

Streszczenie rozprawy doktorskiej

STRUKTURY CHEMICZNE O-POLISACHARYDÓW WYBRANYCH SZCZEPÓW BAKTERII Z RODZAJÓW *DICKEYA* I *PECTOBACTERIUM*

mgr Agnieszka Kowalczyk

Bakterie otaczające rośliny zazwyczaj nie mają zauważalnego wpływu na ich wzrost i fizjologię. Liczną grupę stanowią gatunki przynoszące korzyści, np. dostarczając składników odżywczych, czy stymulując wzrost. Niestety występują również bakterie fitopatogenne powodujące poważne choroby, prowadzące nawet do obumierania roślin. Na szczególną uwagę zasługują fitopatogeny z rodziny *Pectobacteraceae* (ang. Soft Rot *Pectobacteraceae*; SRP), do których należą bakterie pektynolityczne z rodzajów *Pectobacterium* i *Dickeya*. Drobnoustroje te powodują czarną nóżkę oraz mokrą zgniliznę ziemniaka, a także wielu innych roślin uprawnych (m.in. pomidorów, cykorii, ryżu, kukurydzy) i ozdobnych (m.in. chryzantem, goździków, fiołków) na całym świecie, przyczyniając się do znacznych strat. Fitopatogeny z rodzajów *Pectobacterium* i *Dickeya* są zdolne do penetracji tkanki żywiciela dzięki wydajnej produkcji enzymów degradujących ścianę komórkową roślin o właściwościach pektynolitycznych, celulolitycznych, proteolitycznych i lipolitycznych. Innym ważnym czynnikiem wirulencji jest lipopolisacharyd (LPS), ze względu na jego udział w adhezji bakterii do tkanki roślinnej oraz oddziaływanie z systemami obronnymi gospodarza. Chęć lepszego poznania interakcji bakteria-roślina, jak również scharakteryzowania czynników odpowiedzialnych za patogenność SRP, sprawiła, że podjęto badania struktur powierzchniowych tych fitopatogenów. Znajomość budowy polisacharydów może przyczynić się do wyjaśnienia mechanizmów oddziaływania bakteria-roślina oraz uzupełnienia systemu klasyfikacji tych drobnoustrojów.

Celem rozprawy doktorskiej było określenie struktur chemicznych O-specyficznych polisacharydów (OPS-ów), stanowiących najbardziej wyeksponowane fragmenty LPS-ów, wybranych szczepów bakterii z rodzajów *Dickeya* i *Pectobacterium*, wyizolowanych ze środowiska wodnego.

LPS wyizolowano z suchej masy bakteryjnej, wykorzystując ekstrakcję mieszaniną fenolu-chloroformu-eteru naftowego lub klasyczną ekstrakcją fenolowo-wodną. DNA i RNA oraz białka zostały usunięte z próbki w wyniku trawienia enzymatycznego i dializy. Otrzymany LPS poddano łagodnej hydrolizie. Lipid A odwirowano a frakcję cukrową oczyszczono za pomocą chromatografii wykluczania. Do badań strukturalnych O-antygenów wykorzystano analizy chemiczne: analizę cukrową, analizę metylacyjną oraz reakcję z optycznie czynnym butan-2-olem,

a także technikę spektroskopii magnetycznego rezonansu jądowego (NMR). Pochodne uzyskane w wyniku modyfikacji chemicznych analizowane były techniką chromatografii gazowej oraz chromatografii gazowej sprzężonej ze spektrometrią mas. Zarejestrowane chromatogramy oraz widma mas dostarczyły wstępnych informacji o strukturze chemicznej OPS-u: liczbie i rodzaju reszt cukrowych, miejscu ich podstawienia oraz przyporządkowaniu monosacharydów do szeregu konfiguracyjnego D lub L. Na podstawie zarejestrowanych widm jedno- i dwuwymiarowych NMR określono konfigurację anomerycznych atomów węgla, α lub β , poszczególnych monosacharydów, ustalono ich sekwencję w jednostce powtarzalnej, a także zidentyfikowano elementy strukturalne polisacharydów, które nie zostały wcześniej wykryte metodami chromatograficznymi.

W oparciu o wyniki uzyskane z analiz chemicznych i spektroskopowych określono struktury chemiczne OPS-ów badanych szczepów bakteryjnych: *D. aquatica* IFB0154 i IFB0694, *D. lacustris* IFB8647, *P. aquaticum* IFB5637 i *P. versatile* IFB5636.

Znajomość struktury OPS-u może przyczynić się do poznania mechanizmów oddziaływań roślina-bakteria, co może prowadzić do opracowania nowych metod identyfikacji patogenu, specyficznych dla gatunku, np. szybkich testów diagnostycznych, a także skutecznych metod zwalczania i zapobiegania infekcji. Perspektywa szybkiej identyfikacji drobnoustroju może przyczynić się do ograniczenia strat ekonomicznych na plantacjach ziemniaków i innych roślin uprawnych.