

Białka różnicowe w bulwach odmian ziemniaka o różnym poziomie odporności na bakterie *Dickeya solani*

Renata Lebecka*, Zofia Murawska*, Katarzyna Szajko*, Janusz Dębski**, Michał Kistowski**, Waldemar Marczewski*

*Instytut Hodowli i Aklimatyzacji Roślin – Państwowy Instytut Badawczy, **Instytut Biochemii i Biofizyki Polskiej Akademii Nauk, Warszawa

Mokra zgnilizna bulw ziemniaka to choroba powodowana przez szereg gatunków bakterii pektynolitycznych należących do dwóch rodzajów: *Pectobacterium* i *Dickeya*. W czasie wegetacji bakterie mogą też wywołać chorobę zwaną czarną nóżką ziemniaka. Bakterie pektynolityczne są zdolne porażać wiele innych gatunków roślin. Bakteria gatunku *Dickeya solani* została po raz pierwszy wyizolowana z ziemniaka w Polsce w 2005 r. (Ślawiak i in. 2009), w latach 2009-2013 wykryto tę bakterię w uprawach ziemniaka w 11 województwach (Potrykus i in. 2016). Bakterie *Dickeya* spp. są bardziej agresywne od innych bakterii pektynolitycznych (Czajkowski i in. 2013). Straty ekonomiczne powodowane przez bakterie pektynolityczne to: obniżenie wielkości plonu bulw, utrata części plonu w czasie przechowywania lub wystąpienie czarnej nóżki w czasie sezonu wegetacyjnego. Do tego należy wspomnieć o znacznych kosztach związanych z degradacją plantacji nasiennych. Nie stosuje się ochrony chemicznej do zwalczania bakterii wywołujących choroby ziemniaka. Dlatego celem hodowców jest otrzymanie nowych odmian ziemniaka o podniesionej odporności bulw na bakterie pektynolityczne. Pierwsze badania molekularne dziedziczenia odporności bulw na bakterie *Pectobacterium atrosepticum* w populacji mapującej wykazały występowanie 10 istotnych loci cech ilościowych na 10 różnych chromosomach ziemniaka, które zmapowano przy użyciu 496 markerów RLFP i ALFP (Zimnoch-Guzowska i in., 2000). Wyniki te wskazują na złożony charakter cechy, warunkowanej wieloma czynnikami genetycznymi i środowiskowymi. Nie znaleziono skrajnej odporności w ziemniaku uprawnym i dzikich gatunkach *Solanum*. Odmiany ziemniaka różnią się między sobą pod względem liczby porażonych bulw i nasilenia objawów porażenia. Rozwojowi symptomów choroby sprzyja wysoka temperatura i niski poziom tlenu. Wraz z rozwojem technik identyfikacji białek, za pomocą czułych metod, oraz systematycznym poszerzaniem dostępnych baz danych białek *Solanum tuberosum* i roślin blisko spokrewnionych, w I HAR-PIB w oddziale w Młochowie podjęto badania nad odpornością ziemniaka na bakterie pektynolityczne na poziomie proteomu. Pierwsze badania proteomiczne bulw pochodzących z dwóch odmian ziemniaka, różniących się poziomem odporności na bakterię *Pectobacterium atrosepticum* przeprowadzono we Francji. Wykazały one obecność 13 białek różnicowych zidentyfikowanych 48 h po inokulacji wyłącznie w odmianie o wyższej odporności (Barzic i in. 2012). Do naszych badań wybrano odmiany ziemniaka o skrajnie różnej reakcji na porażenie przez wysokoagresywny izolat bakterii *D. solani* w warunkach sprzyjających rozwojowi choroby. Celem pracy było znalezienie różnic w ekspresji białek w odmianach ziemniaka o podwyższonej odporności na bakterię *Dickeya solani* w porównaniu z odmianami podatnymi, 8 i 48 godzin po inokulacji.

Analiza proteomiczna składa się z wielu etapów: przygotowania próbek do analizy, analizy próbek, identyfikacji białek i analizy statystycznej.

1) Przygotowanie próbek do analizy. Opracowano protokół izolacji białka z bulwy ziemniaka (Murawska i in., 2017). W trakcie izolacji całkowitą zawartość białka w próbce mierzono dwukrotnie metodą BCA (Smith i in., 1985), w oparciu o dwie krzywe wzorcowe, w celu otrzymania próbek o zawartości 50 µg białka. Białka trawiono za pomocą endoproteinazy Lys-C a następnie trypsyny.

2) Analiza próbek metodą wysokosprawnej chromatografii cieczowej sprzężonej z tandemowym spektrometrem mas (LC-MS/MS). Mieszanina peptydów uzyskana z każdej próbki jest mierzona przy pomocy spektrometru mas sprzężonego z chromatografem cieczowym. Wynikiem takiego pomiaru są widma przedstawiające masę mierzonych peptydów oraz ich intensywność. Dla najbardziej intensywnych peptydów wykonywany jest dodatkowy pomiar, polegający na fragmentacji peptydów, uzyskując w ten sposób dodatkowo widma fragmentacyjne. Widma fragmentacyjne pozwalają na ustalenie sekwencji aminokwasowej peptydu, a tym samym na identyfikację białka, z którego ten peptyd pochodzi.

3) Identyfikacja białek. Kolejny etap obejmuje analizę bioinformatyczną wyników uzyskanych ze spektrometru. Przy pomocy zestawu programów, na podstawie widm fragmentacyjnych, ustalana jest lista peptydów/białek obecnych w badanej próbce z *Solanum tuberosum* oraz ich względna intensywność. Następnie, listy peptydów są grupowane zgodnie z układem eksperymentu. Program Diffprot (Malinowska i in. 2012) porównuje grupy eksperymentalne pomiędzy sobą, obliczając zależności statystyczne i typując białka, których poziom ekspresji pomiędzy badanymi grupami zmienił się w sposób istotny statystycznie.

Na podstawie trzyletniej oceny porażenia bulw w testach laboratoryjnych (Lebecka, 2017) wybrano dwie odmiany o wyższej odporności (Bea i Humalda) i trzy odmiany o niższej odporności (Katahdin, Ulster Supreme i Irys). Doświadczenie prowadzono w dwóch terminach w odstępie jednego miesiąca, w marcu i w kwietniu, w dwóch latach badań. W pierwszym roku badań próbki pobierano 48, a w drugim roku 8 godzin po inokulacji. Bulwy inokulowano w świeżo zranioną tkankę, bulwy kontrolne były ranione i traktowane wodą. Bulwy po inokulacji zraszano wodą, umieszczano w zamkniętych pudełkach i przechowywano w temperaturze 26 °C. W czasie pobierania próbek bulwy krojono wzdłuż miejsca inokulacji, fragmenty tkanki pobierano za pomocą korkoboru wzdłuż miejsca inokulacji i mrożono w ciekłym azocie (Murawska i in. 2017). Pobierano od dwóch do czterech fragmentów każdej kombinacji doświadczenia.

Porównanie białek z bulw inokulowanych bakteriami *D. solani* z białkami bulw zranionych i traktowanych wodą. Przeprowadzono cztery porównania, dla każdej z grup odmian osobno, po 8 i 48 godzinach po inokulacji. Wyróżniono wyłącznie jedno białko różnicowe, peroksydazę, w grupie odmian odpornych, 48 godzin po inokulacji.

Porównanie białek z bulw odmian odpornych z podatnymi. We wczesnej fazie infekcji, 8 godzin po inokulacji, wyróżniono 4 białka (patatyny, inhibitory proteinaz i inhibitor chymotrypsyny), których ekspresja była istotnie wyższa w odmianach odpornych, w próbkach pobranych zarówno z bulw inokulowanych bakterią jak i traktowanych wodą. Wyższą ekspresją w odmianach odpornych, tylko po inokulacji, charakteryzowały się dwa białka, inhibitor proteinazy PTI i syntetaza tiaminowa. 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.

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 celu sprawdzenia czy różnice w białkach są powodowane przez uszkodzenia mechaniczne bulwy czy występują także w bulwach niezranionych pobrano próby z bulw nietraktowanych z doświadczenia 8 godzin po inokulacji. Analizy próbek są w trakcie realizacji.

- Barzic MR, 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
- Czajkowski R, De Boer WJ, Van der Zouwen PS, Kastelein P, Jafra S, de Haan EG, Van den Bovenkamp GW, Van der Wolf JM, 2013. Virulence of ‘*Dickeya solani*’ and *Dickeya dianthicola* biovar-1 and -7 strains on potato (*Solanum tuberosum*). Plant Pathol 62:597–610
- Lebecka R. 2017. Screening for potato resistance to blackleg and soft rot. Plant Breeding and Seed Science 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
- Murawska Z, Dębski J., Szajko K., Lebecka R. 2017. Isolation of proteins from potato tubers. Plant Breeding and Seed Science 75: DOI: 10.1515/plass-2017-0005
- Potrykus M, Golanowska M, Sledz W, Zoledowska S, Motyka, A, Kolodziejska A, Butrymowicz J, and Lojkowska E. 2016. Biodiversity of *Dickeya* spp. isolated from potato plants and water sources in temperate climate. Plant Dis 100:408–417
- Sławiak M, Lojkowska E, Van der Wolf JM. 2009. First report of bacterial soft rot on potato caused by *Dickeya* sp. (syn. *Erwinia chrysanthemi*) in Poland. Plant Pathol. 58:794
- Zimnoch-Guzowska E., Marczewski W., Lebecka R., Flis B, Schäfer-Pregl R., Salamini F, Gebhardt C. 2000. QTL analysis of new sources of resistance to *Erwinia carotovora* ssp. *atroseptica* in potato done by AFLP, RLFP, and resistance-gene-like markers. Crop Science 40: 1156-1167