

Jednym z problemów z jakimi będzie musiała zmierzyć się ludzkość w XXI wieku będzie zapewnienie wystarczającej ilości dobrej jakości żywności na naszej planecie. Eksperci szacują, że w roku 2050 populacja ludzka osiągnie liczbę 9,2 miliarda osób. Bulwy ziemniaka nazywane „warzywem przyszłości” są już dzisiaj powszechnie wykorzystywane w międzynarodowych programach, mających na celu niwelowanie głodu i niedożywienia na ziemi. Obecnie ziemniak jest podstawowym składnikiem diety, gdyż jego światowa produkcja jest niższa jedynie niż produkcja kukurydzy, ryżu oraz pszenicy (FAO, 2012). Znaczący udział w uprawach ziemniaka ma również Polska, która jest siódmym co do wielkości producentem tego warzywa na świecie (FAO, 2012). Co ciekawe, w Polsce nadal odnotowuje się najwyższą w Europie konsumpcję *per capita* nieprzetworzonych ziemniaków, chociaż zmiany w nawykach żywieniowych oraz stylu życia społeczeństwa zmierzają w stronę zmniejszenia spożycia tego warzywa.

Spośród objawów chorobowych wywoływanych przez patogeny ziemniaka na szczególną uwagę zasługują mokra zgnilizna i czarna nóżka. Za te objawy odpowiadają bakterie pektynolityczne z rodzajów *Dickeya* i *Pectobacterium*, a wśród nich drobnoustroje z gatunku *D. solani*. Należy wspomnieć, że wyodrębniono *D. solani* jako nowy gatunek dopiero dwa lata temu i pojawienie się szczepów należących obecnie do tej grupy taksonomicznej powiązано ze zwiększonymi stratami w uprawie ziemniaka na terenie Europy. Straty powodowane przez bakterie pektynolityczne mogą sięgać nawet 20% plonu i na przykład w Holandii oszacowano je na poziomie 30 mln euro rocznie. Warto wspomnieć, że jak dotąd nie opracowano skutecznych metod ochrony roślin przed drobnoustrojami powodującymi czarną nóżkę i mokrą zgniliznę. Stosowane są jedynie środki zapobiegawcze jak na przykład sadzenie zdrowego, certyfikowanego materiału sadzeniakowego, unikanie zanieczyszczenia upraw mikroorganizmami poprzez zabiegi higieniczne maszyn rolniczych czy prowadzenie zbiorów przy optymalnych warunkach pogodowych.

Bakterie z gatunku *D. solani* to Gram-ujemne urzęsione pałeczki. Jako że gatunek ten został wyodrębniony stosunkowo niedawno niewiele wiadomo na temat uwarunkowań patogenyzy tego drobnoustroju. Stwierdzono dotychczas, że izolaty *D. solani* są bardziej wirulentne niż szczepy *D. dianthicola*, które wcześniej uznawano za dominujące na polach ziemniaka. Wykazano również, że są bardziej konkurencyjne względem mikroflory saprofitycznej ziemniaka. Wieloletnie badania populacyjne bakterii pektynolitycznych na terenie Polski wskazały, że *D. solani* występują na roślinach ziemniaka, ale nie izolowano żywych komórek tego patogena z cieków wodnych. Opisano również znaczące różnice pomiędzy poszczególnymi szczepami *D. solani* w zdolności do maceracji tkanki ziemniaka czy w produkcji enzymów warunkujących wirulencję jak pektynazy, celulazy czy proteazy. Stwierdzono także zróżnicowanie w produkcji sideroforów czy w ruchliwości. Ze względu na to, że szczepy *D. solani* wykazują wysoką jednorodność genomyczną, przyczyny występowania opisanych różnic w cechach fenotypowych są niezwykle interesujące.

Celem proponowanego przez nas projektu jest zgłębienie wiedzy dotyczącej rozwoju infekcji wywołanej przez ten niewystarczająco dobrze poznany drobnoustrój. Skoncentrujemy się na sekwencji włączania ekspresji genów kodujących determinanty wirulencji w trakcie postępującego procesu infekcyjnego w tkance ziemniaka wywołanego przez *D. solani*. Planujemy poznać dynamikę ekspresji genów związanych z wirulencją oraz porównać profile tej ekspresji pomiędzy trzema szczepami *D. solani*, możliwie najbardziej zróżnicowanymi pod względem cech związanych z patogennością. Chcemy również wskazać kluczowe determinanty wirulencji dla rozwoju poszczególnych etapów procesu infekcyjnego.

Dwadzieścia szczepów *D. solani* pochodzących z różnych miejsc w Europie, a zdeponowanych w kolekcji szczepów MWB UG i GUMed zostanie przebadanych pod kątem zdolności do maceracji tkanki ziemniaka, produkcji pektynaz, celulaz, proteaz, sideroforów oraz do ruchliwości. Trzy najbardziej zróżnicowane szczepy zostaną wybrane do badania przebiegu procesu infekcyjnego na bulwach ziemniaka. Zmacerowaną tkankę zawierającą bakterie będziemy pobierać od momentu inokulacji co 8 h przez 72 h i mrozić w ciekłym azocie. Z tego materiału wyizolujemy RNA i dokonamy syntezy cDNA. Metodami genomiki porównawczej wybierzemy geny związane z wirulencją obecne w genomie *D. solani* do analiz poziomu ekspresji genów w trakcie procesu infekcyjnego. Analiza zostanie przeprowadzona metodą qPCR.

Podstawowa hipoteza badawcza zakłada, że geny warunkujące syntezę czynników wirulencji w komórkach bakterii z gatunku *D. solani* eksprymowane są w określonej sekwencji na poszczególnych etapach procesu infekcyjnego. W ramach **drugiej hipotezy** przyjmujemy, że różne szczepy należące do *D. solani* wykazują niejednakowe profile (sekwencję oraz dynamikę) ekspresji genów determinujących główne czynniki wirulencji w trakcie postępującego procesu infekcyjnego, pomimo wysokiej homogenności genomicznej w obrębie tego gatunku. **Trzecia hipoteza** wnosi, że można wyodrębnić czynniki patogenności *D. solani* kluczowe dla rozwoju kolejnych faz infekcji w tkance ziemniaka w oparciu o analizę poziomu ekspresji kodujących je genów i momentu włączenia tej ekspresji.

Podsumowując, poznanie molekularnych podstaw wirulencji u niedawno wyodrębnionego gatunku patogenu o dużym znaczeniu ekonomicznym ma charakter nowatorski. Wyniki zebrane w ramach proponowanych badań znacząco przyczynią się do rozwoju fitopatologii molekularnej.