



**XIII OGÓLNOPOLSKA KONFERENCJA NAUKOWA  
NAUKA DLA HODOWLI I NASIENNICTWA  
ROŚLIN UPRAWNYCH**



pod honorowym patronatem  
Ministra Rolnictwa i Rozwoju Wsi

**STRESZCZENIA  
REFERATÓW I POSTERÓW**

**Zakopane, 30.01 - 3.02.2017 r.**

## Badanie profili białkowych w bulwach ziemniaka po porażeniu bakteriami *Dickeya solani*

Zofia Murawska<sup>1</sup>, Janusz Dębski<sup>2</sup>, Dominik Cysewski<sup>2</sup>, Katarzyna Szajko<sup>1</sup>, Renata Lebecka<sup>1</sup>

<sup>1</sup>Instytut Hodowli i Aklimatyzacji Roślin – Państwowy Instytut Badawczy, Oddział Młochów

<sup>2</sup>Instytut Biochemii i Biofizyki, Polska Akademia Nauk

*z.murawska@ihar.edu.pl*

Celem badań było opracowanie metody izolacji białek z bulw ziemniaka porażonych bakteriami *Dickeya solani* do badania proteomu metodą spektrometrii mas. Prawidłowa izolacja białek jest krytyczna w analizie proteomicznej do uzyskania powtarzalnych, dobrej jakości wyników, ze względu na wysoką czułość metody. W badaniach wykorzystano odmiany Irys, Ulster Supreme, o bulwach podatnych na bakterie *D. solani* oraz odmianę Humalda o bulwach odpornych. Bulwy inokulowano w zranienia 10 µl inokulum i inkubowano 8 lub 48 godzin w temperaturze 26°C. Próbkę z bulw pobrano na granicy porażenia bulwy, z tkanki zdrowej, przy pomocy korkoboru. Następnie próbki zamrożono w ciekłym azocie i liofilizowano przez 72 godziny.

Sprawdzono dwie metody przygotowywania próbek, w każdej z nich wykorzystano inny detergent: laurylosiarczan sodu (SDS) lub deoksycholan sodu (SDC). Oba detergenty, z różną intensywnością, wydobywają białka z błon, poprzez tworzenie z nimi kompleksów lepiej rozpuszczalnych w wodzie. W efekcie aktywność enzymatyczna, m.in. proteaz i fosfataz jest zahamowana.

W metodzie pierwszej zastosowano protokół opierający się na SDC, który jest kompatybilny ze spektrometrią mas, lecz mniej wydajny. W drugiej metodzie wykorzystano SDS, który efektywnie ekstrahuje białka, lecz blokuje aktywność trypsyny w stężeniu powyżej 0,1%, a stężenie robocze użyte do ekstrakcji wynosiło 2%. W celu pozbycia się detergentu, białka wytrącono zimnym acetonem, a następnie rozpuszczono w 8M moczniku i wstępnie trawiono Lys-C, która jako nieliczna proteaza wykazuje aktywność enzymatyczną w tych warunkach. Po wstępnej proteolizie białek przy pomocy Lys-C roztwór rozcieńczono do 1M mocznika (stężenie kompatybilne z trypsyną).

W powyższych metodach białka trawiono enzymem proteolitycznym trypsyną, która hydrolizuje wiązania peptydowe pomiędzy lizyną lub arginina a innym dowolnym aminokwasem po stronie karbonylowej zasadowego aminokwasu.

Podczas izolacji stosowano także wodorowęglan amonu, który odpowiada za buforowanie roztworu, utrzymując pH optymalne dla trypsyny (pH 7.5), TCEP, który redukuje mostki siarczkowe stabilizujące trzeciorzędową strukturę białek oraz MMTS, który blokuje zredukowane grupy tiosiarczkowe co zapobiega odtwarzaniu wiązań. Uzyskane mieszaniny peptydów były następnie rozdzielane chromatograficznie. Kolumna nanoHPLC była sprzężona w czasie rzeczywistym ze spektrometrem mas. W wyniku analizy proteomicznej, średnio w pierwszej metodzie otrzymano 1052 zidentyfikowanych białek w próbce, w drugiej metodzie średnia wynosiła 1225 białek. Średnie wartości współczynników korelacji Pearsona dla prób pochodzących z tej samej bulwy odmiany Ulster Supreme (trzy bulwy po 4 próby z każdej) wynosiły od 0,95 do 0,96. Średnie pochodzące z różnych bulw tej samej odmiany wahały się od 0,93 do 0,95. W przypadku bulw dwóch odmian, Irys i Humalda, traktowanych wodą (dwie próby z różnych bulw każdej odmiany) wartości współczynników wynosiły od 0,93 do 0,94, natomiast po porażeniu bakteriami od 0,89 do 0,91. Wyniki świadczą o dużej powtarzalności pomiarów, co jest niezbędne dla wiarygodnej i precyzyjnej analizy proteomicznej.

Wstępne wyniki porównania proteomu podatnej odmiany Irys i odpornej odmiany Humalda po inokulacji bakteriami *D. solani* w porównaniu do kontroli traktowanej wodą wskazują na większe różnice w odmianie Irys niż w odmianie Humalda, które prawdopodobnie wynikają z posiadanego mechanizmu odporności tej odmiany. W przypadku odmiany Irys w wyniku infekcji, obserwujemy wzmożoną syntezę m.in. białek opiekuńczych (czaperonin i białek szoku cieplnego/stresu), o których oddziaływania znane są z innych badań. Jednakże, nie udało się zidentyfikować wśród nich białek posiadających aktywność enzymatyczną, która mogłaby mieć własności antibakteryjne. W przypadku odmiany Humalda obserwujemy mniejszą liczbę białek syntezowanych w odpowiedzi na infekcję, nieznane są ich interakcje. Jednakże białka, które są syntetyzowane w odpowiedzi na infekcję mają silne właściwości antibakteryjne w stosunku do *D. solani*. Są to m.in. dechitynazy oraz glikozydazy glukanów, które są odpowiedzialne za mechanizm patogenyzy *D. solani*. Badania będą kontynuowane.