalla, 1970; Janssen et al., 1976).

Wnioski:

Agresywność bakterii *D. solani* rośnie wraz z temperaturą w badanym przedziale temperatur od 20°C do 30°C. W temperaturze 26°C zaobserwowano większe różnice w porażeniu odmiany podatnej i średnioodpornej niż w temperaturze 30°C, dlatego do testowania odporności bulw na bakterie *D. solani* wybrano temperaturę 26°C i czas inkubacji 3 lub 4 dni (w zależności od reakcji wzorców – podatnej odmiany Irys i średnioodpornej odmiany Głada). Do krzyżowania i otrzymania populacji mapującej wybrano klon diploidalny DG 00-270 - wysokoodporny na bakterie *D. solani* w teście inokulacji bulw. Poszukiwanie form podatnych jest w trakcie realizacji, dotychczasowymi kandydatami są klony DG07-104 i DG08-305. Wybrane formy posiadają płodny pyłek.

Literatura:

1. Abdalla M.M.F. 1970. Inbreeding, heterosis, fertility, plasmon differentiation and *Phytophthora* resistance in *Solanum verrucosum* Schlecht. and some interspecific crosses in *Solanum*. Agr. Res. Rep. Wageningen 748: 213.
2. Janssen A.W.B., Hermsen J.G.T. 1976. Estimating pollen fertility in *Solanum* species and haploids. Euphytica 25: 577-586.
3. Latour X., Diallo S., Chevalier S., Morin D., Smadja B., Burini J.F., Haras D., Orange N. 2007. Thermoregulation of *N*-Acyl Homoserine Lactone-Based Quorum Sensing in the Soft Rot Bacterium *Pectobacterium atrosepticum*. Appl. Environ. Microbiol. 73(12): 4078–4081.
4. Pérombelon M.C.M., Kelman A. 1980. Ecology of the soft rot erwinias. Annu Rev Phytopathol 18: 361-387.
5. Smadja B., Latour X., Trigui S., Burini J.F., Chevalier S., Orange N. 2004. Thermodependence of growth and enzymatic activities implicated in pathogenicity of two *Erwinia carotovora* subspecies (*Pectobacterium* spp.). Can. J. Microbiol. 50: 19–27.
6. van der Wolf J.M., Nijhuis E.H., Kowalewska M.J., Saddler G.S., Parkinson N., Elphinstone J.G., Pritchard L., Toth I.K., Lojkowska E., Potrykus M., Waleron M., de Vos P., Cleenwerck I., Pirhonen M., Garland L., Hélias V., Pothier J.E., Pfluger V., Duffy B., Tsrer L., Manulis S. 2014. *Dickeya solani* sp. nov., a pectinolytic plant-pathogenic bacterium isolated from potato (*Solanum tuberosum*). Int J Syst Evol Microbiol 64: 768–774.