

Antagonizm szczepu *Pseudomonas* P482 względem bakteryjnych patogenów roślin z rodzajów *Pectobacterium* i *Dickeya* w warunkach *in vitro* i *in planta*

Dorota Magdalena Krzyżanowska

Międzyuczelniany Wydział Biotechnologii UG i GUMed, Gdańsk

Szczep *Pseudomonas* sp. P482 jest Gramujemną bakterią pozyskaną z ryzosfery pomidora, zdolną do hamowania wzrostu fitopatogenów z rodzajów *Pectobacterium* i *Dickeya* w testach *in vitro*. *Pectobacterium* i *Dickeya* to bakterie pektynolityczne powodujące mokrą zgniliznę wielu warzyw i roślin ozdobnych. Pomimo poważnych strat ekonomicznych powodowanych przez te patogeny, metody ich kontroli są ograniczone.

W ramach niniejszych badań wykorzystano techniki eksploracji danych genomowych w połączeniu z mutagenезą ukierunkowaną do identyfikacji genów *Pseudomonas* sp. P482 istotnych dla antagonizmu tego szczepu względem *Pectobacterium* spp. i *Dickeya* spp. Sekwencję genomową szczepu P482 otrzymano w ramach usługi zewnętrznej i poddano automatycznej anotacji. Otrzymane dane genomowe zostały poddane analizie ze szczególnym uwzględnieniem przeszukiwania sekwencji pod kątem występowania genów potencjalnie zaangażowanych w syntezę metabolitów wtórnych. Wykorzystano dwie strategie eksploracji danych: ręczną, z wykorzystaniem narzędzia blastp, oraz zautomatyzowaną, bazującą na wykorzystaniu programu antiSMASH 2.0. Na podstawie przeprowadzonych *in silico* analiz wybrano 5 genów, każdy reprezentujący jeden z klastrów wytypowanych przez antiSMASH 2.0 w ramach przeszukiwania przy parametrach podstawowych. Inaktywacja tych genów na drodze mutagenезy ukierunkowanej wykazała, że geny te nie są odpowiedzialne za badaną aktywność przeciwbakteryjną szczepu P482. Przeszukiwanie genomu *Pseudomonas* sp. P482 z wykorzystaniem antiSMASH 2.0 w oparciu o bazę domen Pfam (przeszukiwanie „rozszerzone”) ujawniło w genomie szczepu P482 18 dodatkowych klastrów klasyfikowanych jako „hipotetyczne”. Mutant transpozonowy szczepu P482, otrzymany w ramach równoległe prowadzonych badań i niezdolny do hamowania wzrostu *Dickeya* spp., okazał się posiadać mutację w obrębie jednego z tych hipotetycznych klastrów. Eksploracja danych genomowych stanowi dobrą strategię do poszukiwania klastrów genowych, warunkujących produkcję metabolitów wtórnych przez bakterie. Niemniej jednak gdy w grę wchodzi metabolity wcześniej niepisane, jak ma to miejsce w przypadku czynnika warunkującego aktywność przeciwbakteryjną szczepu P482, eksploracja danych powinna zostać uzupełniona przez wykorzystanie innych metod.

Kolejnym z celów badań było określenie potencjału szczepu *Pseudomonas* sp. P482 do ochrony tkanki roślinnej przed objawami chorobowym, powodowanymi przez *Dickeya* i *Pectobacterium* spp. Testy ochrony tkanki przed maceracją przeprowadzono poprzez koinokulację tkanki bulw ziemniaka i liści główek cykorii zawieszinami bakterii patogennych i szczepu P482. Test na tkance bulw ziemniaka wykazał, że chociaż szczep P482 jest w stanie, w warunkach *in vitro*, hamować wzrost zarówno *Pectobacterium* jak i *Dickeya* spp., tak zdolność tego szczepu do ochrony tkanki przed maceracją jest szczepowo zależna: P482 jest skuteczny względem *Pectobacterium* spp., jednak nieskuteczny względem *Dickeya* spp. Niespodziewanie jednak, szczep P482 okazał się bardzo skuteczny względem *Dickeya* spp. na liściach główek cykorii. W rezultacie badań nad przyczyną obserwowanej tkankowej specyficzności antagonizmu P482 względem *Dickeya* na cykorii wykazano, że szczep P482, rosnący w soku z główek cykorii, zakwasza ten sok, podczas gdy sok z bulw ziemniaka ulega alkalizacji. Kwas organiczny, produkowany przez szczep P482 w soku z główek cykorii został zidentyfikowany jako kwas glukonowy z wykorzystaniem techniki NMR. Wstępne badania z wykorzystaniem mutantu szczepu P482 niezdolnego do produkcji tego kwasu sugerują, że produkcja kwasu glukonowego przez szczep P482 przyczynia się do zdolności tego szczepu do ochrony liści główek cykorii, jednak nie jest głównym czynnikiem warunkującym obserwowany efekt. Co ciekawe, mutant transpozonowy szczepu P482, niezdolny do hamowania wzrostu *Dickeya*, nie posiada znacząco obniżonej aktywności względem tego patogenu na liściu główek cykorii. Pokazuje to, mechanizm antagonistycznego

oddziaływania szczepu P482 względem *Dickeya* spp. w warunkach *in vitro* nie warunkuje zdolności tego szczepu do ochrony tkanki roślinnej w zastosowanych warunkach *in planta*.

Dodatkowo w ramach prowadzonych badań wykazano, że szczep P482 jest zdolny do kolonizacji ryzosfery roślin ziemniaka, rosnących w glebie z pola, chociaż nie w stopniu tak znacznym, jak szczep referencyjny, pozyskany z tej niszy ekologicznej. Oznacza to, że możliwe jest wykorzystanie rośliny ziemniaka w charakterze rośliny-gospodarza w badaniach *in planta* nad oddziaływaniem pomiędzy szczepem P482 a bakteriami pektynolitycznymi.