1. Tytuł zadania: **Badania ekspresji i genetyczna charakterystyka odporności na bakterie *Dickeya* *solani* w wyróżnionych źródłach odporności w ziemniaku na poziomie diploidalnym. (nr 56)**
2. Kierownik zadania: dr hab. Renata Lebecka, IHAR - PIB, Oddział Młochów
3. **Cel zadania**:Celem prac w 2017 r. było: a) wybranie odmian różniących się odpornością bulw na bakterie *D. solani* do badań proteomicznych spośród 25 odmian ziemniaka rodziny półrodzeństw, pochodzących od odmiany Katahadin. Pobranie prób z wybranych odmian i dwóch klonów diploidalnych będących formami rodzicielskimi populacji mapującej do izolacji białka, b) znalezienie różnic w profilach białkowych odmian pochodzących od tej samej odmiany i różniących się miedzy sobą poziomem odporności bulw na zakażenie bakteriami *D. solani* oraz diploidalnych form rodzicielskich populacji mapującej, c) ocena fenotypowa odporności bulw na bakterie *D. solani*   
   w populacji mapującej ziemniaka diploidalnego.

**a) namnożenie zdrowego materiału bulwowego do badań. Przeprowadzenie doświadczenia – przygotowanie prób do badań.**

**Materiały i metody.** Materiałem badanym było 25 odmian ziemniaka pochodzących od odmiany Katahdin (Ari, Avon, Bea, Brasovean, Calrose, Carpatin, Cayuga, Dalila, Ermak, Hankkijan Timo, Humalda, Igor, Magura, Menominee, Pontiac, Potomac, Sebago, Sedov, Seneca, Sowa, Tarpan, Ulster Supreme, Urgenta, Vekaro, Yampa), odmiana Katahdin, odmiana Irys i Glada. Ocenę porażenia bulw po inokulacji bakteriami *D. solani* powtórzono w drugim roku badań. W każdym z dwóch terminów testów inokulowano po 6 bulw każdej odmiany w dwóch powtórzeniach. Po trzech dniach inkubacji w T 26oC określono masę zgniłej tkanki bulw ziemniaka. Do badania białek w bulwach zakażanych   
i traktowanych wodą wybrano odmiany najodporniejsze i najpodatniejsze.

**Wyniki.** Najbardziej odpornymi odmianami w obu latach badań były odmiany Bea i Humalda, najpodatniejszymi był odmiany: Ulster Supreme, Katahdin i Carpatin. Odmiana Tarpan reagowała zmiennie w latach, od wysokiej odporności do podatności w 2017 r. Zmienność cechy badanej   
w odmianach pochodzących od odmiany Katahdin jest relatywnie wąska (średnia dwuletnia wynosi 2,5 g, zakres od 0,8 g do 4,5 g). Średnia wzorcowej podatnej odmiany Irys wynosiła 13 g.

**Materiały i metody**. Przeprowadzono dwa doświadczenia (w tych samych terminach co w 2016 r. –   
w III dekadzie marca i kwietnia), w których pobierano próby po 8 h od inokulacji. Pobrano dodatkowo próby z form rodzicielskich populacji mapowanej. Łącznie do badania LC-MS/MS przekazano 140 prób roztworu białka o koncentracji ok. 0,50 mg/ul, po trawieniu dwoma enzymami.

**Wyniki.** Wybrano odmiany ziemniaka z rodziny półrodzeństw o różnym poziomie odporności bulw na bakterie *D. solani*. Do badań proteomicznych pobrano fragmenty bulw zakażanych i traktowanych wodą 8 h po inokulacji. Z prób wyizolowano białka, które badano metodą LC-MS/MS.

**Wnioski.** Wyniki badań będą analizowane bioinformatycznie w 2018 r.

**b) znalezienie różnic w profilach białkowych podatnej odmiany Irys i odmian pochodzących od odmiany Katahdin różniących się między sobą poziomem odporności bulw na zakażenie bakteriami *D. solani*, 8 i 48 godzin po inokulacji.**

**Materiały i metody.** W celu znalezienia białek różnicowych porównano profile białkowebulw wybranych odmian - traktowanych wodą i zakażonych bakteriami. Wyniki każdej badanej próbki metodą LC-MS/MS zostały przeanalizowane przy użyciu programu Mascot – do wyszukiwania danych spektrometrii mas do identyfikacji białek z sekwencji pierwotnych. Program ten integruje trzy różne metody wyszukiwania: Peptide Mass Fingerprint (eksperymentalne masy peptydów), Sequence Query – masa peptydów połączona z sekwencją aminokwasów, MS/MS Ion Search. Porównanie proteomów wykonano metodą analizy pierwszych składowych (ang. Principal Component Analysis, PCA). Do wyszukiwania białek użyto dostępnych baz danych białek, na przykład: SwissProt, NCBIprot, Potato Genomics Resource. Po 48 h od zakażenia w I terminie testu testowano po 2 próbki traktowane wodą i bakteriami każdej z 8 odmian: Irys (podatna), Humalda, Katahdin, Ulster Supreme, Carpatin, Tarpan, Bea i Magura. Wykonano 8 analiz porównawczych. W II terminie testowano 6 odmian: Irys (podatna), Humalda, Katahdin, Ulster Supreme, Carpatin i Tarpan. Po 8 h od zakażenia testowano po 2 próbki traktowane wodą i bakteriami każdej z odmian, wykonano 6 analiz porównawczych. Po 48 h testowano od 2 do 4 prób. Wykonano 6 analiz porównawczych. Łącznie otrzymano 20 proteomów różnicowych. Przyjęto następujące kryteria wyboru: **różnice jakościowe** – białka występujące w obu badanych próbkach pochodzących z bulw zakażanych i nie występujące w obu próbkach z bulw traktowanych wodą lub odwrotnie, **różnice ilościowe** – białka występują we wszystkich próbkach, z tym, że w próbkach pochodzących z bulw zakażanych jest ich co najmniej dwa razy mniej lub więcej niż w próbkach traktowanych wodą, z prawdopodobieństwem P < 0,1.

**Wyniki i dyskusja.** Liczba peptydów wykrytych w każdym proteomie różnicowym (składającym się z 4 próbek) wynosiła średnio 812 peptydów, zakres od 540 do 1026. Porównania białek różnicowych wykonano manualnie. Otrzymane wyniki świadczą o dużej zmienności pomiędzy porównywanymi próbkami, terminami testu, odmianami. Spośród wykrytych białek ok. 35% oznaczono wykorzystując dostępne bazy danych. Wyniki dla każdego proteomu pokazują na zmiany w profilu białkowym   
w bulwach ziemniaka po zakażeniu bakteriami *D. solani*. Barzic i Com (2012) badali różnice   
w proteomach dwóch odmian ziemniaka, Kerpondy i Bintje, pobierając próby z bulw ziemniaka inokulowanych przez bakterie *Pectobacterium atrosepticum*, metodą infiltracji bakterii przez otwarte aparaty szparkowe. Różnice w profilach białkowych stwierdzono u odmiany Kerpondy – o wyższej odporności na te bakterie. Wykazano zmiany 13 białek, które należały do kategorii przemian energetycznych (glyceraldehyde-3-phosphatedehydrogenase, 2-phosphoglycerate dehydratase lub enolase, fructose biphosphate aldolase, ATPase asubunit), struktur cytoskeletonu (actin), degradacja białek (cysteinę protease inhibitor) i patatyn lub ich prekursorów. Nie znaleziono żadnych różnic   
w proteomie podatnej na bakterie odmiany Bintje (48h po infekcji). W naszych badaniach stwierdzono różnice w proteomie podatnej odmiany Irys. Ponadto wykryte w badaniach Barzic i Com (2012) białko *cysteine protease inhibitor* tylko w odpornej odmianie Kerpondy –– w naszych badaniach wykryto w próbkach najbardziej podatnej odmiany Irys 8h po inokulacji. Przyczyną różnic może być zastosowany sposób inokulacji. W naszych badaniach bulwy przed inokulacją raniono   
za pomocą stalowego pręta. Bulwy kontrolne traktowano wodą. Bulwy zakażane poddawane są dwóm rodzajom stresu – abiotycznemu (zranienia) i biotycznemu (zakażenie bakteriami), natomiast bulwy kontrolne wyłącznie abiotycznemu. W naszych badaniach łącznie zidentyfikowano 96 białek (które przyporządkowano do czterech kategorii według Alexander i Cilia, 2016) w 8 odmianach po zakażeniu bakteriami *D. solani*, po 8 h po inokulacji (6 odmian) i po 48 h (8 odmian). Sześć białek różnicowych występowało w dwóch najodporniejszych odmianach – dwa białka w odmianie Bea, cztery - w odmianie Humalda. Na przykład białko obecne w odmianie Bea, *phosphoinositide phospholipase C*, związane jest z reakcją nadwrażliwości w reakcji odpornościowej, natomiast białko obecne w próbkach odmian Bea i Tarpan, *disulfide-isomerase*, wykryto w reakcji najodporniejszych linii pszenicy na zakażenie hemibiotroficznym patogenem (Ray i in. 2003).

**Wnioski.** Badania są w trakcie realizacji, planujemy odpowiedzieć na pytanie czy wymienione białka różnicowe powtórzą się w badanych próbach w kolejnym roku badań, czy są związane z odpornością   
i czy są specyficzne białka dla odmian najodporniejszych, a także czy są różnice ilościowe w białkach związanych z zakażeniem bulw bakteriami pomiędzy odmianami odpornymi i podatnymi. W celu potwierdzenia otrzymanych wyników pochodzących tylko z 2 próbek każdej kombinacji, w 2017 roku do badań przygotowano po 4 próbki, z każdego z dwóch terminów przeprowadzanego doświadczenia. Analiza otrzymanych danych w tym projekcie będzie prowadzona przy udziale bioinformatyka. Celem pracy jest porównanie proteomów różnicowych odmian o istotnie większej odporności bulw na bakterie *D. solani*.

**Literatura.**

Alexander MM, Cilia M (2016) A molecular tug-of-war: Global plant proteome changes during viral infection,Current Plant Biology 5, 13–24;

Barzic MR i Com E (2012). Proteins Involved in the Interaction of Potato Tubers with *Pectobacterium atrosepticum*: a Proteomic Approach to Understanding Partial Resistance. J Phytopathol 160:561–575;

Ray S, Anderson JM, Urmeev FI, Goodwin S (2003). Rapid induction of a protein disulfide isomerase and defense-related genes in wheat in response to the hemibiotrophic fungal pathogen *Mycosphaerella graminicola*. Plant Mol Biol 53:741-754

c) **Rozmnożenie populacji mapującej, pierwszoroczna ocena odporności bulw populacji mapującej.**

**Materiały i metody.** Populację mapującą, otrzymaną po skrzyżowaniu odpornej formy DG 00-270 z podatną na bakterie *D. solani* formą DG 08-305, rozmnażano w polu, szklarni i namiocie foliowym, włącznie z formami rodzicielskimi. Bulwy zebrano z pola i opisano pod względem plonu, liczby bulw, kształtu bulw, regularności zarysu, głębokości oczek, barwy miąższu i innych wad. Średni plon z roliny wynosił 602 g (zakres od 107 do 1068), średnia liczba bulw wynosiła 22,4 (zakres od 5 do 46), średni ciężar bulwy wynosił 27,8 g (zakres od 8 do 55), średnia regularność zarysu – 4,6 (zakres od 2 do 6), głębokość oczek – 4,6 (zakres od 3 do 7). Bulwy różniły się barwą miąższu od białego (b1, w skali od 1-3, gdzie 1 najbielszy) do miąższu żóltego (ż3, gdzie 3 najciemniej żółty). Testowano 184 genotypy potomne, dwie formy rodzicielskie i dwie odmiany wzorceowe: Irysa (podatna) i Gladę (średnio-odporna). Ocenę fenotypową odporności bulw na bakterie *D. solani* w populacji mapującej ziemniaka diploidalnego przeprowadzono w dwóch termionach badań. W każdym terminie testowano po 6 bulw każdego genotypu w dwóch powtórzeniach

**Wyniki i dyskusja.** Analiza wariancji wykazała istotne różnice w poziomie maceracji bulw ziemniaka   
w testowanych genotypach diploidalnych populacji mapującej oraz ich form rodzicielskich. Testowana cecha przyjmowała rozkład normalny. Średnia masa zgniłej tkanki populacji mapującej wynosiła 1,2 g, zakres cechy od 0,0 do 5,7 g. Średnie form rodzicielskich wynosiły: DG 00-270 - 0,1 g   
i DG 08-305 - 3.3 g.

**Wnioski.** Zróżnicowanie form rodzicielskich pod względem cechy badanej oraz rozkład normalny cechy w diploidalnym nieselekcjonowanym potomstwie daje szansę zmapowania odporności bulw ziemniaka na bakterie *Dickeya solani*. Odporność cechy ma charakter poligeniczny, dlatego testowanie bulw będzie powtórzone w kolejnym roku badań. Otrzymane wyniki zostaną wykorzystane do mapowania cechy w oparciu o markery DArT.