

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:** *Dickeya solani* (Wolf et al., 2014) to nowy w Polsce gatunek bakterii powodujący czarną nożkę 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, oraz zbadanie różnic w proteomie odmian o wspólnym pochodzeniu, o różnej odporności bulw na bakterie *D. solani*.

W 2016 r. celem pracy było: (a) Otrzymanie bulw i DNA populacji mapującej do identyfikacji genów/*loci* cech ilościowych odporności na bakterie *D. solani*, (b) ocena zdolności bakterii *D. solani* do kolonizacji roślin ziemniaka i bulw potomnych w następstwie sztucznego zakażenia sadzeniaków, (c) ocena odporności bulw na *D. solani* 25 odmian pochodzących od odmiany Katahdin. Określenie długości trwania wstępnej fazy infekcji i momentu rozpoczęcia fazy maceracji tkanki bulw ziemniaka po inokulacji bakteriami *D. solani*, (d) wystandaryzowanie sposobu przygotowania prób do badań proteomicznych i pilotażowe próby oceny proteomu.

(a) Rozmnożenie diploidalnej populacji mapującej i wyizolowanie DNA

Materiały i metody. Liście otrzymane z roślin, pojedynków populacji mapującej DG 00-270 x DG 08-305 zebrano i zamrożono w ciekłym azocie. DNA izolowano z użyciem zestawu DNeasy Plant Mini Kit firmy Qiagen metodą opisaną w instrukcji. Formy rodzicielskie populacji mapującej przetestowano na obecność organizmów kwarantannowych.

Wyniki. Wysiano 400 nasion populacji mapującej, otrzymano 240 siewek, wyizolowano DNA z liści 200 osobników, zebrano potomstwo bulwowe 220 osobników. Formy rodzicielskie były wolne od patogenów kwarantannowych (*Clavibacter michiganensis* subsp. *sepedonicus*, PSTVd).

Dyskusja. Przygotowano materiał do rozmnożenia wegetatywnego w celu uzyskania bulw do oceny fenotypowej odporności bulw na porażenie bakterią *D. solani*. Przygotowano DNA do genetycznej analizy Diversity Array Technology. Przygotowano formy rodzicielskie, wolne od patogenów kwarantannowych, do wprowadzenia do kultur *in vitro*.

Wnioski. W 2017 r. zostanie przeprowadzona pierwsza ocena fenotypowa odporności na bakterie *D. solani* bulw ziemniaka populacji mapującej. DNA populacji i form rodzicielskich zostanie wysłane do badań genetycznych. Klony rodzicielskie będą zabezpieczone *in vitro*.

(b) Badanie kolonizacji bakterii w roślinie podatnej i wysoko odpornej ziemniaka diploidalnego

Materiały i metody. Odmiana Irys, dwa klony diploidalne, DH 00-519 i klon DG 6-28. Bakterie szczep IFB 0099 *D. solani*.

Inokulację sadzeniaków 20 bulw na genotyp o danej koncentracji bakterii przeprowadzono metodą według Helias i in. (2000) z drobnymi modyfikacjami. Bakterie namnażano na pożywce LB przez 24 godziny. Podkiełkowane bulwy zanurzano w wodzie na 17 h w celu utworzenia się przetchlinek. Następnie bulwy inokulowano poprzez zanurzenie w zawieszynie bakterii, w podciśnieniu 0,1MPa przez 20 min. Zastosowano dwie zawiesziny bakterii o różnej koncentracji bakterii: 0,1 i 0,001 (OD przy długości fali 600 nm), co odpowiada ok. 10^8 i 10^6 jtk w 1 ml, odpowiednio. Bulwy po inokulacji pozostawiono do wyschnięcia przez 2 h a następnie posadzono w doniczkach i umieszczono w fitotronie w temperaturze 24°C i długości dnia 16 h. Doświadczenie przeprowadzono w dwóch terminach. Zbierano dolny, środkowy i górny odcinek łodygi 30, 60 i 126 dni po inokulacji (dpi), liście (zamrażano w ciekłym azocie) 126 dpi, stolony i bulwy 169 lub 190 dpi. Podziemne fragmenty tkanki roślinnej myto, dezynfekowano zewnętrznie (70% etanol 1 min, trzy razy w sterylizowanej wodzie po 1 min). Każdą próbę miażdżono w woreczkach do ekstrakcji BIOREBA za pomocą homogenizatora ręcznego. Na pożywkę selektywną CVP wysiewano rozcieńczony ekstrakt z roztartych w wodzie prób. Obecność charakterystycznych dołków obserwowano 2-3 doby po posiewie. DNA z prób zamrożonych izolowano zestawem Qiagen. Kontrolą negatywną były rośliny traktowane sterylizowaną wodą. Wyizolowane DNA testowano starterami SOL-C według Pritchard i in. (2013). Warunki testu: 30 s temp. 48°C, 10 min w temp. 95°C, 40 cykli po 15 s w temp. 95°C i 1 min. w temp. 55°C. Mieszanina reakcyjna: 25µL1 buforu TaqMan (300 nM startery, 100 nM próba,

0,1% $MgCl_2$, 200 μM dNTPs, 0,63 U TaqGold (Roche) and 1 μL (4%) DNA. Sekwencje użytych starterów: SOL-C - GCCTACACCATCAGGGCTAT, ACACTACAGCGGCATAAAC.

Wyniki. Obserwację wschodów roślin i objawów czarnej nóżki przeprowadzono trzy tygodnie po inokulacji. W pierwszym terminie doświadczenia, po zastosowaniu zawiesiny o niższej koncentracji bakterii, gniciu uległo po 7 bulw odmiany Irys i klonu diploidalnego DG 06-28 i jedna bulwa klonu DG 00-519. Po inokulacji zawiesiną bakterii o wyższej koncentracji, na 20 inokulowanych bulw każdego genotypu uległo gniciu 20 bulw odmiany Irys, 10 bulw klonu DG 06-28 i 5 bulw klonu DG 00-519. Na otrzymanych roślinach obserwowano objawy czarnej nóżki, gnicie łodygi, w 10/13 roślin odmiany Irys, 2/13 roślin klonu DG 06-28 i 4/19 roślin klonu DG 00-519. W drugim terminie doświadczenia, po zastosowaniu inokulum o niższej liczbie bakterii, gniciu uległo 19 i 17 bulw odmiany Irys i klonu DG 00-519 odpowiednio, natomiast otrzymano wszystkie 20 roślin klonu DG 06-28 z bulw, które nie uległy gniciu. Po inokulacji zawiesiną bakterii o wyższej koncentracji, na 20 inokulowanych bulw każdego genotypu uległo gniciu 17 bulw odmiany Irys, 10 bulw klonu DG 06-28 i 18 bulw DG 00-519. Kolejne obserwacje objawów otrzymanych roślin zakażanych w pierwszym terminie przeprowadzono 18 tygodni po inokulacji. W grupie roślin inokulowanych zawiesiną o koncentracji 10^6 jtk/ml obserwowano objawy na trzech roślinach odmiany Irys, o różnym nasileniu zasychania liści. Wśród 12 roślin DG 06-28 na jednej nie obserwowano żadnych objawów, na 7 roślinach bardzo słabe zasychanie wyłącznie na dolnych liściach, na dwóch roślinach stwierdzono więdnienie, a na jednej roślinie gniciu łodygi. Wśród 14 roślin DG 00-519 6 roślin całkowicie uschło, tylko dwie rośliny wykazywały zasychanie dolnych liści, pozostałe były prawie całkowicie zaschnięte. W grupie 10 roślin klonu DG 06-28 inokulowanych zawiesiną o koncentracji 10^8 jtk/ml (wyższa koncentracja bakterii) na 8 roślinach obserwowano lekkie zasychanie wierzchołków dolnych liści. W grupie 14 roślin klonu DG 00-519 pięć roślin wykazywało zasychanie dolnych liści a 9 był prawie całkowicie zaschniętych.

Obecność bakterii stwierdzono metodą Real-Time PCR w 2 z 8 testowanych bulw z 8 roślin klonu DG 06-28 po zakażeniu zawiesiną o niższej koncentracji bakterii oraz w 3 z 5 testowanych stolonów tego genotypu. Z 9 roślin DG 06-28 zakażanych zawiesiną o wyższej koncentracji dwie wykazały progową obecność bakterii w bulwach. Sygnał obecności bakterii w stolonach obserwowany był w 5 stolonach z 9 badanych roślin klonu DG 06-28. Wysokie wartości cyklu progowego mogą świadczyć o bardzo niskiej koncentracji bakterii w badanej próbce. Średnie wartości C_t dla DNA izolowanego z bakterii *D. solani* wynosiły od 22,0 do 24,0.

Klon DG 00-519 miał w badaniu fragmenty 4 roślin pochodzących z bulw zakażanych inokulum o różnej koncentracji bakterii. W łodydze i liściach jednej rośliny stwierdzono słaby sygnał obecności bakterii po 126 dniach od infekcji przy niższej koncentracji bakterii. Natomiast przy wyższej koncentracji sygnał obecności bakterii wykryto w liściach dwóch z czterech badanych roślin. Dwie bulwy pochodzące z dwóch roślin klonu DG 00-519 zakażanych obydwoma zawiesinami, były wolne od bakterii. W tym genotypie nie stwierdzono występowania bakterii w łodygach testowanych 30, 60 dpi. Klon ten również nie zawiązał bulw w 6 z 8 badanych roślin.

Nie stwierdzono obecności bakterii w łodygach i liściach w jednej roślinie Irys otrzymanej z bulwy zakażanej zawiesiną o niższej koncentracji bakterii, natomiast w 2 z 7 bulw testowanych pochodzących z tej rośliny stwierdzono obecność bakterii. Obserwowano sporadyczne pojawianie się sygnału progowego w 35 cyklu PCR, w jednym, dwóch a rzadko w trzech powtórzeniach technicznych.

Po 60 dniach od inokulacji nie stwierdzono obecności bakterii pektynolitycznych na pożywce selektywnej. 162 dni po inokulacji stwierdzono obecność bakterii w łodygach zebranych z jednej rośliny DG 06-28 zakażanej zawiesiną 10^6 jtk/ml.

Dyskusja. Głównym źródłem porażenia roślin ziemniaka czarną nóżką są sadzeniaki zainfekowane latentnie (Perombelon, 1974). Takie sadzeniaki ulegają gniciu w glebie, uwalniając do gleby bakterie, które mogą kolonizować roślinę, jak również bulwy potomne (Czajkowski i in., 2010). Do badań zostały wybrane dwa diploidalne mieszańce międzygatunkowe ziemniaka, które w ocenie odporności na czarną nóżkę w teście szklarniowym po inokulacji łodygi wykazywały się istotnie mniejszym nasileniem objawów porażenia niż odmiany ziemniaka. Doświadczenie prowadzono w dwóch terminach w odstępie dwutygodniowym. W każdym terminie inokulowano bulwy dwiema zawiesinami o różnej koncentracji bakterii *D. solani*. Obserwowano różnice we wschodach roślin. W pierwszym terminie były one słabsze w przypadku zastosowania zawiesiny o wyższej koncentracji bakterii. W drugim terminie różnice nie były aż tak wyraźne. Na przykład w pierwszym terminie badań przy zastosowaniu zawiesiny o wyższej koncentracji obserwowano brak wschodów wszystkich 20 inokulowanych bulw odmiany Irys, podczas gdy przy zastosowaniu zawiesiny o niższej koncentracji bakterii obserwowano wschody 13 roślin z 20 posadzonych bulw, z których 10

wykazywało objawy gnicia podstawy łodygi – objawy czarnej nóżki. Klony diploidalne charakteryzowały się lepszymi wschodami roślin i mniejszą liczbą roślin z objawami czarnej nóżki niż odmiana Irys. Liczba roślin bez objawów czarnej nóżki klonu DG 06-28 wynosiła 11 i 10 (zakażanych zawiesiną o niższej i wyższej koncentracji odpowiednio) a klonu DG 00-519 odpowiednio 15 i 13 roślin. Obserwacje wschodów w drugim terminie zakażenia różniły się od pierwszego. Otrzymano 20 i 12 roślin bez objawów czarnej nóżki klonu DG 06-28 (zakażanych zawiesiną o niższej i wyższej koncentracji odpowiednio). Klon DG 00-519 uległ silniejszemu porażeniu, otrzymano wschody jedynie trzech roślin, w tym dwie rośliny były bez objawów. Z bulw odmiany Irys wyrosły dwie rośliny bez objawów czarnej nóżki po zakażeniu sadzeniaków zawiesiną o niższej koncentracji, natomiast w ogóle nie wyrosły rośliny z bulw po zakażeniu zawiesiną o wyższej koncentracji bakterii.

Po powtórzeniu wybranych, budzących wątpliwości prób, pobranych ze stolonów i bulw, stosując wyjściową, nierozcieńczoną zawartość DNA w próbce, otrzymano różne wyniki. Tam, gdzie uprzednio obserwowano pojawianie się sygnału w 35 cyklu reakcji PCR tym razem takiego sygnału nie obserwowano, a w próbach w których nie obserwowano sygnału, pojawiły się sporadycznie sygnały w 35 cyklu. Pojedyncze pojawienie się sygnału w 35 cyklu obserwowano również w przypadku testowania liści ze zdrowych roślin rosnących w innym miejscu niż rośliny z doświadczenia (odmiany Nicola, King Edward). Wynik uznano za negatywny. Obecność bakterii potwierdzono wyłącznie

w przypadku badanego fragmentu stolonu klonu DG 06-28 zebranego 169 dpi.

W badaniach przeprowadzonych w 2015 r. (sprawozdanie 2015) inokulowano sadzeniaki dwóch odmian ziemniaka: Irys i Kondor, bakteriami *D. solani*. Infekcję latentną roślin stwierdzono w roślinach obu odmian. Wartość Ct wynosiła 23,1 i 19,9 w roślinach odmiany Irys wyrosłych po zakażeniu zawiesiną o 10^7 i 10^8 jtk/ml odpowiednio i 27,7 i 25,1 w roślinach odmiany Kondor, przy zawartości genomowego DNA 5ng/μl.

Wyizolowano bakterie z łodygi jednej rośliny DG 06-28 162 dpi, otrzymanej po zakażeniu zawiesiną o niższej koncentracji bakterii. Roślina ta nie była badana testem PCR, a w stolonie i bulwie pochodzących z tej rośliny nie wykryto bakterii testem real time PCR.

Izolat bakterii *D. solani* użyty do inokulacji bulw matecznych, IFB0099, charakteryzuje się wysoką agresywnością (Golanowska i in., 2015). Z innych badań wiadomo, że po zakażeniu latentnym mogą być porażone wszystkie części rośliny: łodygi, liście, stolony, korzenie i bulwy potomne,

a koncentracja bakterii jest niska, rzadko przekracza 1000 komórek w 1 g tkanki. W łodygach najwięcej bakterii lokuje się w dolnym 15-20 cm odcinku powyżej bulwy, natomiast w bulwach więcej bakterii jest w okolicy stolonu (Helias i in., 2000; Czajkowski i in., 2009). Dlatego w naszych badaniach testowano różne fragmenty rośliny a także część stolonową bulw.

Wnioski. Diploidalne mieszańce międzygatunkowe w mniejszym stopniu uległy całkowitemu porażeniu od odmiany Irys. W roślinach, które wyrosły z porażonych sadzeniaków, wykryto w pojedynczych przypadkach obecność bakterii. Wyniki posiewu na selektywną pożywkę większości testowanych fragmentów roślin potwierdziły brak porażenia latentnego. Tylko z jednej próby udało się wyizolować bakterie. Występujące objawy zasychania końców liści mogą wskazywać na reakcję obronną rośliny w postaci nekrotyzacji tkanki roślinnej. Otrzymane bulwy klonu DG 06-28 zostaną posadzone w kolejnym sezonie w celu sprawdzenia roślin pod kątem obecności bakterii *D. solani*.

Literatura

- Czajkowski, R., Grabe, G. J., van der Wold, J. M. (2009). Distribution of *Dickeya* spp. and *Pectobacterium carotovorum* subsp. *carotovorum* in naturally infected seed potatoes. *European Journal of Plant Pathology*, 125: 263–275.
- Czajkowski R, De Boer WJ, Velvis H, van derWolf JM, 2010. Systemic colonization of potato plants by a soilborne green fluorescent protein-tagged strain of *Dickeya* sp. biovar 3. *Phytopathology* 100, 134–42.
- Golanowska, M., Galardini, M., Bazzicalupo, M., Hugouvieux-Cotte-Pattat, N., Mengoni, A., Potrykus, M., Sławiak, M., Łojkowska, E. (2015). Draft genome sequence of a highly virulent strain of the plant pathogen *Dickeya solani*, IFB0099. *Genome Announcements*, 3(2),e00109-15. doi:10.1128/genomeA.00109-15.
- Helias, V., Andrivon, D., Jouan, B. (2000). Internal colonization pathways of potato plants by *Erwinia carotovora* ssp. *atroseptica*. *Plant Pathology* 49: 33–42.
- Perombelon, M.C.M., 1974. The role of the seed tuber in the contamination by *Erwinia carotovora* of potato crops in Scotland. *Potato Research* 17, 187–99.

Pritchard L, Humphris, S., Saddler, G.S., Parkinson, N.M., Bertrand, V., Elphinstone, J.G., Toth, I.K. 2013. Detection of phytopathogens of the genus *Dickeya* using a PCR primer prediction pipeline for draft bacterial genome sequences. Plant Pathology 62: 587–596

(c)

- **Rozmnożenie materiału i testowanie reakcji bulw ziemniaka 25 odmian ziemniaka na inokulację bakterią *Dickeya solani*.**

Materiały i metody. Materiałem badanym było 28 odmian ziemniaka: 25 odmian ziemniaka pochodzących od odmiany Katahdin, oraz odmiany Katahdin, Irys i Głada. Odmiany rozmnażano w tunelu w rękawach ogrodniczych.

Ocenę odporności bulw prowadzono metodą punktowej inokulacji bulw opisaną w sprawozdaniu 2014. http://www.ihar.edu.pl/lp_w_zal_do_rozporzadzenia_mrirw_56.php?panel=1

W każdym z dwóch terminów testowano po 12 bulw każdej odmiany w dwóch powtórzeniach. Metody statystyczne: do analizy ocen porażenia bulw zastosowano dwuczynnikową analizę wariancji, oraz test Tuckey’a do uszeregowania średnich (STATISTICA).

Wyniki. Przeprowadzono dwuczynnikową analizę wariancji otrzymanych wyników porażenia bulw 28 odmian ziemniaka przez bakterie gatunku *D. solani*, szczepu IFB0099. Miara porażenia była masa zgniłej tkanki bulwy. Analiza wariancji wykazała brak istotnego wpływu terminu testowania, istotny wpływ odmiany i interakcji odmiana x termin. Średnia porażenia 25 odmian pochodzących od odmiany Katahdin wynosiła 1,2 g, zakres porażenia wynosił 0,2 g – 3,3 g. Średnia porażenia odmiany Katahdin wynosiła 1,9 g, średnioodpornej odmiany Głada 4,7 g, a podatnej odmiany Irys 13,2 g.

Dyskusja. Zarówno odmiana Katahdin jak i wszystkie pochodzące od niej odmiany ziemniaka charakteryzują się wyższym poziomem odporności od podatnej odmiany wzorcowej Irys i średnioodpornej odmiany Głada. Wąski zakres zmienności odporności odmian potomnych jak i wpływ innych czynników na ekspresję odporności utrudnia uszeregowanie odmian względem tej cechy. Należy uwzględnić wydłużenie okresu testu lub zwiększenie koncentracji inokulum, aby uszeregować badane odmiany o podniesionym poziomie odporności.

Wnioski. Test oceny odporności powinien być powtórzony w kolejnym sezonie wegetacyjnym z uwzględnieniem zaostżenia warunków testu celem uszeregowania odmian odpornych. Do badań różnicowych proteomu wybrane będą odmiany pochodzące od odmiany Katahdin charakteryzujące się skrajną reakcją na porażenie przez bakterie *D. solani* oraz podatna odmiana Irys.

- **Określenie faz wzrostu bakterii *D. solani* w bulwach ziemniaka**

b) Określenie faz wzrostu bakterii *D. solani* w bulwach ziemniaka.

Materiały i metody. Odmiany ziemniaka: podatna odmiana Irys, średnio-odporna odmiana Głada. Bulwy ziemniaka inokulowano w sposób opisany w punkcie 3.3. Po dwie bulwy każdej odmiany krojono co godzinę (ostatni raz po dwóch godzinach), przez 7 godzin, zaczynając 5 h po inokulacji. Test powtórzono trzykrotnie.

Wyniki. Pierwsze symptomy porażenia bulw przez bakterie *D. solani* inokulowanych zawiesiną o koncentracji 10^8 jtk/ml w ilości 10 μ l i inkubowanych w temperaturze 26°C w warunkach wysokiej wilgotności obserwowano 8 godzin po inokulacji we wszystkich trzech terminach testu.

Dyskusja. W czasie wczesnej biotroficznej fazy infekcji bakterie pozostają nieaktywne, geny warunkujące produkcję enzymów degradujących ściany komórkowe są wyciszone (Toth i Birch, 2005). W tej fazie bakterie rozmnażają się, ale nie produkują enzymów, które mogłyby wywołać reakcję odpornościową (Sepulchre et al. 2007). Kiedy populacja bakterii odbierze sygnał, taki jak gęstość populacji (quorum sensing), składniki pektyn i ścian komórkowych, temperatura, brak pożywienia, geny warunkujące produkcję enzymów są wzbudzane (Sepulchre et al. 2007; Davidsson et al. 2013). Celem doświadczenia było ustalenie w warunkach doświadczalnych (temperatura 26°C, wysoka wilgotność) długości fazy bezobjawowej. Nie obserwowano objawów gnicia bulw 7 godzin po inokulacji. Pierwsze objawy porażenia zaobserwowano 8 h po inokulacji niezależnie od poziomu odporności testowanych odmian. Irys i Głada różnią się poziomem odporności, Irys jest odmianą podatną, Głada średnio odporną. Wyniki te pozostają w zgodzie ze wcześniejszymi badaniami, w których bulwy ziemniaka tych samych odmian inokulowano zawiesiną w kolejnych rozcieńczeniach. Porażenie bulw ziemniaka zawiesiną o bardzo niskiej koncentracji, 12-160 jtk/ml, wystąpiło u obu testowanych odmian. Termin 48 h po inokulacji reprezentuje fazę objawową, został wybrany w celu możliwości porównania otrzymanych wyników z wynikami pracy Barzic i Com (2012), pierwszej pracy, w której badano proteom w bulwie ziemniaka po inokulacji bakteriami *Pectobacterium atrosepticum*.

Wnioski. Do badania ekspresji białek we wczesnej objawowej i późnej fazie infekcji próby będą pobierane 8 i 48 godzin po inokulacji.

Literatura

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

Davidsson, P. R. R., Kariola, T., Niemi, O. & Palva, T. (2013). Pathogenicity of and plant immunity to soft rot pectobacteria. *Frontiers in Plant Science*, 4, 191.

Sepulchre, J. A., Reverchon, S., & Nasser, W. (2007). Modeling the onset of virulence in a pectinolytic bacterium. *Journal of Theoretical Biology*, 244, 239–257.

Toth, I. K., & Birch, P. L. J. (2005). Rotting softly and stealthily. *Current Opinion in Plant Biology*, 8:424–429.

(d) Wystandaryzowanie sposobu izolacji białek i pobierania próbek. Pilotażowe próby oceny proteomu

Materiały i metody. Odmiany ziemniaka: podatna odmiana Irys, kontrolna odmiana Katahdin, 6 wybranych odmian pochodzących od odmiany Katahdin: najbardziej odpornych: Tarpan, Magura, Humalda, Bea i najmniej odpornych: Carpatin, Ulster Supreme z puli 25 odmian ocenianych w temacie (c). Metoda inokulacji została opisana w temacie (c). Próbki z bulw pobrano na granicy porażenia bulwy, z tkanki zdrowej, przy pomocy korkoboru. Następnie próbki zamrożono w ciekłym azocie i liofilizowano przez 72 godziny. Zastosowano dwie metody przygotowywania próbek do analizy proteomu metodą spektrometrii mas. W metodzie 1 trawiono białka bez lub po wytrącaniu acetonem.

Metoda 1. Zliofilizowane fragmenty bulw ziemniaka roztarto w probówkach Eppendorf. Następnie dodano do nich 15 µl 15 % deoksyholanu sodu (sodium deoxycholate, SDC) oraz 135 µl 25 mM wodorowęglanu amonu. Próby sonifikowano (Łaźnia sonifikacyjna Sonic-6, Polska) przez 10 minut. Dodano 100 µl 25 mM wodorowęglanu amonu, wymieszano i wirowano (wirówka Eppendorf Centrifuge 5424R, Niemcy) 10 minut przy 14 000 rpm. Supernatant przeniesiono do czystych probówek. Pobrano 5 µl supernatantu i rozcieńczono go 45 µl 25 mM wodorowęglanu amonu. Wykonano pomiar zawartości białka: zmieszano reagent A z reagentem B (Pierce™ BCA Protein Assay Kit, ThermoFisher Scientific) w stosunku objętościowym 50:1, na płytkę nakładano 20 µl rozcieńzonego supernatantu (każda próba w dwóch powtórzeniach), do każdego dołka z rozcieńczonym supernatantem dodano 200 µl mieszaniny reagentu A i B. Płytkę inkubowano przez 30 minut w 37 °C. Po tym czasie dokonano pomiaru spektrofotometrycznego przy długości fali 560 nm. Z nierozcieńczonych supernatantów przeniesiono do nowych probówek ilość supernatantu odpowiadającą 200 µg białka (**odczytaną z krzywej wzorcowej**) i uzupełniono do 100 µl 25 mM wodorowęglanem amonu. Dodano 1 ml zimnego acetonu i inkubowano przez 30 minut w – 20 °C. Po tym czasie próby wirowano 10 minut przy 14 000 rpm. Aceton odpipetowano a osad zawieszono w 20 µl 100mM wodorowęglanie amonu i wymieszano. Do każdej z prób dodano 60 µl wody. Przygotowano próby do kolejnego pomiaru: przeniesiono do czystych probówek 5 µl supernatantu i dodano 45 µl 100 mM wodorowęglanu amonu. Pomiar przeprowadzono jak opisano powyżej. Z nierozcieńczonych supernatantów pobrano do nowych probówek ilość supernatantu odpowiadającą 50 µg białka i uzupełniono 25 mM wodorowęglanem amonu do 50 µl.

Dodano 1 µl 0,5 M TCEP (tris (2-carboxyethyl) phosphine, Pierce™ TCEP-HCl), próby inkubowano przez 20 minut w 60 °C. Dodano 3 µl 0,2 M MMTS (methyl methanethiosulfonate, Pierce™ MMTS) oraz 20 µl trypsyny (Trypsin Gold, Mass Spectrometry Grade, Promega) i inkubowano w 37 °C przez całą noc. Do prób dodano 2 µl 1 % TFA i zawieziono do analizy.

Metoda 2. Zliofilizowane fragmenty bulw ziemniaka roztarto w eppendorfach w temperaturze pokojowej. Dodano 15 µl 4 % laurylosiarczanu sodu (sodium dodecyl sulfate, SDS) oraz 135 µl 25 mM wodorowęglanu amonu. Dalej postępowano z próbkami jak w metodzie 1. z tym, że po odpipetowaniu acetonu i wirowaniu osad zawieszono w 20 µl 8 M mocznika z 100 mM wodorowęglanem amonu i wymieszano. Po otrzymaniu próbek o zawartości 50 µg białka do próbek dodano 20 µl 100 mM wodorowęglanu z 0,1 µg Lys-C (Endoproteinase Lys-C, Sequencing Grade, Promega) i inkubowano przez 90 minut w temperaturze pokojowej. Po inkubacji postępowano jak w metodzie 1. Dodano TCEP, próby inkubowano, dodano MMTS i trypsynę, inkubowano, po inkubacji dodano TFA.

Wyznaczono krzywe wzorcowe Do oznaczania zawartości białka w próbce metodą BCA (Smith i in. 1985). Przygotowano roztwory wzorcowe BSA (Bovine Serum Albumin Standard, Pierce) o stężeniu: 0, 25, 125, 250, 500, 750, 1000, 1500 i 2000 µg/ml. Pomiaru spektrofotometrycznego dokonywano przy długości fali 560 nm.

Do analizy danych stosowano program Mascot, MaxQuant, Perseus, Scaffold. Korzystano z bazy Uniprot, IPI.

Wyniki. Przygotowano i wysłano 140 prób białka do analizy proteomu metodą spektrometrii mas. Porównano dwie metody przygotowywania próbek bulw do badań białek metodą spektrometrii mas. Porównano wynik 16 prób badanych metodą 1 i 39 metodą 2. Przy użyciu obu metod zidentyfikowano dużą liczbę białek. Średnio w pierwszej metodzie otrzymano 1052 zidentyfikowane białka w próbce, zakres wynosił od 658 do 1278. W przypadku metody drugiej średnia wynosiła 1225 białek, zakres od 871 do 1720.

Zmienność współczynników korelacji Pearsona dla znormalizowanych intensywności sygnałów (ang. Label free quantification, LFQ intensity) próbek w obrębie tej samej bulwy, analizowana na podstawie wyników 12 próbek pobranych z trzech bulw odmiany Ulster Supreme 48 godzin po inokulacji wynosiła 0,95-0,96, pomiędzy bulwami 0,93-0,95.

Zmienność prób pobranych z bulw odmian Irys i Humalda 48 godzin po inokulacji bakteriami *Dickeya solani* lub traktowanych wodą wynosiła 0,78; zmienność prób odmiany Irys z bulw zakażonych bakteriami i traktowanych wodą wynosiła 0,87 a u odmiany Humalda 0,93. Zmienność współczynników korelacji Pearsona dla prób izolowanych w różnych terminach wynosiła od 0,89 do 0,94.

Wyróżniono 65 białek różnicujących z bulw odmiany Humalda 48 godzin po inokulacji bakteriami *Dickeya solani* i traktowaniu wodą.

Dyskusja. Właściwe przygotowanie próbki do analizy białek jest kluczowe do otrzymania wyników dobrej jakości. Protokoły stosowane do izolacji i rozdzielania białek są specyficzne dla danej próby (Łuczak i in. 2009). We współpracy z dr Janem Dębskim, specjalistą od metody oznaczania białek metodą spektrometrii mas w IBB-PAN, sprawdzono dwie metody przygotowywania prób białek, z tkanki bulwy ziemniaka. Z pobranej próby należy usunąć zanieczyszczenia i niepożądane składniki. Pierwszym etapem przygotowywania prób było zamrożenie w ciekłym azocie fragmentów tkanki pobranej z bulwy ziemniaka, zliofilizowanie próbki, homogenizacja, rozcieranie w moździerzu ceramicznym w celu rozbicia komórek i traktowanie deoksycholanem sodu lub laurylosiarczanem sodu, które efektywnie denaturują białka, pozbawiając większość aktywności enzymatycznej, m. in. proteaz, fosfataz itp. Obydwa związki są detergentami, które w reakcji z białkami tworzą kompleksy lepiej rozpuszczalne w wodzie i trudniej ulegające hydrolizie enzymatycznej. Detergenty zrywają również oddziaływania między lipidami i białkami. W innych badaniach detergenty SDS i SDC były najlepszymi odczynnikami do lizy komórek w kombinacji z trawieniem białek (Scheerlinck i in. 2015). Zastosowany wodorowęglan amonu buforuje białka. Sonifikacja rozbija sztywne lub duże struktury, jak błony komórkowe, chromatynę, rozdrabnia je i uwalnia białka z nimi związane.

Białka zagęszczano przy użyciu wirowania i acetonu, który selektywnie wytrąca białka. Peptydy połączone mostkiem siarczkowym nie są identyfikowane w analizie spektrometrii mas, dlatego do redukcji mostków siarczkowych użyto TCEP a do blokady zredukowanych grup tiosiarczkowych użyto MMTS, aby zapobiec odtwarzaniu wiązań. W metodzie 1 trawienie przeprowadzono z użyciem trypsyny, która hydrolizuje wiązania peptydowe pomiędzy lizyną lub arginina a innym dowolnym aminokwasem po stronie karbonylowej zasadowego aminokwasu, a w metodzie 2 trawiono z użyciem lys-C, która hydrolizuje peptydy w miejscach lizyny, a następnie trypsyny.

Do pomiaru zawartości białka w próbce zastosowano metodę BCA (Smith i in. 1985). W metodzie tej kwas bicinechinowy (BCA), sól sodowa, rozpuszczalna w wodzie, wchodzi w reakcję

z jonami miedzi tworząc purpurowe kompleksy w środowisku zasadowym. Intensywność zabarwienia wzrasta wraz z koncentracją białka w próbce. W porównaniu z metodą oceny białek według Lowry'ego i innych, metoda BCA ma większą tolerancję użytego kwasu do detergentów (toleruje 5% SDS i SDC) i buforów (Smith i in. 1985).

Oceniono zmienność intensywności zidentyfikowanych białek w próbkach tej samej bulwy. Średnie współczynników korelacji Pearsona były bardzo wysokie, wynosiły 0,95 lub 0,96, podobnie średnie wyników porównywanych pomiędzy bulwami wynosiły od 0,93 do 0,95. Wyniki świadczą o dużej powtarzalności pomiarów, bardzo dobrym przygotowaniu prób do badania HPLC-spektrometrią mas.

Porównano zmienność pomiędzy dwoma terminami izolowania białek: średnie współczynników korelacji dla próbek pobranych z bulw porażonych bakteriami wynosiły 0,89; 0,91 i chociaż były niższe niż średnie próbek traktowanych wodą, 0,93; 0,94, to były wysoko skorelowane.

Porównano tą samą metodą zmienność pomiędzy testowanymi odmianami: średnio współczynnik korelacji prób pobranych z odmiany Irys i Humalda wynosił 0,78 (niezależnie od sposobu traktowania). Wyniki świadczą o znacznych różnicach w proteomach tych odmian.

Interesujące wydają się wyniki dla porównania próbek pobranych z bulw traktowanych wodą i bakteriami. W przypadku odmiany Irys różnice są większe, średnia dla współczynnika korelacji

wynosi 0,87 (zakres od 0,82 do 0,92), podczas gdy próby pobrane z odmiany Humalda były bardziej do siebie podobne, średnia wynosiła 0,93 (zakres 0,90 do 0,96).

Ze wstępnych badań na przykładzie odmiany Humalda wyróżniono 65 białek, z których kilka jest związanych z reakcją odpornościową rośliny. Praca ta jest w toku.

Większe obserwowane różnice na poziomie całkowitego proteomu, w wyniku inokulacji bakteriami w porównaniu do kontroli, obserwowane w odmianie Irys niż w Humaldzie prawdopodobnie wynikają z posiadanego mechanizmu odporności odmiany Humalda.

W przypadku odmiany Irys w wyniku infekcji, obserwujemy wzmożoną syntezę m.in. białek opiekuńczych (czaperonin i białek szoku cieplnego/stresu), o których wiadomo, że oddziałują ze sobą. Jednakże, wśród nich, nie udało się zidentyfikować białek posiadających aktywność enzymatyczną, która mogła by mieć własności anty-patogenne.

W przypadku Humaldy natomiast, obserwujemy mniejszą liczbę białek syntezowanych tylko w odpowiedzi na infekcję, nie poznane są ich interakcje. Jednakże białka, które są syntetyzowane w odpowiedzi na infekcję mają silne właściwości anty-patogenne w stosunku do *D. solani*. Są to m.in. dechitynazy oraz glikozydazy glukanów, które są odpowiedzialne za mechanizm patogenezy *D. solani*. Przypuszczalnie w odmianie Irys, będącej odmianą wrażliwą w efekcie infekcji obserwujemy stres komórkowy, angażujący wiele białek opiekuńczych czy strukturalnych, jednakże nie prowadzący do ekspresji białek mogących zwalczyć bakterie. Odmiana Humalda natomiast, można powiedzieć, że jest „przygotowana” do odpowiedzi na patogena. Bez konieczności uruchamiania złożonych sieci interakcji nowosyntezowanych białek, następuje produkcja białek przeciwdziałających infekcji jak np. odpowiedzialnych za gojenie ran.

Wnioski. Do dalszych badań wybrano metodę nr. 2 izolacji białek. Metoda ta wraz z procedurą pobierania prób okazała się wydajna i powtarzalna. Praca będzie kontynuowana.

Literatura

- Łuczak M., Figlerowicz M., Wojtaszek P. 2009. Aspekty metodyczne analiz proteomicznych z wykorzystaniem metod elektroforezy dwukierunkowej i spektrometrii mas. *Biotechnologia* 2: 7-26
- Scheerlinck E., Dhaenens M., Van Soom A, Peelman L., De Sutter P., Van Steendam K., Deforce D., 2015. Minimizing technical variation during sample preparation prior to label-free quantitative mass spectrometry. *Analytical Biochemistry* 490: 14-19
- Smith P.K., Krohn R.I., Hermanson G.T., Mallia A.K., Gartner F.H., Provenzano M.D., Fujimoto E.K., Goeke N.M., Olson B.J., Klenk D.C., 1985. Measurement of protein using bicinchoninic acid. *Analytical Biochemistry*, 150 (1) 76-85