

Identyfikacja i charakterystyka genów indukowanych w komórkach bakteryjnych patogenów roślin z gatunków *Dickeya solani* i *Pectobacterium atrosepticum* w różnych temperaturach

Natalia Kaczyńska

Zakład Ochrony i Biotechnologii Roślin, Międzyuczelniany Wydział Biotechnologii UG i GUMed

Bakterie pektynolityczne z rodzajów *Pectobacterium* i *Dickeya*, wywołujące choroby zwane czarną nóżką i mokrą zgnilizną, powodują znaczne straty w plonach ziemniaka i są przyczyną poważnych strat ekonomicznych w produkcji ziemniaka. W Polsce i w Europie do roku 2000 głównymi sprawcami mokrej zgnilizny i czarnej nóżki ziemniaka były bakterie należące do gatunków: *Pectobacterium atrosepticum* i *Pectobacterium carotovorum*, infekujące rośliny w klimacie umiarkowanym. W dużo mniejszym zakresie przyczyną wymienionych chorób były szczepy z gatunku *Dickeya dianthicola*. Od roku 2005 w wielu krajach europejskich z roślin ziemniaka z symptomami czarnej nóżki były izolowane bakterie zaklasyfikowane do nowego gatunku *Dickeya solani*. Szczepy *D. solani* są bardziej agresywne niż szczepy z gatunku *D. dianthicola* i *P. atrosepticum*. Wyniki badań doświadczalnych pokazują, że zmiany klimatyczne takie jak podwyższenie średniej temperatury wiosną i latem, mogą sprzyjać łatwiejszemu rozprzestrzenianiu się ciepłolubnych bakterii *D. solani*. W przypadku bakteryjnych patogenów roślin temperatura może działać jako sygnał aktywacji ekspresji genów warunkujących biosyntezę związków warunkujących kolonizację tkanek roślinnych i rozprzestrzenianie się infekcji. Pomimo tego, że termoregulacja odgrywa istotną rolę w kontroli procesów metabolicznych większości gatunków bakterii, bardzo niewiele jest wiadomo o termoregulacji ekspresji genów warunkujących wirulencję bakterii pektynolitycznych.

Celem niniejszej rozprawy była identyfikacja i charakterystyka genów specyficznie indukowanych w komórkach bakterii *D. solani* IFB0099 i *P. atrosepticum* SCRI1043 w niskich (18 °C) i wysokich (28 °C – *P. atrosepticum*/37 °C – *D. solani*) temperaturach. Do badań został wykorzystany system reporterowy z transpozonom mini-Tn5 i pozbawionym promotora genem reporterowym *gusA* (mini-Tn5*gusA*). W wyniku przypadkowej mutagenozy transpozonomowej otrzymano 8000 mutantów transpozonomowych bakterii *D. solani* IFB0099 i 5775 mutantów transpozonomowych bakterii *P. atrosepticum* SCRI1043. W ramach przeprowadzonych badań opracowano i zoptymalizowano system selekcji temperaturo-zależnych mutantów transpozonomowych bakterii *D. solani* i *P. atrosepticum*. Wszystkie otrzymane mutanty *D. solani* IFB0099 i *P. atrosepticum* SCRI1043 zostały poddane trój etapowej selekcji mającej na celu wykazanie czy ekspresja genów „wylączonych” przez wprowadzenie transpozonu mini-Tn5*gusA*, jest zależna od temperatury. Analiza aktywności β-glukuronidazy (GUS) w komórkach mutantów transpozonomowych

rosnących na stałym podłożu agarowym z substratem X-gluc, oraz spektrofotometryczna i fluorymetryczna analiza aktywności β -glukuronidazy w pożywkach płynnych pozwoliły na wyróżnienie 46 mutantów bakterii z gatunku *D. solani* i 40 mutantów bakterii z gatunku *P. atrosepticum*, które wykazywały ekspresję GUS zależną od temperatury. Siedem mutantów *D. solani* i 20 mutantów *P. atrosepticum* wykazało zwiększoną aktywność GUS w niskiej temperaturze – 18 °C, natomiast 20 mutantów *P. atrosepticum* i 39 mutantów *D. solani* wykazało zwiększoną aktywność GUS w wysokiej temperaturze wzrostu – odpowiednio 28 i 37 °C.

Następnie zostało przeprowadzone sekwencjonowanie i identyfikacja wyselekcjonowanych regionów flankujących transpozon mini-Tn5*gusA* w genomach mutantów transpozonowych *D. solani* i *P. atrosepticum*. Na podstawie analizy sekwencyjnej ustalono, że zmutowane przez obecność transpozonu geny kodują białka metabolizmu podstawowego, transportery, białka regulatorowe, czynniki wirulencji, oraz hipotetyczne białka. W celu scharakteryzowania fenotypów mutantów *D. solani* i *P. atrosepticum*, w komórkach których ekspresja GUS jest zależna od temperatury, wykonano testy pozwalające na oszacowanie takich cech jak: ruchliwość, produkcja auksyn i sideroforów, aktywność celulaz, fosfolipaz, enzymów pektynolitycznych, wytwarzanie biofilmu oraz indukcja reakcji nadwrażliwości na liściach tytoniu. Zbadano także zdolność mutantów *D. solani* i *P. atrosepticum* do maceracji tkanek bulw ziemniaka i liści cykorii w warunkach laboratoryjnych. Osiem mutantów *D. solani* IFB0099 i pięć mutantów *P. atrosepticum* SCRI1043 wykazało znaczące różnice fenotypowe w porównaniu ze szczepami typu dzikiego, w tym zmniejszoną zdolność do maceracji tkanek bulw ziemniaka i liści cykorii oraz tworzenia biofilmu.

Przeprowadzone badania pozwoliły na opracowanie systemu selekcji pozwalającego na identyfikację mutantów *D. solani* i *P. atrosepticum*, w których ekspresja genów jest indukowana wysoką lub niską temperaturą. Stwierdzono, iż zidentyfikowane w ramach niniejszej rozprawy geny bakterii pektynolitycznych warunkują biosyntezę białek, które mogą przyczynić się do efektywniejszego infekowania roślin i wywoływania objawów chorobowych w zróżnicowanych temperaturowo warunkach środowiska.