



Charakterystyka molekularnego mechanizmu warunkującego patogeniczność bakterii z rodzaju *Dickeya* na roślinach.

Marta Potrykus, Katedra Biotechnologii, Międzyuczelniany Wydział Biotechnologii UG & GUMed

Promotorzy: prof. dr hab. Ewa Łojkowska; dr Nicole Hugouvieux-Cotte-Pattat

Pektynolityczne bakterie z rodzaju *Dickeya* (uprzednio zaliczane do gatunku *Erwinia chrysanthemi*) oraz *Pectobacterium* (uprzednio zaliczane do gatunku *Erwinia carotovora*) wywołują choroby zwane czarną nóżką i mokrą zgnilizną na ziemniaku i szeregu gatunków roślin rolniczych, warzywniczych, ozdobnych i ziół (Toth i in. 2011). Choroby te prowadzą do strat ekonomicznych w produkcji rolniczej. Bakterie z rodzaju *Dickeya* wytwarzają szerokie spektrum czynników wirulencji, a do najważniejszych z nich należą enzymy pektynolityczne. Wieloletnie badania z wykorzystaniem szczepu *Dickeya dadantii* 3937, pozwoliły na zidentyfikowanie w genomie tych bakterii kilkunastu genów kodujących liazy kwasu poligalakturonowego (między innymi *peIA*, *peIB*, *peIC*, *peID*, *peIE*, *pell*, *peLL*, *peIN*, *peIX*, *peIZ*) (Hugouvieux-Cotte-Pattat i in. 2014) oraz białek regulujących ekspresję genów warunkujących biosyntezę tych enzymów (KdgR, PecS, PecT, Fur, Fis, H-NS, CRP, MfbR) (Charkowski i in. 2012). Wymienione regulatory mają istotny wpływ na ekspresję genów kodujących pektynazy oraz sekrecję enzymów degradujących składniki roślinnych ścian komórkowych (Hugouvieux-Cotte-Pattat i in. 1996; Hassan i in. 2013; Charkowski i in. 2012; Nasser i in. 2013).

W Polsce, bakterie z rodzaju *Dickeya* zostały wykryte po raz pierwszy na roślinie ziemniaka wykazującej objawy czarnej nóżki w roku 2005 (Sławiak i in. 2009b). Identyfikacja i charakterystyka wyizolowanych w ostatnich latach w Polsce i innych krajach europejskich bakterii, doprowadziła do wyróżnienia w obrębie rodzaju *Dickeya* nowej grupy (Sławiak i in. 2009a), która w ostatnim czasie została podniesiona do rangi gatunku – *Dickeya solani* (Wolf i in. 2014). Bakterie te charakteryzowały się wyższą wirulencją na roślinach ziemniaka i łatwiejszym przemieszczaniem się w obrębie wiązek przewodzących niż uprzednio izolowane z prób roślin ziemniaka w Europie szczepy bakterii z gatunku *D. dianthicola* (Czajkowski i in. 2010; Toth i in. 2011).

W ramach przedstawianej rozprawy doktorskiej scharakteryzowałam pod względem genotypowym i fenotypowym 4 szczepy z gatunku *D. solani* różniące się wirulencją oraz skonstruowałam mutanty tych szczepów w genach kodujących globalne regulatory KdgR, PecS, PecT oraz elementy mechanizmu QS ExpR, Expl. Dzięki przeprowadzeniu szerokiej charakterystyki fenotypowej badanych szczepów i ich mutantów określiłam wpływ badanych mechanizmów regulacji na wirulencję szczepów z gatunku *D. solani* na ziemniaku (Potrykus i in. 2014a). Badania wskazały, że negatywne globalne regulatory PecS, PecT oraz KdgR hamują ekspresję determinant wirulencji szczepów *D. dadantii* 3937 oraz *D. solani*. Z moich badań wynika, że regulator PecT w sposób istotny wpływa na ekspresję genów wirulencji w komórkach szczepów *D. solani* i jest najważniejszym negatywnym regulatorem spośród zbadanych w ramach niniejszej rozprawy. Dodatkowo, moje

KSZTAŁCIMY NAJLEPSZYCH – kompleksowy program rozwoju doktorantów, młodych doktorów oraz akademickiej kadry dydaktycznej Uniwersytetu Gdańskiego. Zad. 2. Life Sciences and Mathematics Interdisciplinary Doctoral Studies (LiSMiDoS)



HUMAN CAPITAL
NATIONAL COHESION STRATEGY

EUROPEAN UNION
EUROPEAN
SOCIAL FUND



badania sugerują, że mechanizm QS jest u bakterii *D. solani* istotny dla powodowania infekcji. Mutanty w genach *expR* i *expl* wykazywały obniżoną wirulencję w stosunku do szczepów typu dzikiego w testach na bulwach ziemniaka.

Opracowałam również metodę wykrywania i identyfikacji wybranych grup bakterii pektynolitycznych powodujących choroby zwane: czarna nóżka i mokra zgnilizna (Potrykus i in. 2014b). Zaproponowana metoda pozwala na wykrywanie bakterii z rodzaju *Dickeya*, oraz bakterii z gatunków *Pectobacterium atrosepticum*, *Pectobacterium carotovorum* subsp. *carotovorum*/*Pectobacterium wasabiae* w jednej reakcji multipleks PCR zarówno w tkankach ziemniaka wykazujących objawy chorobowe jak i w roślinach bez objawów. Dzięki zastosowaniu izolacji całkowitego DNA z próby oraz reakcji multipleks PCR zarówno czas jak i koszt wykrywania obecności kilku rodzajów patogenów bakteryjnych zostały znacząco obniżone, a hodowla bakterii stała się zbędna.

Przeprowadziłam także analizę genotypową 46 szczepów *Dickeya* izolowanych z roślin ziemniaka w Finlandii z wykorzystaniem rep-PCR oraz sekwencjonowania fragmentu genu *dnaX*. W efekcie potwierdziłam obecność *D. solani* na ziemniaku w regionach produkcji sadzeniaków (ang. *high grade regions*) w Finlandii (Degefu i in. 2013).

Przedstawiona rozprawa wnosi istotne elementy w poznanie molekularnego mechanizmu warunkującego wirulencję bakterii z gatunku *Dickeya solani* oraz umożliwia badania przesiewowe materiału roślinnego, w szczególności sadzeniaków ziemniaka pod kątem obecności wybranych grup bakterii pektynolitycznych. Opracowana metoda może także służyć wykrywaniu i identyfikacji bakterii pektynolitycznych w różnego typu zbiornikach wodnych (rzeki, jeziora, stawy, wody poprzemysłowe).

Charkowski, A. et al. (2012). The role of secretion systems and small molecules in soft rot Enterobacteriaceae pathogenicity. *Annual Review of Phytopathology* 50: 425-449.

Czajkowski, R. et al. (2010). Systemic colonization of potato plants by a soilborne green fluorescent protein-tagged strain of *Dickeya* sp. biovar 3. *Phytopathology* 100: 134-142.

Degefu, Y., Potrykus, M et al. (2013). A new clade of *Dickeya* spp. plays a major role in potato blackleg outbreaks in North Finland. *Annals of Applied Biology* 162: 231-241.

Hassan, S. et al. (2013). PelN is a new pectate lyase of *Dickeya dadantii* with unusual characteristics. *Journal of Bacteriology*, 195: 2197-2206.

Hugouvieux-Cotte-Pattat, N. et al. (1996). Regulation of pectinolysis in *Erwinia chrysanthemi*. *Annual Review of Microbiology* 50:213-257.

Hugouvieux-Cotte-Pattat, N. et al. (2014). Bacterial pectate lyases, structural and functional diversity. *Environmental Microbiology Reports* 6: 427-440.

Nasser, W. et al. (2013). Vfm, a new quorum sensing system controls the virulence of *Dickeya dadantii*. *Environmental Microbiology* 15: 865-880.

Potrykus, M et al. (2014a). Regulators involved in *Dickeya solani* virulence, genetic conservation and functional variability. *Molecular Plant Microbe Interactions* 27: 700-711.

Potrykus, M. et al. (2014b). Simultaneous detection of major blackleg and soft rot bacterial pathogens in potato by multiplex polymerase chain reaction. *Annals of Applied Biology*, 165: 474-487.

Ślawiak, M. et al. (2009a). Biochemical and genetical analysis reveal a new clade of biovar 3 *Dickeya* spp. strains isolated from potato in Europe. *European Journal of Plant Pathology* 125: 245-261.

Ślawiak, M. et al (2009b). First report of bacterial soft rot on potato caused by *Dickeya* sp. (syn. *Erwinia chrysanthemi*) in Poland. *Plant Pathology* 58: 794.

Toth I.K. et al. (2011). *Dickeya* species: an emerging problem for potato production in Europe. *Plant Pathology* 60: 385-399.

Van der Wolf et al. (2014). *Dickeya solani* sp. nov., a pectinolytic plant pathogenic bacterium isolated from potato (*Solanum tuberosum*). *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology* 64: 768-74.

KSZTAŁCIMY NAJLEPSZYCH – kompleksowy program rozwoju doktorantów, młodych doktorów oraz akademickiej kadry dydaktycznej Uniwersytetu Gdańskiego. Zad. 2. Life Sciences and Mathematics Interdisciplinary Doctoral Studies (LiSMiDoS)



EUROPEAN UNION
EUROPEAN
SOCIAL FUND

