

# **Badania ekspresji białek w bulwach odmian ziemniaka o zróżnicowanej odporności na bakterie *Dickeya solani***

**Lebecka R,**

**Kistowski M, Dębski J, Szajko K, Murawska Z, Marczewski W**

**Instytut Hodowli i Aklimatyzacji Roślin – Państwowy Instytut Badawczy,  
Instytut Biochemii i Biofizyki, Polska Akademia Nauk**

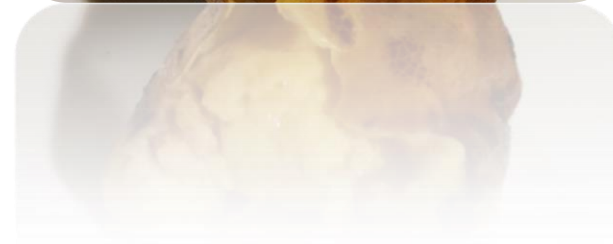
**Zakopane, 8.02.2019**

# Wstęp

Czarna nóżka ziemniaka



Mokra zgnilizna



# Wstęp

## Sprawcy:

- *Pectobacterium atrosepticum*
- *P. carotovorum* subsp. *carotovorum*
- *P. carotovorum* subsp. *brasiliense*
- *P. parmentieri*
- *P. polaris*
- *Dickeya solani*
- *D. dianthicola*
- *D. dadantii*
- *D. zeae*

## Straty:

- obniżenie stopnia kwalifikacji plantacji nasiennych,
- obniżenie plonu bulw,
- strata plonu bulw w czasie przechowywania.



# Wstęp

## Interakcja bakterie pektynolityczne – ziemniak

- ❑ Enzymy degradujące ściany komórkowe roślin: liazy pektynowe, metylesterazy pektyn, poligalakturonazy, celulazy, proteazy.
- ❑ Istotnie więcej peroksydazy, oksydazy polifenolowej, amoniakoliazy L-fenyloalaniny, kwasu chlorogenowego – w odmianach o wyższej odporności i mieszańcach *S. tuberosum* (+) *S. brevidens* (Ngadze 2012; Łojkowska i Hołubowska 1992).
- ❑ 13 białek o podwyższonej ekspresji w odmianie Kerpondy (o wyższej odporności) w porównaniu do kontroli nieinokulowanej, brak różnic w odmianie podatnej (Bintje) 48 h po inokulacji (Barzic i Com 2012).

# Cel badań

Różnice ilościowe w białkach odmian ziemniaka i klonów diploidalnych *Solanum* różniących się poziomem odporności na bakterie powodujące mokrą zgniliznę bulw na wczesnym etapie rozwoju objawów choroby.

Odmiany ziemniaka  
odporne vs podatne

Diploidalne klony *Solanum* spp.  
odporny vs podatny



# Materiał roślinny

## Pięć odmian ziemniaka:

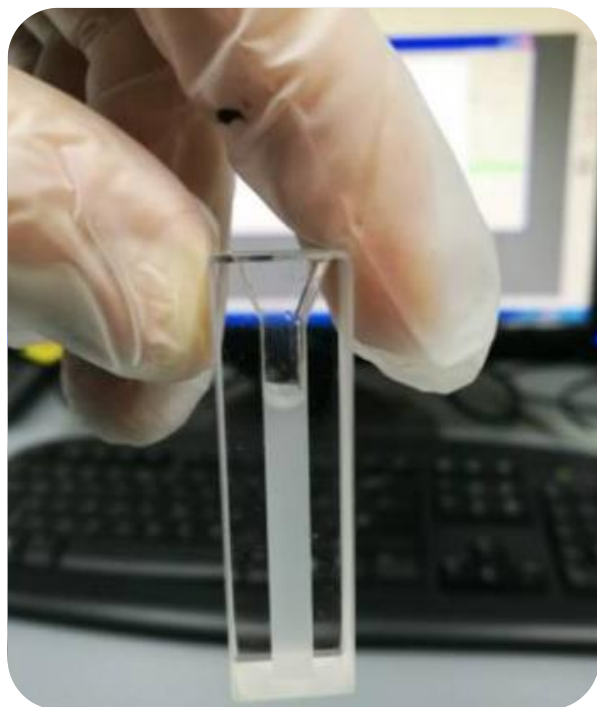
- trzy pochodzą od odmiany Katahdin,
- odmiana Katahdin,
- podatna odmiana Irys.

Dwa klony diploidalne:

- DG 00-270,
- DG 08-305.



# Metody: inokulacja ranionych bulw bakteriami



10  $\mu$ L inokulum  $10^9$  jtk/mL

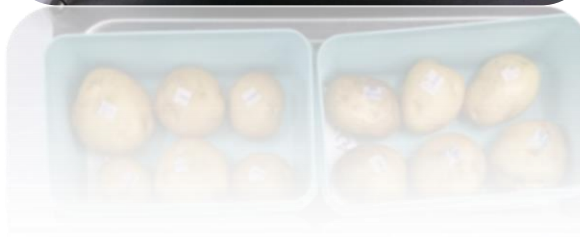




# Metody: inkubacja T 26°C przez trzy dni

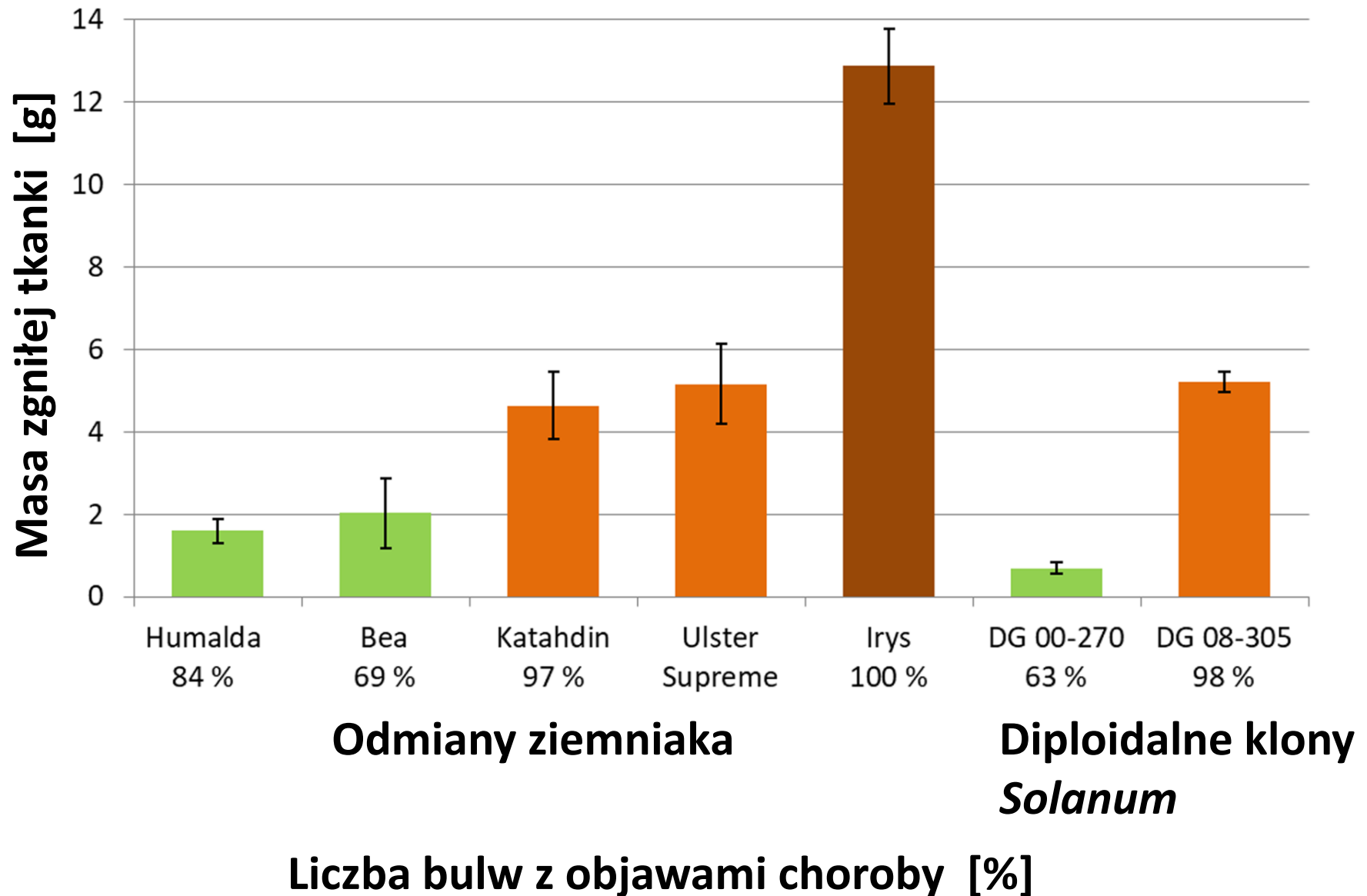
58 bulw/odmianę  
40 bulw/klon diploidalny

6 doświadczeń w trzech latach





# Średnia trzyletnia oceny wielkości porażenia bulw odmian ziemniaka bakteriami *Dickeya solani*



# Odmiany ziemniaka

Odporne

Humalda

Bea



Podatne

Katahdin

Ulster Supreme

Irys



# Diploidalne klony *Solanum* spp.

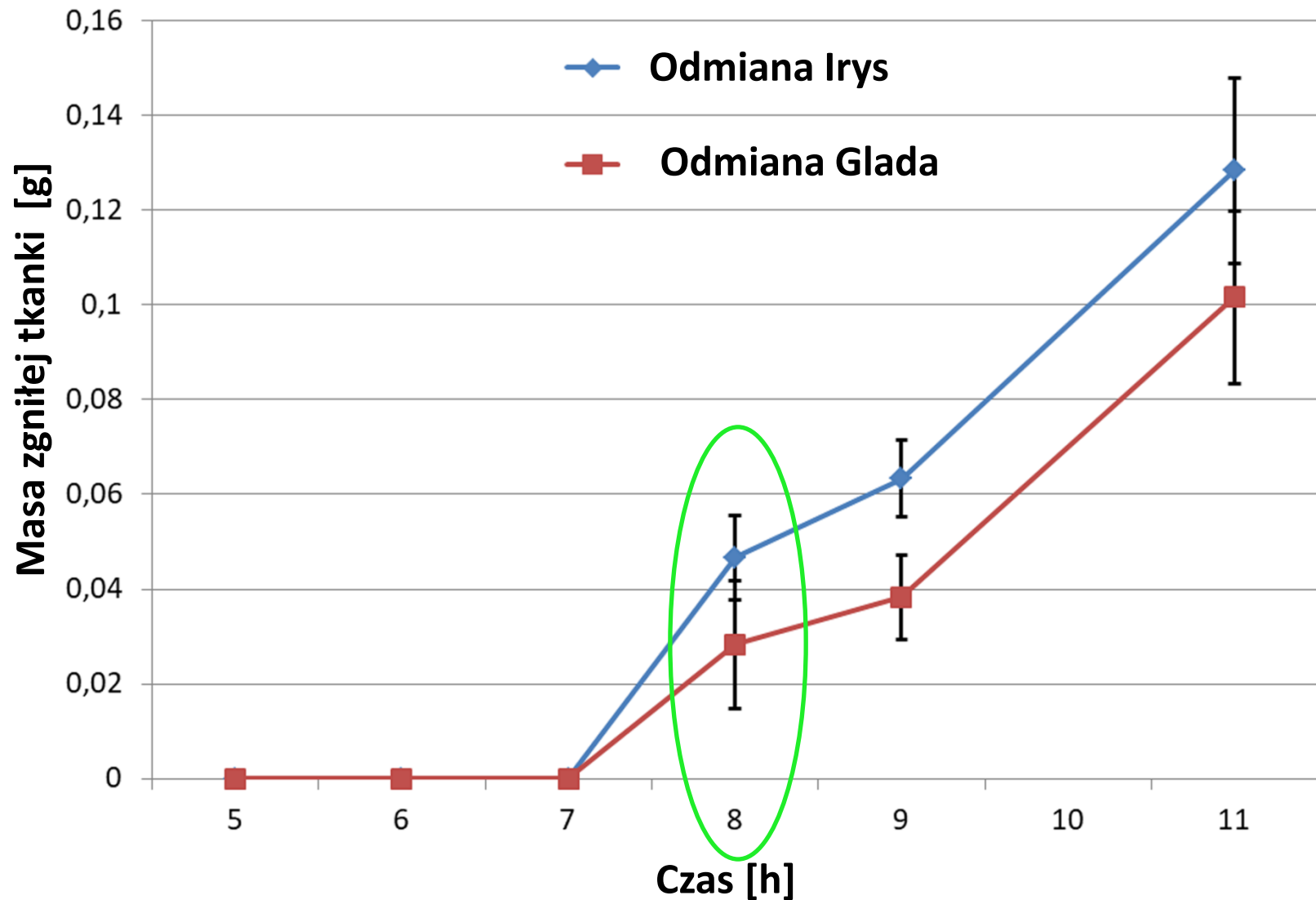
Odporny DG 00-270



Podatny DG 08-305

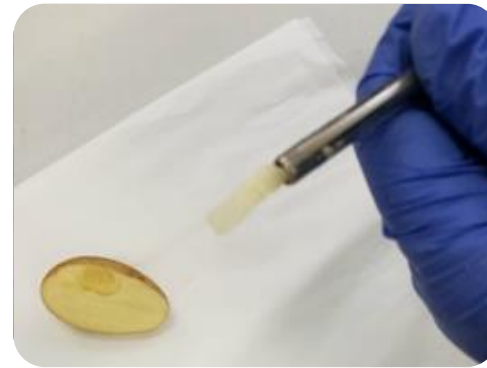


# Średnia ocena gnicia bulw ziemniaka (N=6) po inokulacji bakteriami *Dickeya solani*





# Pobieranie prób (ok. 250 mg; $\varnothing$ 4 )



## Liofilizacja



# Izolacja białka

Zлиофилizowany fragment bulwy

wodorowęglan amonu

Siarczan dodecylu sodu SDS

Sonifikacja

Wodorowęglan amonu

Wirowanie

Pomiar spektrofotometryczny

200 µg białka + wodorowęglan  
amonu

Aceton

Inkubacja

Mocznik + wodorowęglan amonu

Woda

Pomiar spektrofotometryczny

50 µg białka + wodorowęglan  
amonu

Lys-C

Inkubacja

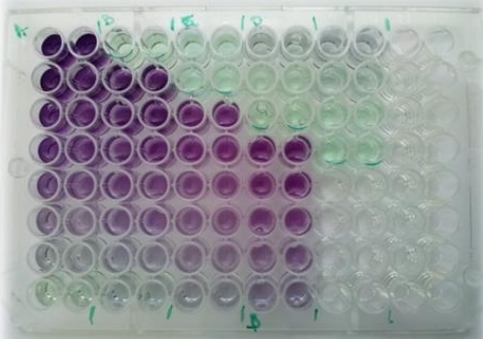
TCEP

Inkubacja

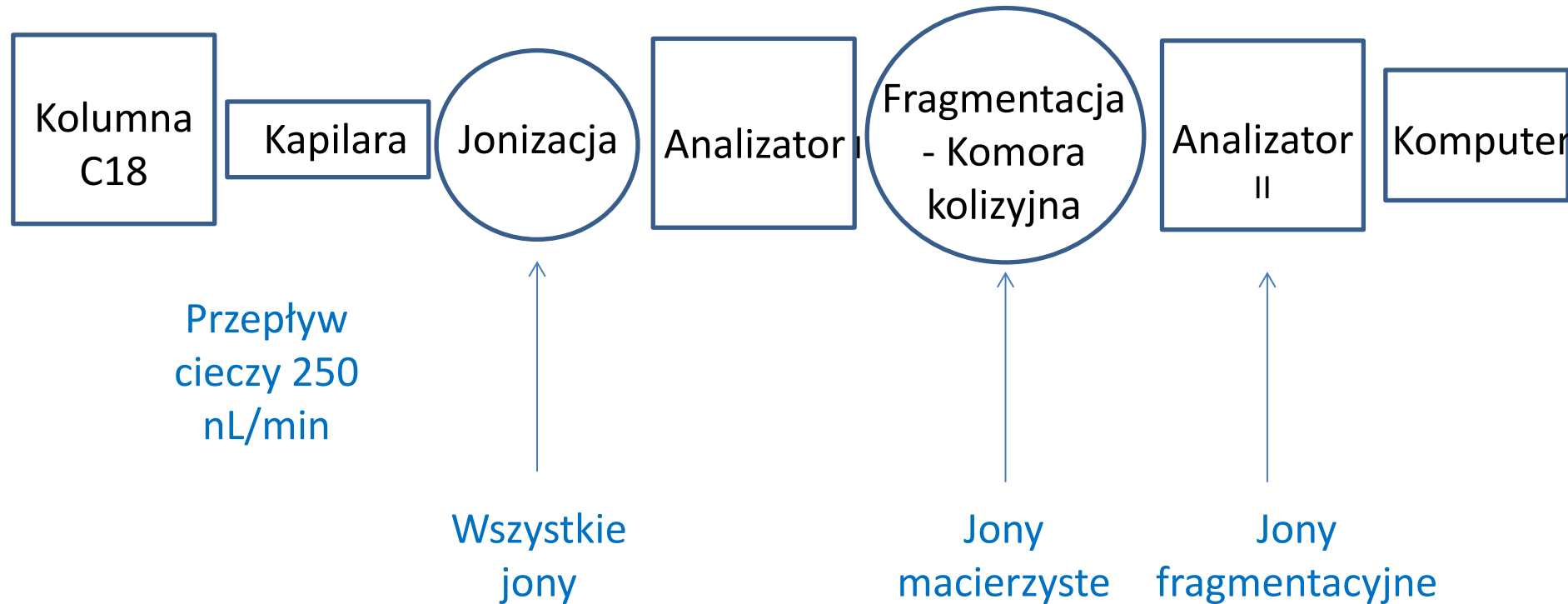
MMTS i trypsyna

Inkubacja

TFA

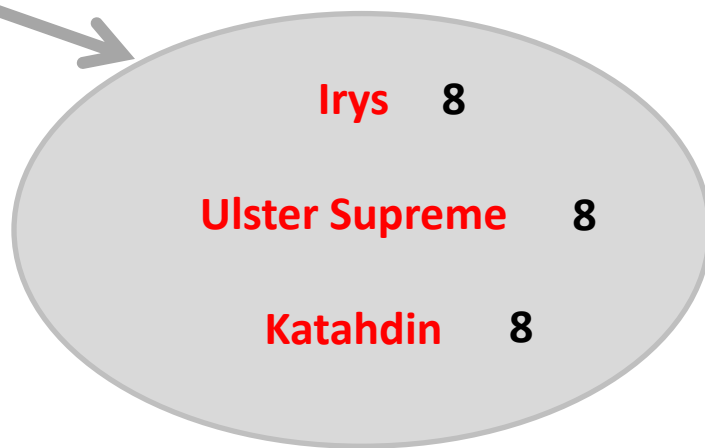
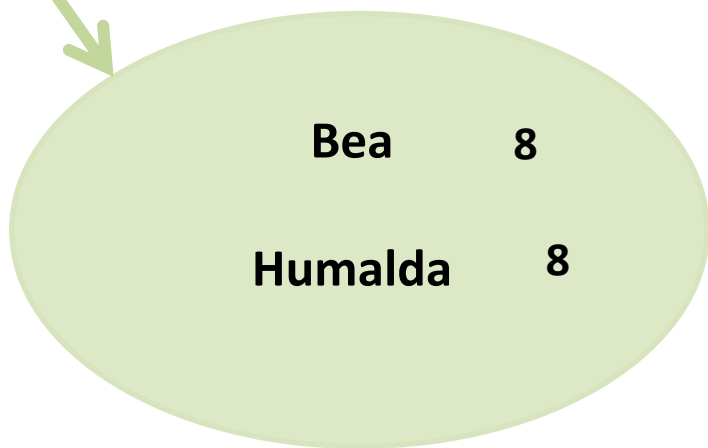


# Identyfikacja białek nano-LC-MS -MS/MS (Nano-Acquity LC + spektrometr mas Q-Exactive)



- ✓ porównanie uzyskanych mas peptydów i ich fragmentów z bazą danych sekwencji białkowych
- ✓ analiza statystyczna wiarygodności uzyskanych przypisań i ustalenie listy białek obecnych w próbce
- ✓ porównania różnic w profilach białkowych kombinacji doświadczenia

Inokulowane <i>D. solani</i>		„Inokulowane” wodą		Nieinokulowane	
Odporne	Podatne	Odporne	Podatne	Odporne	Podatne
Bea, Humalda	Irys Katahdin Ulster Supreme	Bea, Humalda	Irys Katahdin Ulster Supreme	Bea, Humalda	Irys Katahdin Ulster Supreme





Zwiększenie ilości białka w grupie odpornych odmian ziemniaka  
w porównaniu do grupy odmian podatnych 8 h po inokulacji  
*Dickeya solani* (q <0.1)

Nazwa	Nieranione		Inokulowane <i>D. solani</i>		„Inokulowane” wodą	
	Krotność zmiany #peptydów		Krotność zmiany #peptydów		Krotność zmiany #peptydów	
Syntaza tiamino-tiazolowa	1.6	14	4.6	14	2.3	12
Inhibitor proteiny PTI	1.4	10	4.1	22	2.7	21
Inhibitor proteiny typ-2	12.4	21	106.7	46	66.9	44
Prawdopodobnie nieaktywna patatyna-03- Kuras 1	6.9	150	7.6	198	4.4	192
Inhibitor chymotrypsyny, podjednostki I, A, B, C	5.6	12	12.4	12	13.9	12
Patatyna-03, -05, -07	2.1	121	1.9	160	2.1	165

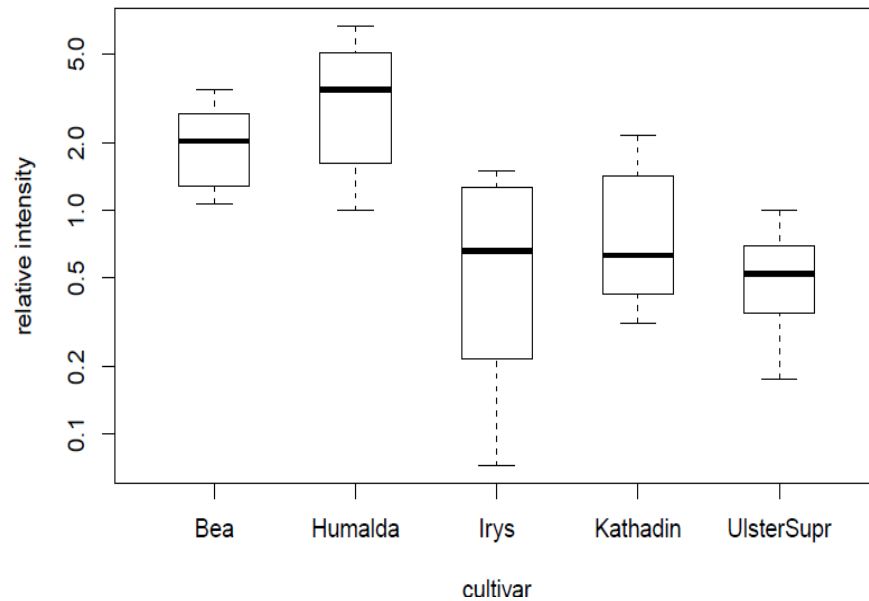
Zwiększenie ilości białka w odpornych odmianach ziemniaka w  
porównaniu do grupy odmian podatnych 8 h po inokulacji  
*Dickeya solani* ( $q < 0.1$ )

Nazwa	Odmiana	Inokulowane <i>D. solani</i>		„Inokulowane” wodą	
	Nazwa	Krotność zmiany #peptydów		Krotność zmiany #peptydów	
Inhibitor proteiny typ 2	Bea	3.3	18	3.3	19
	Humalda	<b>284.8</b>	46	<b>173.9</b>	42
<b>Prawdopodobnie nieaktywna patatyna- 03-Kuras 1</b>	Bea	<b>2.2</b>	192	1.7	171
	Humalda	<b>20.8</b>	198	<b>12.4</b>	190
Syntaza tiamino-tiazolowa	Bea	3.3	14	2.3	12
	Humalda	<b>9.7</b>	14	2.9	12
<b>Inhibitor proteiny PTI</b>	Bea	<b>3.2</b>	22	<b>2.9</b>	21
	Humalda	<b>4.3</b>	22	3.4	21
Inhibitor chymotrypsyny, podjednostki I, A, B, C	Bea	17.3	8	1.1	9
	Humalda	<b>19.5</b>	12	39.3	12
Patatyna-03, -05, -07	Bea	0.8	73	1.9	153
	Humalda	<b>3.2</b>	77	<b>3.2</b>	77

8 h

## Inhibitor proteiny PTI

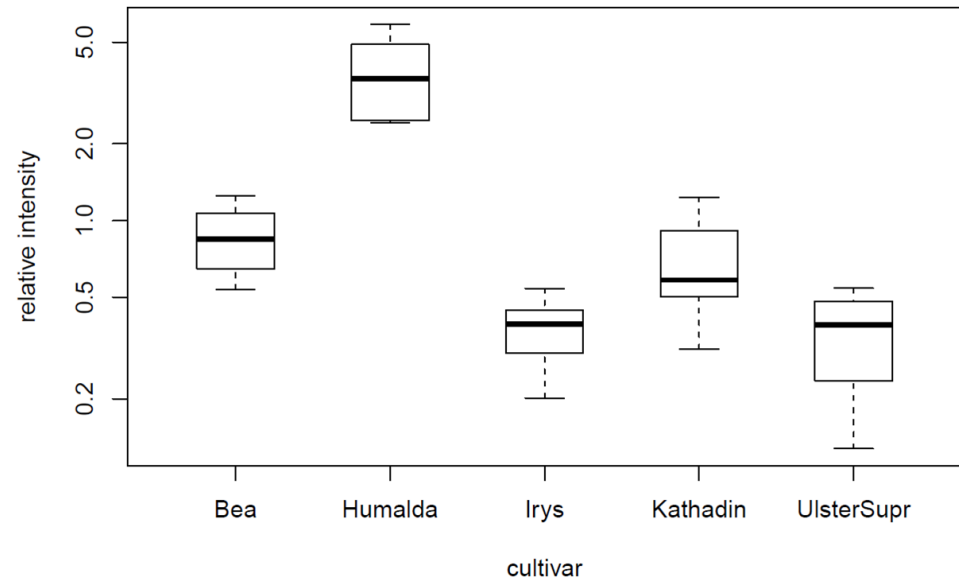
P01079: Proteinase inhibitor PTI (bacteria, 8h)



Translacja, przetwarzanie i degradacja białek

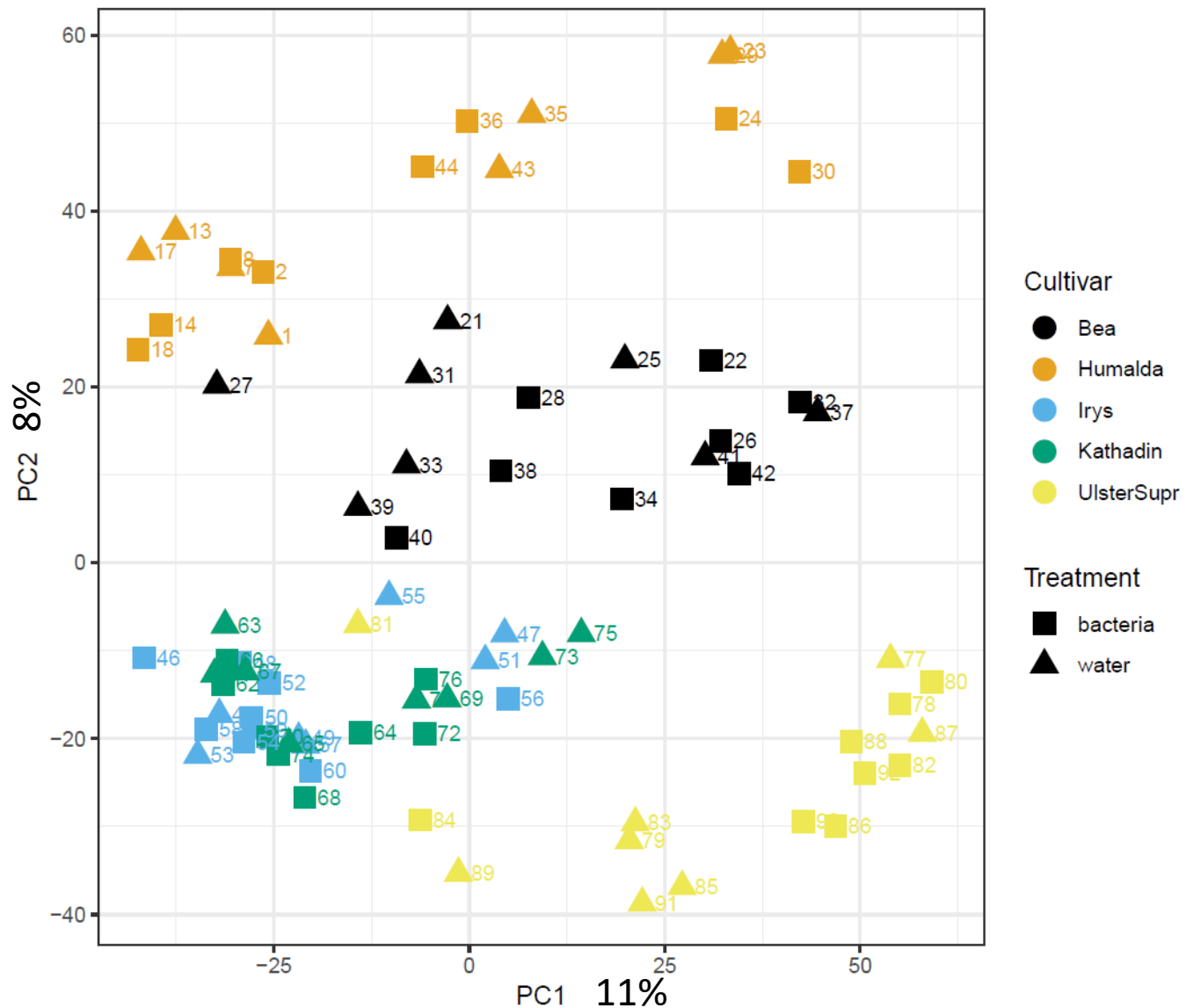
## Prawdopodobnie nieaktywna patatyna-3-Kuras 1

Q3YJS9: Probable inactive patatin-3-Kuras 1 (bacteria, 8h)



Odporność na stresy abiotyczne i biotyczne

# Analiza głównych składowych 8 h po inokulacji (PCA)





Zwiększenie ilości białka w odpornym mieszańcu *Solanum* spp.,  
klonie DG 00-270, w porównaniu do podatnego klonu DG 08-305 –  
8 h po inokulacji *Dickeya solani* ( $q < 0.1$ )

Nazwa	Nieranione		Inokulowane <i>D. solani</i>		„Inokulowane” wodą	
	Krotność zmiany #peptydów		Krotność zmiany #peptydów		Krotność zmiany #peptydów	
<b>Inhibitor metalokarboksypeptydazy</b>	1.06	9	<b>274.4</b>	22	<b>165.5</b>	22
<b>Przypuszczalnie inhibitor metalokarboksypeptydazy</b>	<b>49.1</b>	7	<b>368.6</b>	16	<b>130.7</b>	16
Prawdopodobnie nieaktywna patatyna- 03-Kuras 1	<b>2.4</b>	130	<b>3.0</b>	119	<b>4.3</b>	116
<b>Inhibitor proteiny typ 2</b>	1.1	22	<b>15.3</b>	22	<b>17.7</b>	25
Podobny do: białko STH-2 związane z patogenezą	0.9	81	<b>1.9</b>	57	<b>1.6</b>	73
<b>Glutaredoksyna</b>	1.6	24	<b>2.3</b>	19	<b>3.9</b>	20
Inhibitor proteiny indukowany zranieniem	0.8	76	<b>13.3</b>	72	<b>29.8</b>	74
<b>Podobny do: oksydazy polifenolowej B</b>	<b>3.2</b>	19	<b>3.4</b>	27	1.5	25
Patatyna-01	1.8	5	<b>6.8</b>	7	<b>9.6</b>	7
<b>17-3 kDa białko szoku cieplnego klasa II</b>	1.1	61	<b>3.6</b>	55	<b>5.1</b>	55

# Podsumowanie

❑ Znaleziono różnice w ekspresji białek pomiędzy odpornymi a podatnymi na mokrą zgniliznę bulw odmianami ziemniaka i klonami diploidalnymi *Solanum* - 8 h po inokulacji bakteriami *Dickeya solani*.

❑ Dwa białka:

- prawdopodobnie nieaktywna patatyna-03-Kuras 1,
  - inhibitor proteiny PTI,
- występują w istotnie większej ilości po infekcji bakteriami w obu odpornych odmianach.

# Podsumowanie

❑ Większość wykrytych białek różnicowych, występuje zarówno w bulwach nieinokulowanych uszkodzonych mechanicznie jak i ranionych inokulowanych bakteriami.

❑ Dwa białka

- inhibitor metalokarboksypeptydazy
- przypuszczalnie inhibitor metalokarboksypeptydazy

wykazały wyższy przyrost,

274- i 369-razy, odpowiednio – po inokulacji bakteriami,

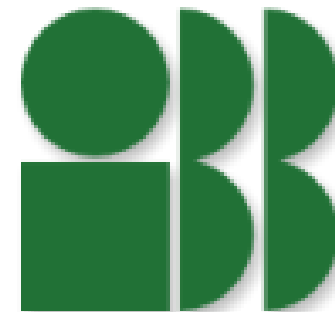
165- i 131-razy, odpowiednio – po pozorowanej inokulacji.

# Podsumowanie

- ❑ Wyniki wskazują na różnice w sposobie obrony na wczesnym etapie infekcji w bulwach ranionych bakteriami, w odmianach i mieszańcach międzygatunkowych ziemniaka, charakteryzujących się różnym poziomem odporności bulw na te bakterie.



## Podziękowania



Projekt finansowany przez

**Ministerstwo Rolnictwa i Rozwoju Wsi**

w ramach badań podstawowych na rzecz postępu biologicznego  
w produkcji roślinnej  
- Temat nr 56