

RENATA LEBECKA ¹
ZOFIA MURAWSKA ¹
KATARZYNA SZAJKO ¹
JANUSZ DĘBSKI ²
MICHAŁ KISTOWSKI ²
WALDEMAR MARCZEWSKI ¹

¹ Instytut Hodowli i Aklimatyzacji Roślin — Państwowy Instytut Badawczy, Radzików,
Oddział w Młochowie

² Instytut Biochemii i Biofizyki Polskiej Akademii Nauk, Warszawa
e-mail: r.lebecka@ihar.edu.pl

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

Dickeya solani należy do szeregu gatunków bakterii pektynolitycznych patogennych w stosunku do ziemniaka wywołujących mokrą zgniliznę bulw. Sprawca choroby jest polifagiem, poraża wiele gatunków roślin. W krajach Europy Zachodniej bakteria ta rozprzestrzeniła się i powoduje duże straty ekonomiczne. W Polsce po raz pierwszy wykryto ją w ziemniaku w 2005 r. (Sławiak i in., 2009), a w latach 2009–2013 wykrywano bakterie tego gatunku w 11 województwach (Potrykus i in., 2016). W badaniach Czajkowskiego i in. (2013) bakterie gatunku *Dickeya solani* charakteryzowały się wyższą agresywnością niż inne bakterie pektynolityczne. Nie stosuje się chemicznej ochrony ziemniaka przed bakteriami. Nie znaleziono też źródeł skrajnej odporności na te bakterie. Bakterie są zaliczane do patogenów oportunistycznych, takich, które są zdolne wywołać objawy chorobowe w pewnych sprzyjających do rozwoju warunkach. Najważniejszymi są wysoka temperatura i niski poziom tlenu. Odporność bulw ziemniaka na bakterie pektynolityczne jest warunkowana wieloma czynnikami genetycznymi, zależnymi od środowiska.

W IHAR-PIB w Oddziale w Młochowie wykonano badania proteomiczne w celu wyjaśnienia różnic w ekspresji białek w odmianach ziemniaka o podwyższonej odporności na bakterie *Dickeya solani* w porównaniu z odmianami podatnymi, 8 i 48 godzin po inokulacji.

Z puli 25 odmian pochodzących od odmiany Katahdin (half-sib family) wybrano po dwie odmiany charakteryzujące się skrajnie różną reakcją bulw na porażenie przez bakterię *D. solani*. Oceny odporności bulw prowadzono przez trzy kolejne lata, po dwa

terminy w każdym roku badań metodą opisaną przez Lebecką (2017). Do grupy odmian podatnych dodano bardzo podatną odmianę Irys. Bulwy wybranych odmian inokulowano w dwóch terminach, 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 wzdłuż miejsca inokulacji i mrożono w ciekłym azocie. Pobierano od dwóch do czterech fragmentów każdej kombinacji doświadczenia. Białko izolowano metodą opisaną przez Murawską i in. (2017). Próbkę analizowano metodą wysokosprawnej chromatografii cieczowej sprzężonej z tandemowym spektrometrem mas (LC-MS/MS). Na podstawie widm fragmentacyjnych ustalano listę peptydów/białek obecnych w badanej próbce z *Solanum tuberosum* oraz ich względną intensywność. Następnie, listy peptydów grupowano zgodnie z układem eksperymentu. Grupy eksperymentalne porównano przy pomocy programu Diffprot (Malinowska i in., 2012), w celu wytypowania białek których poziom ekspresji pomiędzy badanymi grupami zmienił się w sposób istotny statystycznie.

Analiza głównych składowych (PCA) wyników po 8 h po inokulacji pozwoliła na odróżnienie odmian o wyższej odporności od odmian podatnych.

Porównano białka z bulw ziemniaka inokulowanych bakterią *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.

Porównano ekspresję białek w bulwach odmian odpornych i podatnych. 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 po inokulacji bakterią 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 8 h) 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 mokną zgniliznę bulw, w początkowej i późniejszej fazie infekcji. Większość białek różnicowych występuje zarówno 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 8 godzin po inokulacji.

LITERATURA

- 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 — 4073.
- 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.
- Ślawiak M., Lojkowska E., Van der Wolf J. M. 2009. First report of bacterial soft rot on potato caused by *Dickeya* sp. (syn. *Erwinia chrysanthemi*) in Poland. *Plant Pathol.* 58: 794.