



Charakterystyka szczepów z gatunku *Dickeya solani* oraz identyfikacja bakteryjnych i roślinnych czynników zaangażowanych w indukcję wirulencji.

Małgorzata Golanowska, Zakład Ochrony i Biotechnologii Roślin, Międzyuczelniany Wydział biotechnologii Uniwersytetu Gdańskiego i Gdańskiego Uniwersytetu Medycznego; Microbiologie Adaptation et Pathogenie, INSA de Lyon

Promotorzy: Prof. dr hab. Ewa Lojkowska, Dr Nicole Hugouvieux-Cotte-Pattat

Bakterie pektynolityczne z rodzajów *Pectobacterium* (dawniej *Erwinia carotovora*) i *Dickeya* (dawniej *Erwinia chrysanthemi*) powodują choroby takie jak czarna nóżka oraz mokra zgnilizna. Choroby te, w zależności od warunków klimatycznych, powodują straty od 2 do 10% plonów. W 2009 roku wartość strat plonów ziemniaka, spowodowanych przez bakterie pektynolityczne w Europie, została oszacowana na 250 milionów Euro. W ciągu ostatnich kilku lat, szczepy bakterii z rodzaju *Dickeya* były coraz częściej izolowane z chorych tkanek roślinnych w wielu krajach europejskich. Rodzaj *Dickeya* jest wysoko zróżnicowaną grupą bakterii, która zgodnie z obowiązującą klasyfikacją obejmuje siedem gatunków: *D. aquatica*, *D. chrysanthemi*, *D. dadantii*, *D. dianthicola*, *D. paradisiaca*, *D. solani* oraz *D. zaeae*. Ostatnie doniesienia z wielu krajów europejskich wskazują, że bakterie należące do ustanowionego w 2014 roku gatunku *D. solani* mogą efektywnie infekować i wywoływać symptomy chorobowe na roślinach ziemniaka w strefie klimatu umiarkowanego. Szczepy *D. solani* są bardziej agresywne niż bakterie z gatunku *D. dianthicola*. Przeprowadzone badania wykazały, że mają zdolność do infekowania roślin w temperaturze typowej dla klimatu umiarkowanego a także iż stosunkowo niski poziomu inokulum bakteryjnego może wywoływać objawy chorobowe.

Wykazano także, iż bakterie z gatunku *D. solani* mają lepszą zdolność do kolonizacji korzeni roślin ziemniaka a także rozprzestrzeniania się poprzez tkankę naczyniową roślin. *D. solani*, podobnie jak inne bakterie pektynolityczne wytwarza szeroką gamę zakres enzymów degradujących składniki ścian komórkowych roślin.

Celem przedstawionej rozprawy doktorskiej była: 1) fenotypowa oraz genotypowa charakterystyka szczepów *D. solani* pochodzących z różnych stref klimatycznych, izolowanych w takich krajach jak: Polska, Finlandia oraz Izrael; 2) zbadanie wpływu ekstraktu otrzymanego z bulw ziemniaka na ekspresję w komórkach *D. solani* wybranych genów : *pelD*, *pell*, *tssK*, *lfaA*; 3) genomika porównawcza dziesięciu szczepów *D. solani*, przeprowadzona na sekwencjach genomowych czterech szczepów sekwencjonowanych w ramach niniejszej pracy i różniących się poziomem wirulencji, oraz na sekwencjach genomowych sześciu szczepów *D. solani* dostępnych w GenBank.

Wyniki analizy geno- oraz fenotypowej wykazały, że szczepy pochodzące z różnych warunków klimatycznych posiadają identyczne profile rep-PCR (badania przeprowadzono z użyciem starterów REP, ERIC oraz BOX) a także identyczne profile restrykcyjne uzyskane w analizie przeprowadzonej metodą elektroforezy pulsowej (RFLP-PFGE), ale różnią się cechami fenotypowymi, w szczególności w poziomie aktywności enzymów degradujących ściany komórkowe. Szczepy *D. solani* wyizolowane w Polsce wykazywały wyższą aktywność pektynaz, celulaz oraz proteaz niż szczepy wyizolowane w Finlandii czy Izraelu.

W kolejnym etapie pracy do genów kodujących czynniki odgrywające istotną rolę w rozwoju infekcji wprowadzono kasety z genem reporterowym GUS, w celu sprawdzenia wpływu ekstraktu otrzymanego z bulw ziemniaka na ekspresję zmutowanych genów.

Przeprowadzone badania wykazały, iż ekstrakt tkankowy najefektywniej indukuje ekspresję genu *lfaA*. Ekspresja genu *pell* była również indukowana przez ekstrakt, jednak poziom indukcji był niższy niż w przypadku genu *lfaA*. Natomiast ekspresja genów *pelD* oraz *tssK* nie były indukowane przez ekstrakt roślinny.

Analiza porównawcza genomów 10 szczepów bakterii *D. solani* pozwoliła na opisanie pangenu tego gatunku. W genomach 10 szczepów *D. solani* zidentyfikowano 41 947 genów. Geny te zostały zgrupowane w 5 045 grup ortologicznych (ang. Orthologous Groups); 3 809 należy do tzw. rdzenia genomu (ang. core genome), 413 do genomu dodatkowego (ang. accessory genome) a 823 to tzw. genomu unikatowego (ang. unique genome). Analiza sekwencji białkowych dziewięciu enzymów degradujących składniki ścian komórkowych oraz dwiętnastu regulatorów ekspresji genów kodujących wspomniane białka (wybranych na podstawie badań *D. dadantii* 3937), wykazała 100 % homologii sekwencji badanych białekw obrębie 10 analizowanych genomów *D. solani*.

Wykonane w ramach niniejszej rozprawy badania wykazały, iż szczepy z gatunku *D. solani* tworzą bardzo jednolitą genetycznie grupę bakterii. Z drugiej strony, badane szczepy wykazały pewne zróżnicowanie cech fenotypowych. Postawiono hipotezę, iż kluczem do obserwowanych różnic fenotypowych jest zróżnicowana, iż regulacja ekspresji genów kodujących czynniki wirulencji. Na różnice w ekspresji genów kodujących czynniki wirulencji mogą wpływać takie czynniki jak na przykład: temperatura, anaerobioza, pH środowiska, ograniczenie dostępności żelaza a także obecność różnego rodzaju związków pochodzenia roślinnego.