

# Wykorzystanie nieukierunkowanej metabolomiki i genomiki do badania mechanizmów adaptacyjnych *Pectobacterium* w kolonizacji i infekcji roślinnych gospodarzy



*Waleron Małgorzata<sup>1</sup>, Jońca Joanna<sup>1</sup>, Renata Wawrzyniak<sup>2</sup>, Horoszkiewicz Daria<sup>1</sup>, Borowska-Beszta Maria<sup>1</sup>, Smoktunowicz Magdalena<sup>3</sup>, Zacharek Lidia<sup>1</sup>, Waleron Michał<sup>1</sup>, Gawor Jan<sup>4</sup>, Mika Adriana<sup>5</sup>, Śledziński Tomasz<sup>5</sup>, Waleron Krzysztof<sup>3</sup>*

<sup>1</sup> Uniwersytet Gdański, Zakład Ochrony i Biotechnologii Roślin, Gdańsk,

<sup>2</sup> Gdański Uniwersytet Medyczny, Katedra Biofarmacji i Farmakodynamiki, Gdańsk,

<sup>3</sup> Gdański Uniwersytet Medyczny, Katedra Mikrobiologii Farmaceutycznej, Gdańsk,

<sup>4</sup> Polska Akademia Nauk, Pracownia Sekwencjonowania i Syntezy Oligonukleotydów, Warszawa,

<sup>5</sup> Gdański Uniwersytet Medyczny, Katedra Biochemii Farmaceutycznej, Gdańsk



Finansowanie: NCN, projekt OPUS9-2015/17/B/NZ9/01730  
NCN, projekt OPUS18-2019/35/B/NZ9/01973



# *Pectobacterium betavasculatorum* - występowanie



- Ameryka Północna i Środkowa
- Afryka
- Azja
- Europa

- **burak cukrowy**
- ziemniak
- słonecznik
- karczoch

Brak metod wykrywania i identyfikacji *P. betavasculatorum* zaniża dane o występowaniu tego patogenu i umniejsza jego znaczenie.

# Poznanie biologii *Pectobacterium betavascularum* z wykorzystaniem metod omicznych

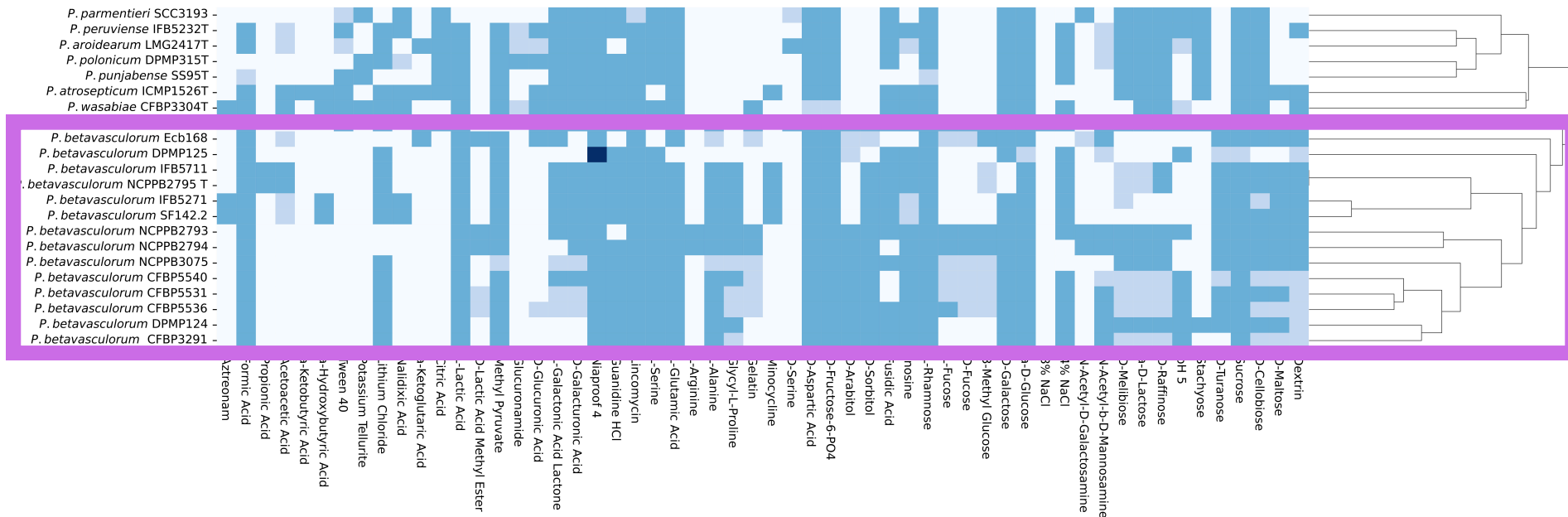
- Borowska-Beszta i in. 2024 Front. Plant Sci., doi.org/10.3389/fpls.2024.1352318

“Comparative genomics, pangenomics, and phenomic studies of *Pectobacterium betavascularum* strains isolated from sugar beet, potato, sunflower, and artichoke: insights into pathogenicity, virulence determinants, and adaptation to the host plant”

- Smoktunowicz. i in. 2024 Front. Microbiol., doi.org/10.3389/fmicb.2024.1323765

“Untargeted metabolomics coupled with genomics in the study of sucrose and xylose metabolism in *Pectobacterium betavascularum*”

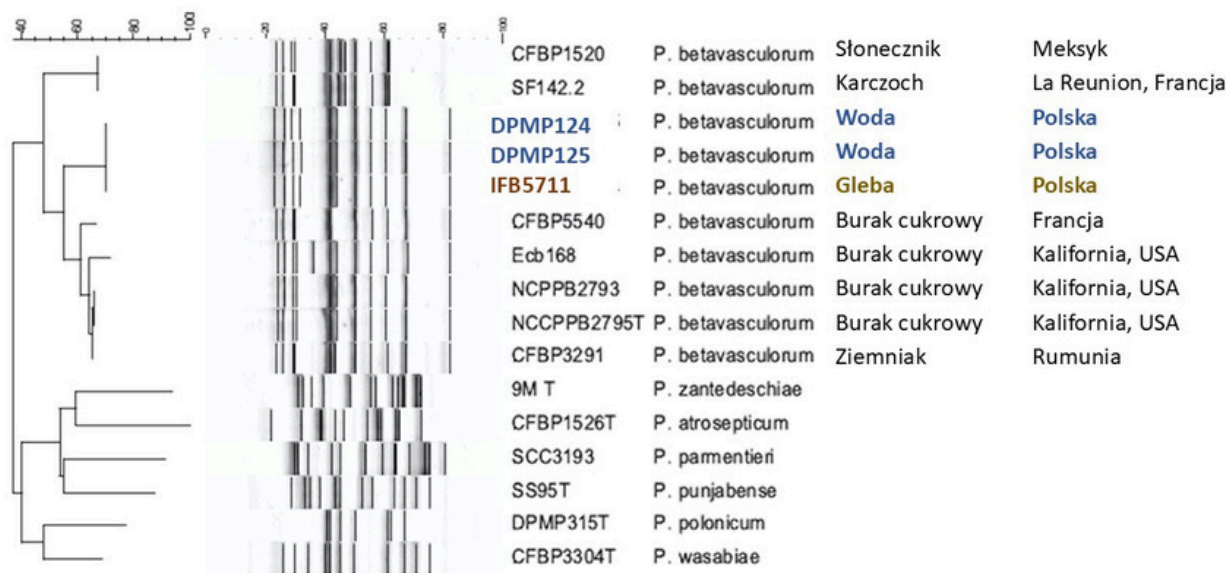
# Szczepy *Pectobacterium betavascularum* są różnicowane fenotypowo i odmienne od pozostałych gatunków



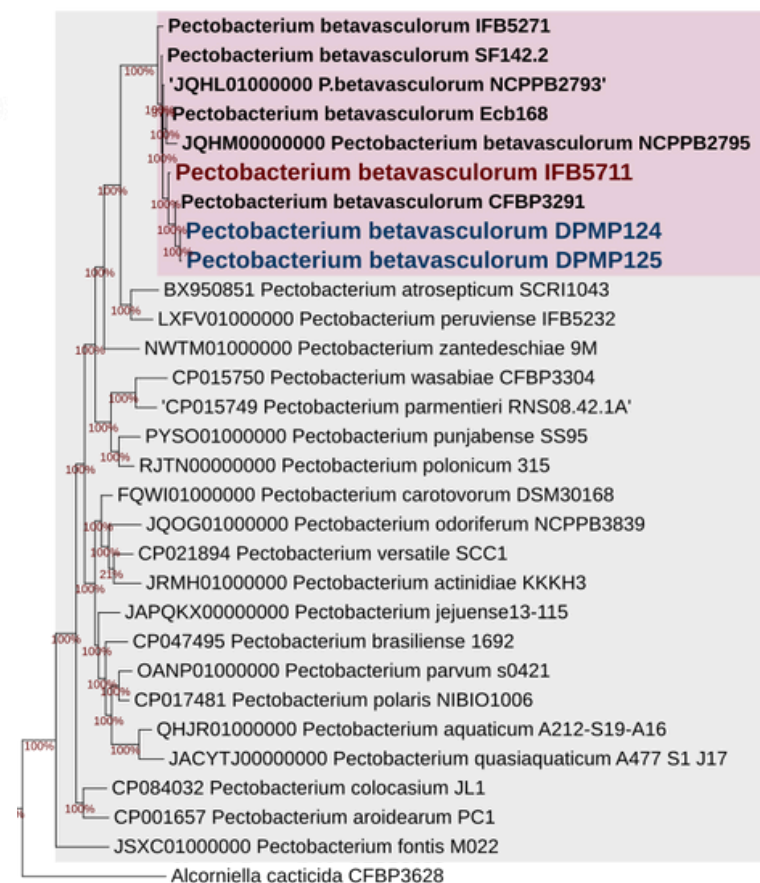
Szczepy ze słonecznika i karczocha różnią się fenotypowo od szczepów z buraka cukrowego i ziemniaka zawierającego dużą ilości cukru tkankach.

Izolaty *P. betavascularum* z wody oraz gleby są identyczne ze szczepami z buraka i ziemniaka.

# Analizy genetyczne wykazały, że izolaty *P. betavasculatorum* z wody oraz gleby są identyczne ze szczepami z buraka cukrowego i ziemniaka i różnią się od szczepów z karczocha i słonecznika



Analiza fingerprint z wykorzystaniem reakcji ERIC-PCR



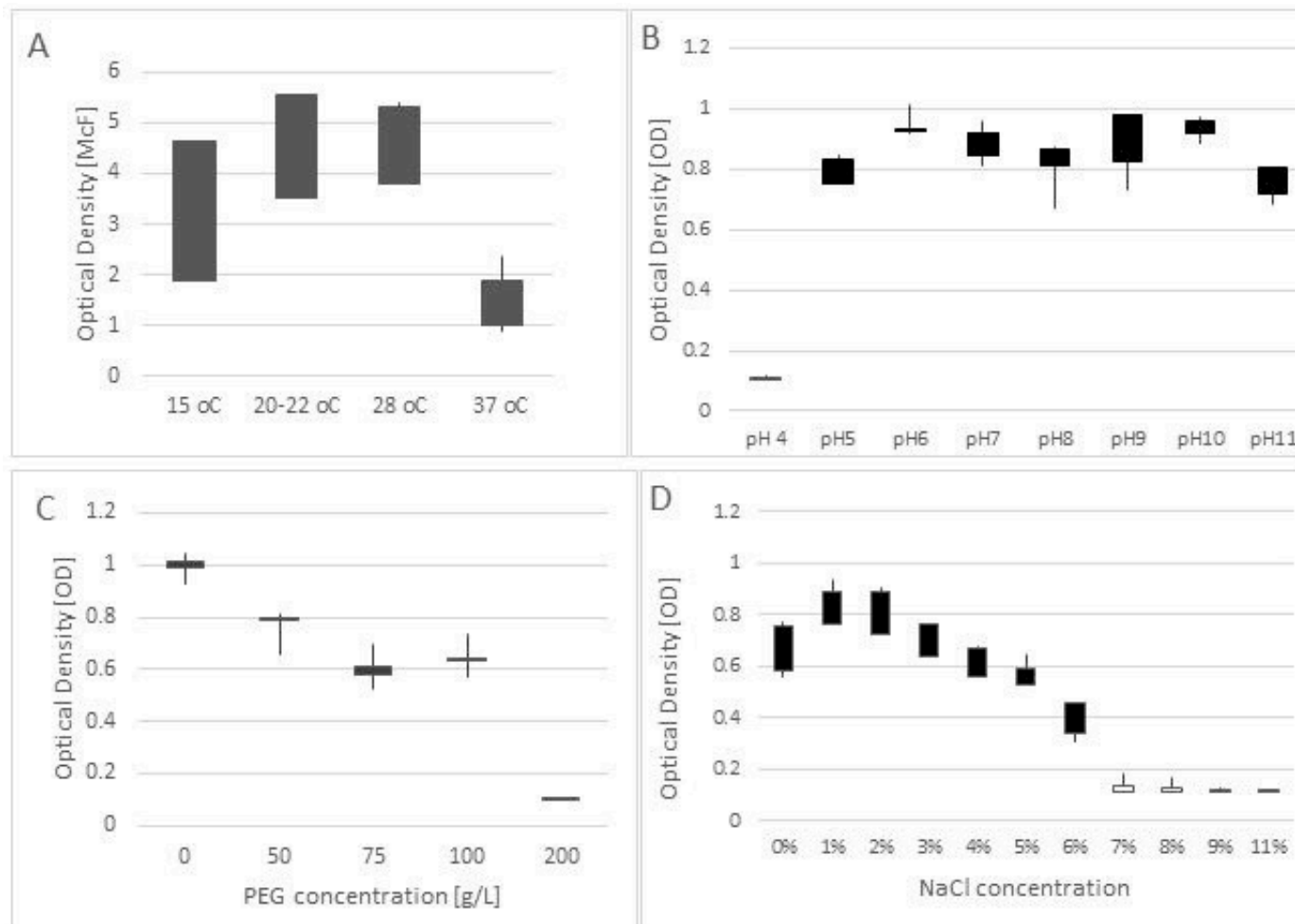
Drzewo filogenetyczne skonstruowane w oparciu o sekwencje 400 najbardziej konserwatywnych białek [PhyloPhlan3]

Izolaty z wody oraz gleby najprawdopodobniej pochodzą z buraka lub ziemniaka

# Wszystkie badane szczepy *P. betavascularum* wykazywały podobne zdolności adaptacyjne

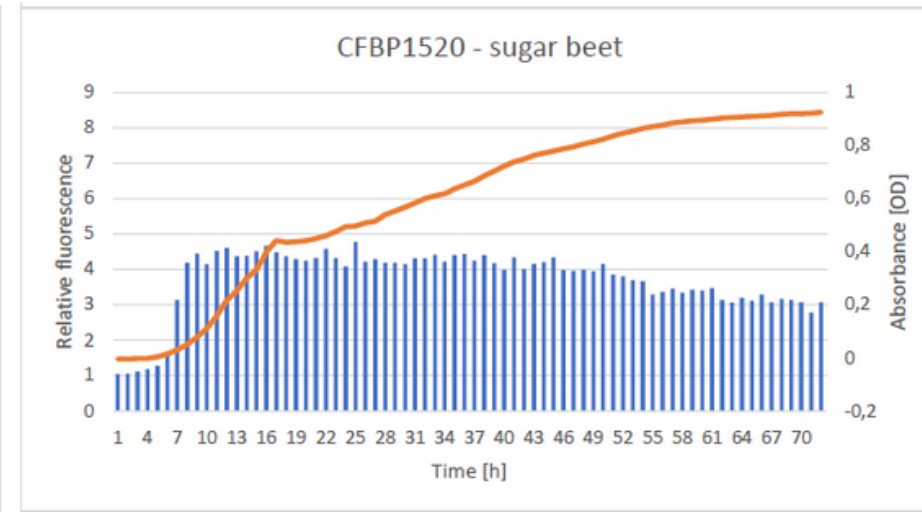
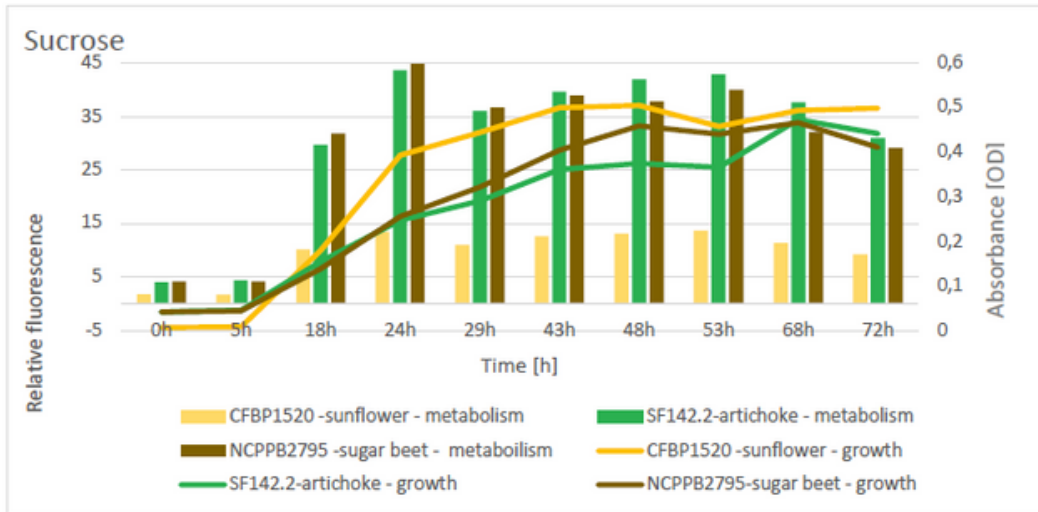
Charakteryzowały się dużą tolerancją na:

- temperaturę (15-37°C),
- zasolenie (0-6% NaCl),
- pH (5-11),
- zmniejszoną dostępność wody do 10% stężenia PEG



# Szczepy *P. betavascularum* wykazywały aktywność metaboliczną w podłożach z różnymi cukrami i ekstraktami roślinnymi

## Metoda respirometrii optycznej z wykorzystaniem kompleksu polipirydylowego Ru(II)



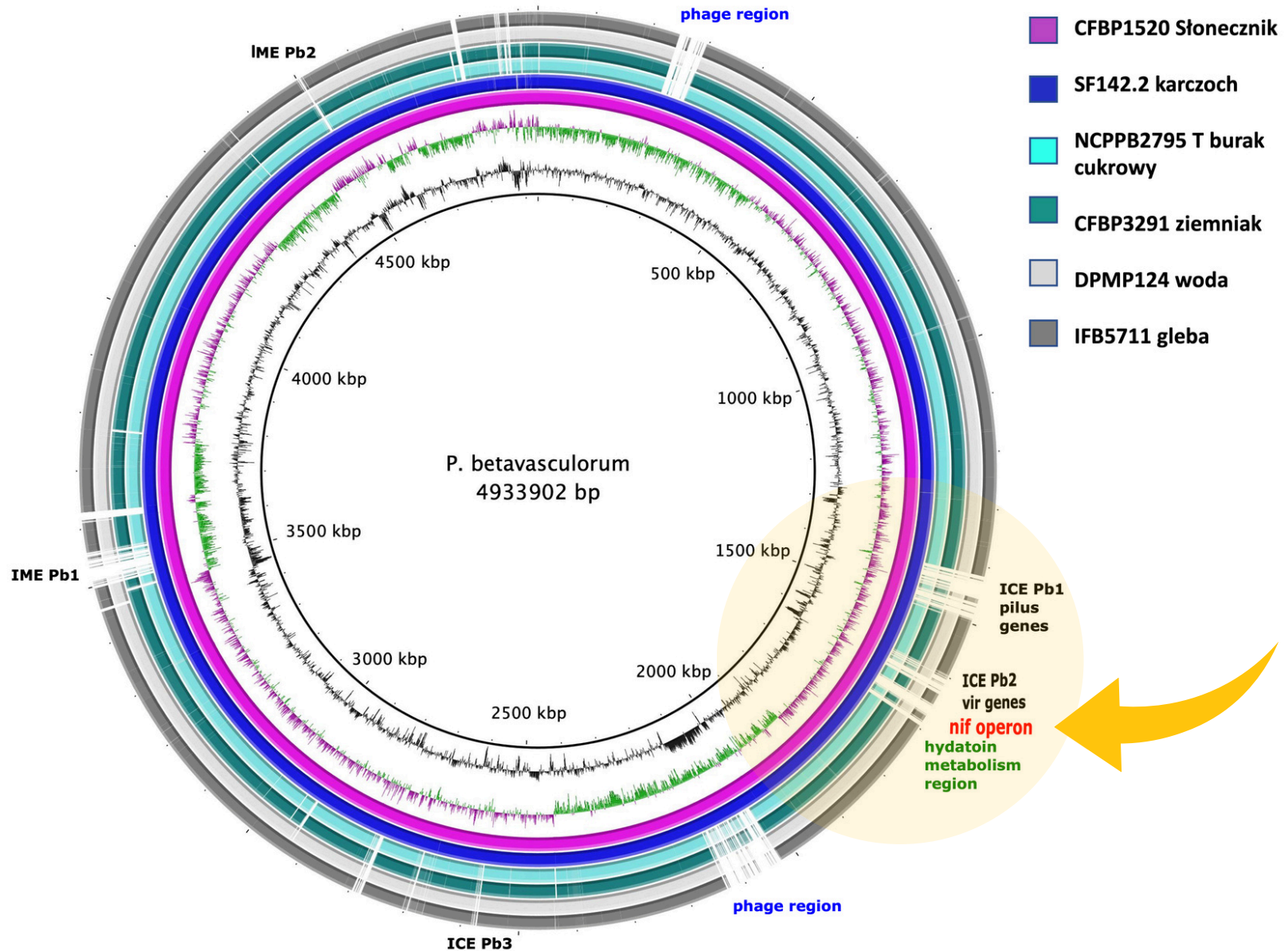
### zdolność do utylizacji różnych związków

- polioli: ~~arabitol, erytrytol~~, **sorbitol**, ~~ksylitol~~;
- monosacharydów: **ryboza**, arabinoza, **ksyloza**, **glukoza**, **fruktoza**, fukoza, mannoza, ramnoza,
- disacharydów: sacharoza, **laktoza**, **maltoza**, izomaltoza, melibioza, celobioza, turanoza, trehaloza, pallatynoza;
- trisacharydu - rafinoza
- polimerów: skrobia, inulina, pektyna
- ~~tauryna~~

### Zdolność do wzrostu na 10% ekstraktach roślinnych

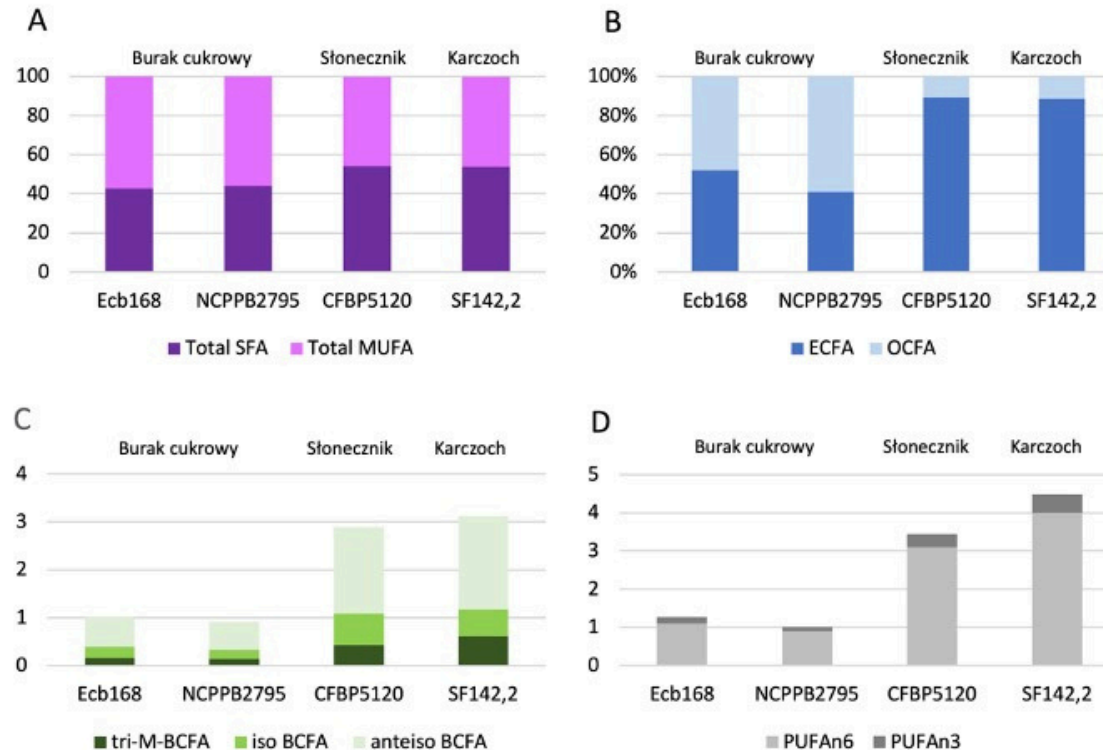
- **burak cukrowy**
- **burak pastewny**
- **ziemniak**
- jeżyna
- pitaya
- czarna jagoda
- psianka czarna
- orchidea
- Zantedeschiae
- żyworódka
- **Arabidopsis thaliana**

# Szczepy z wody, gleby i roślin o dużej zawartości cukrów (burak cukrowy i ziemniak) nie posiadają operonu *nif* umożliwiającego wiązanie azotu atmosferycznego





# Analiza estrów metylowych kwasów tłuszczowych (FAME) za pomocą chromatografii gazowej / spektrometrii mas z jonizacją elektronów (GC-EI-MS)

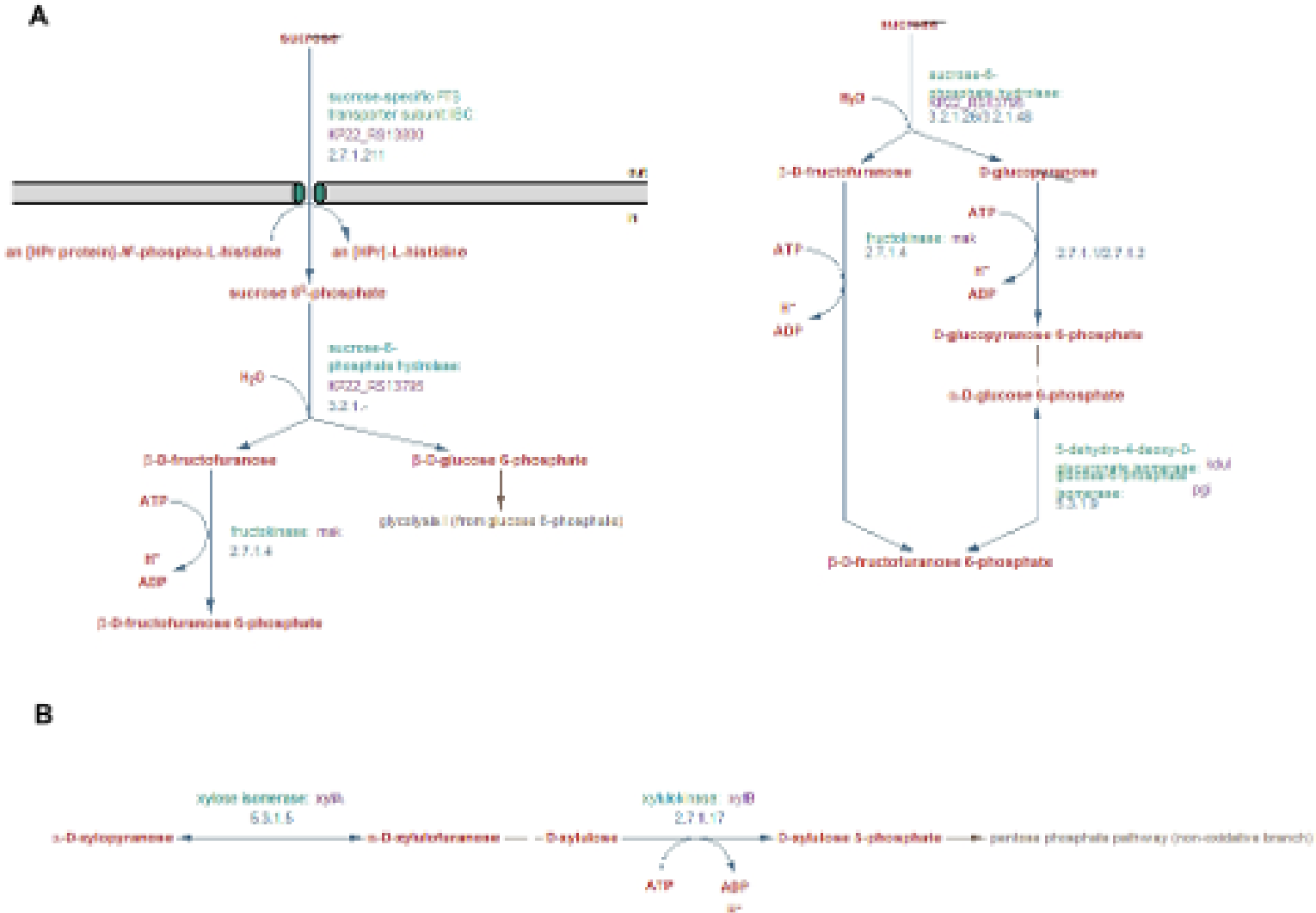


SFA – nasycone kwasy tłuszczowe, BCFA - rozgałęzione kwasy tłuszczowe, PUFA – wielonienasycone kwasy tłuszczowe, ECFA – parzystowęglowe kwasy tłuszczowe, OCFA – nieparzystowęglowe nasycone kwasy tłuszczowe, MUFA – jednonienasycone kwasy tłuszczowe

Odmienne proporcje kwasów tłuszczowych szczepów *P. betavascolorum* sugerują adaptację umożliwiającą wykorzystanie składników odżywczych dostępnych w tkankach gospodarza

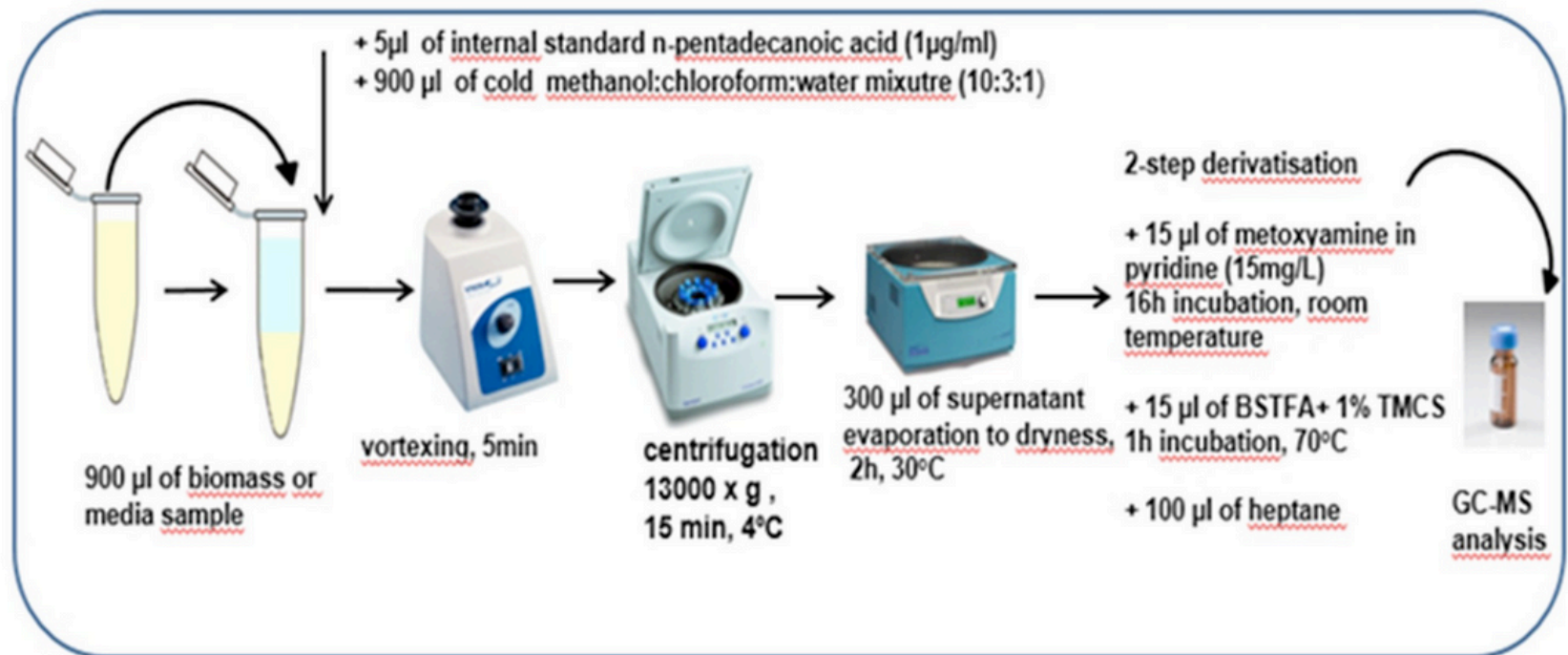
*P. betavascularum* posiadające zdolność do kolonizacji roślin o wysokiej zawartości sacharozy (burak cukrowy) i ksylozy (słonecznik i karczoch) mogą wykorzystać zarówno sacharozę, jak i ksylozę jako jedyne źródło węgla.

Szlaki degradacji sacharozy (A) i ksylozy (B) w genomach *P. betavascularum*



# Wykorzystanie metabolomiki nieukierunkowanej do zbadania szlaków metabolicznych regulowanych w obecności sacharozy i ksylozy

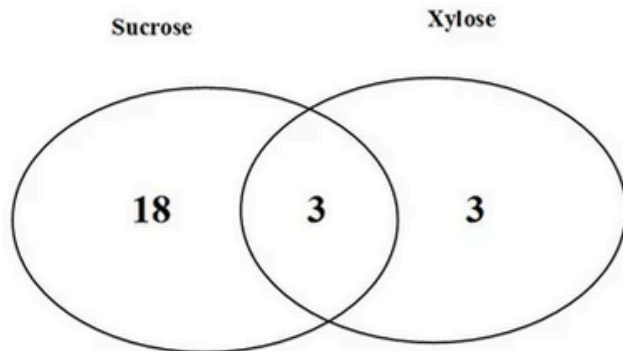
zastosowanie techniki chromatografii gazowej ze spektrometrią mas (GC-MS).



# Zidentyfikowano odpowiednio 97 i 114 metabolitów w biomasie bakteryjnej i próbkach pożywki

## Więcej metabolitów wykryto w obecności sacharozy niż ksylozy

### Biomass samples



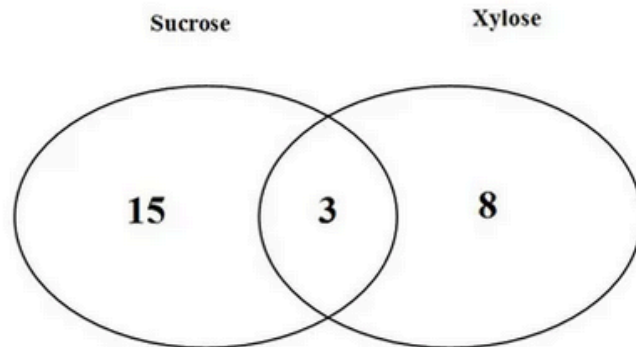
### Metabolity wspólne:

- 5-hydroksy-L-tryptofan
- arabinoza
- fruktoza

### Metabolity unikalne dla ksylozy:

- likoza
- sacharoza
- ksylitol

### Media samples

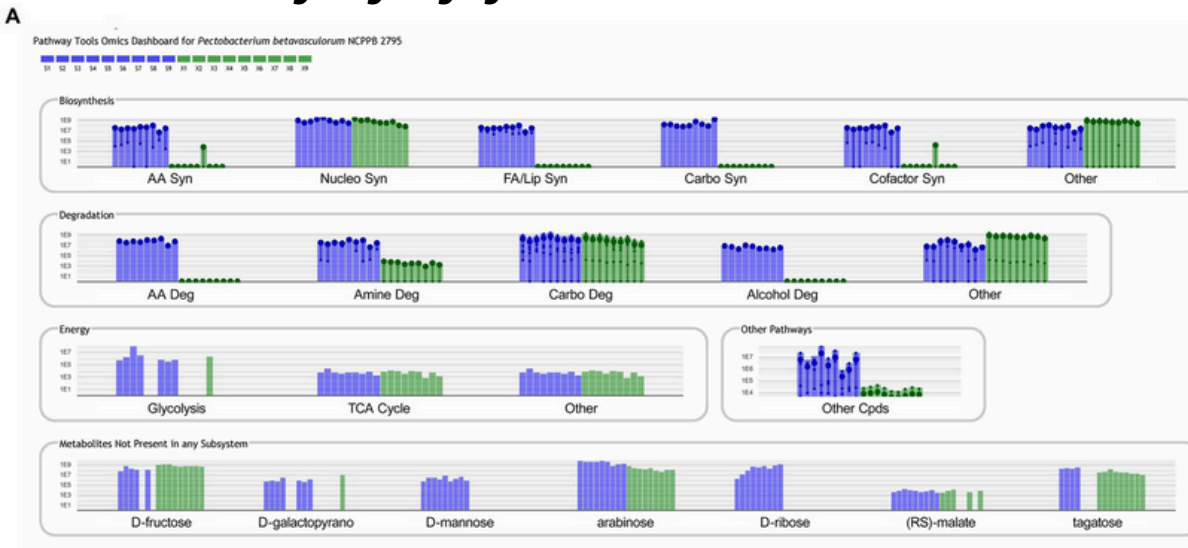


- kreatynina
- galaktofuranoza
- glukopiranoza

- norwalina
- glicerol
- arabinopiranoza
- treitol
- mannopiranozyd
- arabinozęa
- propanodiaminę
- mononukleotyd kwasu nikotynowego

# Odmierna regulacja szlaków metabolicznych zidentyfikowanych w genomie *P. betavascularum* na podstawie metabolitów wydzielanych w pożywkach suplementowanych różnymi cukrami

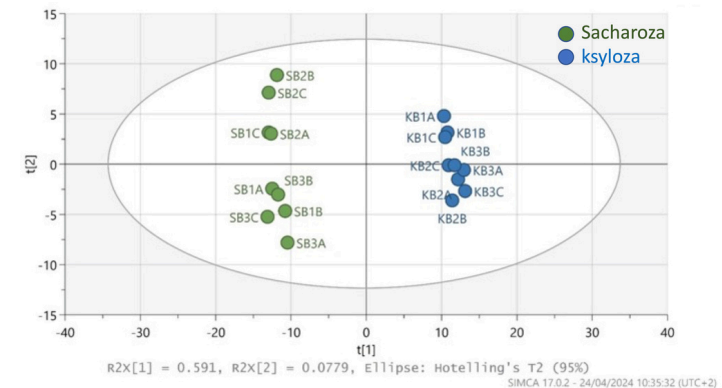
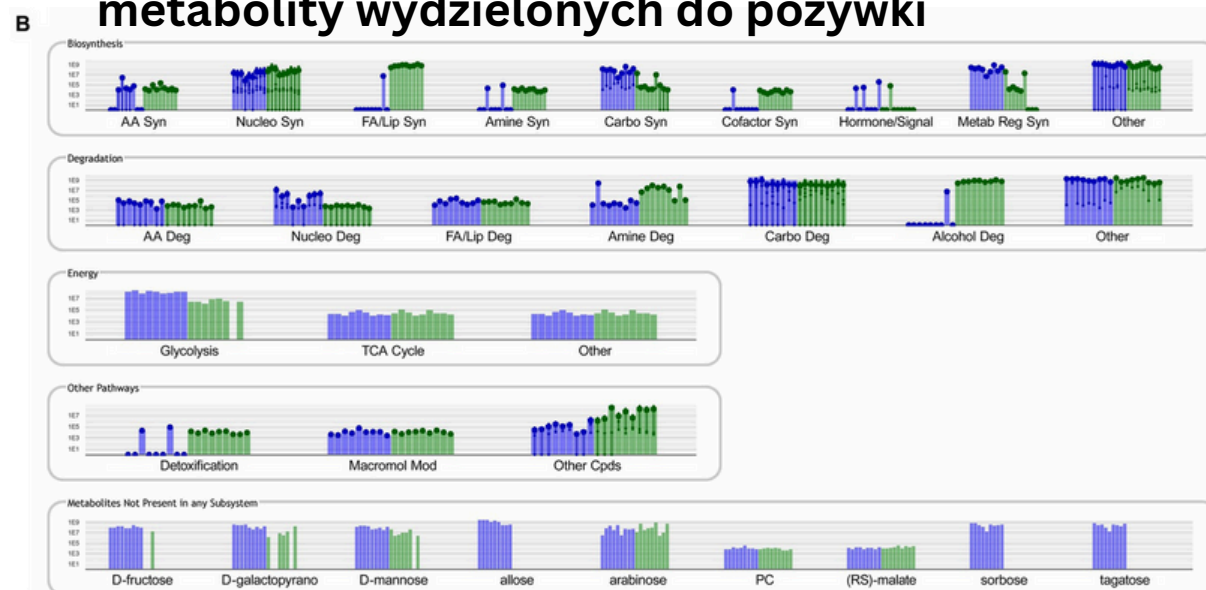
## metabolity wykrytych biomasy bakterii



■ sacharoza ■ ksyloza

Obserwowane różnice są istotne statystycznie

## metabolity wydzielonych do pożywki



Statystyki wielowymiarowe metabolicznej bazy danych. Model PCA dla zbioru danych biomasy bakterii hodowanych w obecności sacharozy i ksylozy.

# Podsumowanie

- Bakterie z gatunku *P. betavascularum* wykorzystując zarówno sacharozę, jak i ksylozę jako jedyne źródło węgla efektywnie kolonizuje gospodarzy o wysokiej zawartości tych cukrów.
- Dzięki plastyczności metabolicznej bakterie mogą łatwo zmienić roślinę żywicielską i dostosować się do zmieniających się warunków środowiskowych, a tym samym są w stanie rozprzestrzeniać się w różnych regionach klimatycznych.
- Gatunek *P. betavascularum* należy uznać za ważny patogen w rolnictwie, szczególnie w dobie postępujących zmian klimatycznych i intensyfikacji międzynarodowego handlu roślinami, zwłaszcza na rynku spożywczym.