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. W 2018 r. Celem pracy było: (a) Namnożenie zdrowego materiału bulwowego do badań. Przeprowadzenie doświadczenia – przygotowanie prób do badań, (b) Znalezienie różnic w profilach białkowych odmian różniących się miedzy sobą poziomem odporności bulw na zakażenie bakteriami *D. solani*, 8 i 48 godzin po inokulacji, (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.** Wybrano pięć odmian różniących się odpornością bulw na bakterie *D.solani* do badań proteomicznych. Dwie odmiany o wysokiej odporności bulw na *D. solani* (Bea i Humalda) i trzy odmiany wrażliwe (Katahdin, Ulster Supreme i Irys). Z każdej z wybranych odmian oraz z dwóch form rodzicielskich populacji mapującej (odpornego klonu DG 00-270 i podatnego DG 08-305) pobrano po cztery próby z bulw nieranionych (kontrolnych) w każdym z dwóch terminów doświadczenia. Następnie wyizolowano, zidentyfikowano białka metodą wysokosprawnej chromatografii cieczowej sprzężonej z tandemowym spektrometrem mas (LC-MS/MS). Białka izolowano według protokołu opracowanego w poprzednich latach tego projektu (Murawska i in., 2017). 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 < 0,1), co najmniej 1,5 razy.

**Wyniki.** W bulwach nieranionych wszystkie białka różnicujące odmiany odporne od podatnych 8 h po inokulacji wykryte w bulwach ranionych i inokulowanych *D. solani*, z wyjątkiem patatyn, nie różniły się istotnie.

**Dyskusja** Wyniki otrzymanych prób są kontrolą (punktem odniesienia) do porównania bulw nieranionych z bulwami inokulowanymi w zranienia i ranionymi traktowanymi wodą (8 h po inokulacji). Wykryte białka różnicujące w odmianach o wysokiej odporności bulw na bakterie D. solani ulegają silniejszej ekspresji w bulwach ranionych i inokulowanych bakteriami.

**(b) Znalezienie różnic w profilach białkowych odmian różniących się miedzy sobą poziomem odporności bulw na zakażenie bakteriami *D. solani*, 8 i 48 godzin po inokulacji**

**Materiały i Metody.** Próbki z bulw pięciu odmian ziemniaka pobierano po inokulacji bakteriami *D. solani*: z bulw inokulowanych w zranienia, bulw ranionych z wprowadzoną wodą (8 i 48 h po inokulacji), z bulw nieranionych (8 h po inokulacji). Doświadczenia prowadzono w dwóch terminach. Pobierano od dwóch do czterech fragmentów każdej kombinacji doświadczenia.

**Wyniki.** (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 8h) 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 48h różnice pomiędzy jedną z odpornych odmian a pozostałymi odmianami podatnymi zaczynają się zacierać.

**Dyskusja** Porażenie bulw po inokulacji bakteriami pektynolitycznymi, w tym *D. solani*, jest cechą poligeniczną i podlegającą silnym wpływom warunków środowiska. Duży wpływ warunków środowiska na wyniki testów powoduje potrzebę wielokrotnego testowania w celu oceny poziomu odporności badanej odmiany. Z doświadczeń prowadzonych w trzech kolejnych latach badań usunięto odmianę Tarpan, która wykazała silną interakcję genotypu z rokiem testowania, w latach 2015 i 2016 była w grupie najodporniejszych odmian w teście bulwowym, natomiast w 2017 r. uległa silnemu porażeniu. Najbardziej odpornymi odmianami w obu latach badań były odmiany Bea i Humalda. Do grupy odmian podatnych wybrano dwie odmiany, Katahdin, Ulster Supreme i Irys.

Porównania proteomów pojedynczych odmian w konkretnych terminach badań, w różnych wariantach: porównania bulw traktowanych wodą z inokulowanymi, porównania odmian między sobą, pobieranych w różnym czasie po inokulacji, wykazało szereg białek różnicowych. Stwierdzono dużą zmienność wyników w zależności od terminu badań. Dlatego w 2018 r. przeprowadzono analizę zbiorczą wszystkich wyników, ze wszystkich terminów dla dwóch grup odmian: odpornych (Bea, Humalda) i podatnych (Irys, Katahdin, Ulster Supreme). To podejście miało na celu: 1) wyeliminowanie reakcji specyficznych dla genotypu, 2) wyłonienie najistotniejszych różnic w białkach pomiędzy odpornymi i podatnymi genotypami ziemniaka na mokrą zgniliznę bulw.

**Wnioski.** Wykazano różnice w białkach pomiędzy odpornymi i podatnymi odmianami na mokrą zgniliznę bulw, w początkowej i późniejszej fazie infekcji. Większość białek różnicowych występuje w bulwach zranionych i inokulowanych bakteriami w zranienia. 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. Większość białek różnicowych pomiędzy odmianami odpornymi i podatnymi na bakterie *D. solani* jest wspólnych dla bulw inokulowanych i traktowanych wodą w zranienia.

**(c) Ocena fenotypowa odporności bulw na bakterie *D. solani* w populacji mapującej ziemniaka diploidalnego.**

**Materiały i metody.** Populację mapującą, otrzymaną po skrzyżowaniu odpornej na bakterie *D. solani* formy DG 00-270 z podatną na bakterie *D. solani* formą DG 08-305, rozmnażano wegetatywnie (186 genotypów potomnych, dwie formy rodzicielskie, odmiany Irys i Glada. Ocenę odporności bulw na *D. solani* prowadzono metodą opisana przez Lebecką (2017). Testowano po 6 bulw z genotypu w dwóch terminach. W każdym teście do ocenianych genotypów potomnych dołączano formy rodzicielskie i wzorce. Oceniono zawartość skrobi w bulwach potomstwa populacji mapującej i form rodzicielskich, na dwóch próbkach, na podstawie pomiaru wagi bulw nad i pod wodą (Zgórska, 2001). Ocena tej cechy umożliwi zbadania związku zawartości skrobi z odpornościa bulw na mokrą zgniliznę. Uzyskano wyniki markerów DArt z populacji mapującej (Diversity Arrays Technology Pty Ltd. Australia).

**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 genotypów populacji mapującej wynosiła 2,3 g, zakres cechy od 0,0 do 7,6 g. Średnia odpornej formy rodzicielskiej DG 00-270 wynosiła 0,8 g, a podatnej formy, DG 08-305 – 5,9 g.

Odporność cechy ma charakter poligeniczny, dlatego testowanie bulw będzie powtórzone w trzecim (ostatnim) roku badań. Otrzymane wyniki zostaną wykorzystane do mapowania cechy w oparciu o markery DArT. Zawartość skrobi w formach rodzicielskich populacji mapującej wynosiła – 20,5 % w DG 00-270, formie odpornej na mokrą zgniliznę i 17,3% w DG 08-305, w formie podatnej. Zakres badanej cechy w potomstiwe wynosił od 11,4% do 23,9 %, ze średnią populacji 17,7%.

**Wnioski.** Wyniki otrzymane w kolejnym roku badań oraz wyniki markerów DArT posłużą do zmapowania QTLs odporności bulw ziemniaka na bakterie *Dickeya solani*. Badania w toku.

**Literatura**

Bakun M, Niemczyk M, Domanski D, Jazwiec R, Perzanowska A, Niemczyk S, et al. Urine proteome of autosomal dominant polycystic kidney disease patients. Clin Proteomics 2012;9:13.

Lebecka R. 2017. Screening for potato resistance to blackleg and soft rot. Plant Breed Seed Sci 75: 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):4062–73 [doi.org/10.1016/j.jprot.2012.05.030](https://doi.org/10.1016/j.jprot.2012.05.030)

Murawska Z. Dębski J., Szajko K., Lebecka R. 2017. Isolation of proteins from potato tubers. Plant Breed Seed Sci 75: 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