

Charakterystyka szczepu *Pectobacterium aquaticum* wyizolowanego z polskich wód oraz zbadanie wybranych czynników bakteryjnych i środowiskowych istotnych dla rozwoju czarnej nóżki i mokrej zgnilizny na ziemniaku

mgr Weronika Babińska-Wensierska

Bakterie pektynolityczne z rodzajów *Dickeya* i *Pectobacterium*, należących do Soft Rot *Pectobacteriaceae* (SRP), powodują znaczne straty w plonach wywoływane przez mokrą zgniliznę ziemniaka, licznych warzyw i roślin ozdobnych, jak również czarną nóżkę ziemniaka. *Dickeya* spp. i *Pectobacterium* spp. zaliczane są do dziesięciu rodzajów bakteryjnych patogenów roślin, które powodują, największe w skali świata, straty w produkcji ziemniaka. Pomimo odnotowywanych wysokich strat ekonomicznych i powszechnego występowania bakterii pektynolitycznych w środowisku, nie opracowano jak dotąd skutecznej metody ochrony roślin przed tymi patogenami. Badanie bulw ziemniaka pod kątem obecności bakterii z rodzajów *Dickeya* spp. i *Pectobacterium* spp. i ich eliminacja z uprawy jest uważana za najskuteczniejszy sposób ochrony plonów przed tymi patogenami. W związku z przytoczonymi faktami cele przedmiotowej rozprawy doktorskiej zostało sformułowane następująco: i) stwierdzenie, czy naturalne zbiorniki wodne stanowią potencjalne źródło występowania bakterii z rodziny *Pectobacteriaceae*, patogenów które mogą wywoływać objawy mokrej zgnilizny i czarnej nóżki na ziemniaku, ii) poszukiwanie czynników wirulencji wpływających na patogeniczność bakterii z gatunków *Pectobacterium aquaticum* i *Dickeya solani*, iii) wykorzystanie podejścia metagenomicznego w celu zrozumienia różnic w strukturze mikrobioty bakteryjnej w glebie supresyjnej i niesupresyjnej wobec bakterii z rodziny *Pectobacteriaceae*.

Pectobacterium spp. i *Dickeya* spp. występują w różnych środowiskach, włączając w to zbiorniki wodne. W celu zbadania obecności SRP w jeziorach na terenie Pomorza, przez okres dwóch lat pobierano próbki wody z różnych głębokości. Identyfikacja oraz kompleksowa charakterystyka genomowa i fenotypowa wyizolowanych bakterii pozwoliła na wykrycie w badanych jeziorach obecności bakterii z rodziny *Pectobacteriaceae*. Co ciekawe, wśród wyizolowanych bakterii zidentyfikowano szczep należący do niedawno ustanowionego gatunku: *Pectobacterium aquaticum*. Szczep *P. aquaticum* IFB5637 wykazywał aktywność enzymów rozkładających składniki roślinnych ścian komórkowych (ang. *plant cell wall-degrading enzymes*, PCWDEs), w tym pektynaz, celulaz i proteaz. Wykazano także, iż w warunkach laboratoryjnych szczep *P. aquaticum* IFB5637 jest zdolny do maceracji tkanki bulw ziemniaka oraz liści cykorii. Uzyskane wyniki wskazują, że stosowanie wód śródlądowych do nawadniania pól, na których uprawiany jest ziemniak, może przyczynić się do rozprzestrzeniania się bakterii pektynolitycznych i odnotowywania objawów chorobowych czarnej nóżki i mokrej zgnilizny na roślinach.

Kolejna część przeprowadzonych badań poświęcona była identyfikacji determinant wirulencji u *P. aquaticum* i *Dickeya solani*. Jednym z czynników warunkujących wirulencję bakteryjnych patogenów roślin są lipopolisacharydy zewnątrzkomórkowe (ang. *lipopolysaccharide*, LPS), które odgrywają ważną rolę na wczesnym etapie interakcji roślina-patogen. W kolejnych badaniach skupiono się na identyfikacji struktury i składu cukrowej części LPSu (ang. *O-polysaccharide*, OPS) *P. aquaticum* IFB5637. W wyniku przeprowadzonych analiz ustalono, że w

skład OPS wchodzą pentamery zbudowane z dwóch powszechnie znanych heksoz: mannozy i glukozy, oraz unikatowy cukier abekoza, który w tej pracy został po raz pierwszy zidentyfikowany w komórkach bakterii z rodziny *Pectobacteriaceae*.

Zdolność bakterii z gatunku *D. solani* do wywoływania objawów chorobowych wynika z efektywnej produkcji enzymów degradujących ścianę komórkową roślin, nazywanych PCWDEs. Pomimo dużej jednorodności genetycznej szczepów *D. solani*, niektóre z nich wykazywały skrajnie różną zjadliwość. Dwa szczepy *D. solani* różniące się zdolnością do wywoływania objawów chorobowych na roślinach wykorzystano w badaniach nad identyfikacją czynników wirulencji. Przeprowadzone badania koncentrowały się na analizie metylomów i transkryptomów dwóch szczepów *D. solani*: wirulentnego IFB0099 i niewirulentnego IFB0223. Bioinformatyczna analiza metylacji DNA nie wykazała istotnych różnic między profilami metylacji DNA badanych szczepów. Natomiast analiza profili transkrypcyjnych metodą RNA-Seq wykazała różnice w poziomie ekspresji szeregu genów pomiędzy porównywanymi szczepami. Niektóre z genów kodujących składniki systemu sekrecyjnego typu II (ang. *type II secretion system*, T2SS) (*gspJ*, *nipE*) oraz trzy z genów kodujących endo-pektynazy (*pelD*, *pelE*, *pelL*) wykazywały wyższy poziom stymulacji ekspresji w warunkach indukcyjnych w przypadku szczepu IFB0099 w porównaniu do IFB0223, co może przyczynić się do jego zwiększonej wirulencji. Dodatkowo, zwiększona ekspresja genów kodujących białka budujące wici w IFB0099 (*flgC*, *flgB*, *flgD*, *fliG*, *flgG*, *flgF*, *flhA*, *fliA*) może mieć wpływ na zwiększoną mobilność tego szczepu.

Stopień nasilenia chorób wywołanych przez bakteryjne patogeny roślin jest zależny od odporności rośliny gospodarza, wirulencji patogena oraz warunków środowiskowych. Dlatego zbadano, czy rozwój objawów chorobowych wywołanych przez bakterie z rodzajów *Dickeya* i *Pectobacterium* może być uzależniony od właściwości gleby, a zwłaszcza składu jej mikrobioty bakteryjnej. W literaturze pojawia się termin „gleba supresyjna”, który jest używany do opisanie gleby, w której na wznastających roślinach nie występują objawy choroby lub są minimalne, nawet w obecności patogena. W przeciwieństwie do „gleby supresyjnej”, jako „glebę niesupresyjną” definiuje się glebę, której skład mikrobiologiczny sprzyja rozwojowi objawów chorobowych na roślinach. Na podstawie wcześniejszego monitoringu częstości występowania objawów czarnej nóżki i mokrej zgnilizny na plantacjach ziemniaka, wytypowano dwa pola z glebą o właściwościach supresyjnych i niesupresyjnych. Przeprowadzone analizy wykazały, że gleba supresyjna i niesupresyjna charakteryzowała się podobnymi właściwościami fizykochemicznymi. Natomiast sekwencjonowanie amplikonów dla genów kodujących 16S rRNA wykazało różnice w składzie mikrobioty bakteryjnej między dwoma analizowanymi rodzajami gleby. Wykazano, że przedstawiciele rodzajów *Bacillus*, *Acidobacterium* i *Gaiella* są znacznie liczniejsi w badanej glebie supresyjnej w porównaniu do gleby niesupresyjnej.

Podsumowując, przeprowadzone badania wzbogacają naszą wiedzę na temat złożonych interakcji między ekonomicznie istotnymi patogenami roślin z rodzajów *Dickeya* i *Pectobacterium* a środowiskiem i roślinami gospodarczymi. Wykonana analiza otwiera nowe perspektywy dla efektywniejszego kontrolowania rozprzestrzeniania się chorób roślin, powodowanych przez bakterie pektynolityczne.