

Komitet Nauk Agronomicznych PAN  
Polskie Towarzystwo Fitopatologiczne,  
Sekcja Bakteryjnych Chorób Roślin

**Materiały z Sympozyum**

**Aktualne kierunki badań  
nad chorobami bakteryjnymi roślin  
w Polsce**



Warszawa, 18 października 2018 r.

Organizatorzy:

Polska Akademia Nauk, Wydział II Nauk Biologicznych i Rolniczych

Komitet Nauk Agronomicznych

Polskie Towarzystwo Fitopatologiczne, Sekcja Bakteryjnych Chorób Roślin

Komitet Organizacyjny i Naukowy:

Prof. dr hab. Piotr Sobiczewski – Instytut Ogrodnictwa w Skierniewicach

Prof. dr hab. Małgorzata Mańka – Uniwersytet Przyrodniczy w Poznaniu

Prof. dr hab. Ewa Łojkowska – Międzyuczelniany Wydział Biotechnologii

Uniwersytetu Gdańskiego i Gdańskiego

Uniwersytetu Medycznego

Redakcja:

Prof. dr hab. Piotr Sobiczewski

© Copyright Polska Akademia Nauk

Biuro Upowszechniania i Promocji Nauki PAN

**ISBN 978-83-63305-60-4**

Zdjęcie na okładce:

Bakteria *Pectobacterium atrosepticum* wyizolowana z ziemniaka,

Fot.: dr hab. Krzysztof Waleron, Gdański Uniwersytet Medyczny

Symposium zostało sfinansowane przez Polską Akademię Nauk

Nakład: 100 egz.

Druk i oprawa:

Agencja Wydawniczo-Poligraficzna GIMPO

ul. M. Grzegorzewskiej 8, 02-778 Warszawa

# Spis treści

<b>Słowo wstępne</b> .....	5
MAŁGORZATA MAŃKA	
<b>Rys historyczny badań nad chorobami bakteryjnymi roślin w Polsce</b> .....	7
PIOTR SOBICZEWSKI	
<b>Problemy z diagnostyką bakteryjnych chorób roślin</b> .....	27
MAŁGORZATA SCHOLLENBERGER	
<b>Diagnostyka bakteriozy pierścieniowej ziemniaka w próbach środowiskowych</b> .....	33
– istniejące utrudnienia i proponowane rozwiązania	
WŁODZIMIERZ PRZEWODOWSKI, AGNIESZKA PRZEWODOWSKA, KATARZYNA SALAMOŃSKA, WIOLETA STOCHŁA, DOROTA SZAREK	
<b>Charakterystyka pangenomu i monitoring występowania <i>Dickeya solani</i></b> .....	37
<b>i <i>Pectobacterium parmentieri</i> w Polsce</b>	
EWA ŁOJKOWSKA, MARTA POTRYKUS, AGATA MOTYKA, SABINA ŻOŁĘDOWSKA, WOJCIECH ŚLEDŹ, MAŁGORZATA GOLANOWSKA, NICOLE HUGOUIVIEUX-COTTE PATTAT, ALESSIO MENGONI	
<b>Nowe gatunki <i>Pectobacterium</i> i ich występowanie w Polsce</b> .....	39
MAŁGORZATA WALERON, AGNIESZKA MISZTAK JOANNA JOŃCA, KRZYSZTOF WALERON	
<b>Bioróżnorodność fitopatogenicznych bakterii z rodzaju <i>Pseudomonas</i>,</b> .....	43
<b>odkrycie gatunku <i>Pseudomonas cerasi</i> sp. nov. (non Griffin, 1911)</b>	
MONIKA KAŁUŻNA, JOANNA PUŁAWSKA, PIOTR SOBICZEWSKI	
<b>Zróżnicowanie genetyczne szczepów <i>Pseudomonas syringae</i> pv. <i>lachrymans</i></b> .....	49
RENATA SŁOWNICKA, HELENA OLCZAK-WOLTMAN, MAŁGORZATA SCHOLLENBERGER, MICHAŁ OSKIERA, KATARZYNA NIEMIROWICZ-SZCZYTT, GRZEGORZ BARTOSZEWSKI	
<b>„Omics” w badaniach nad bakteryjnymi patogenami roślin w Instytucie Ogrodnictwa</b> .....	55
JOANNA PUŁAWSKA, MONIKA KAŁUŻNA, ARTUR MIKICIŃSKI, WOJCIECH WARABIEDA, NEMANJA KUZMANOVIĆ, J.F. POTHIER	
<b><i>Erwinia amylovora</i> jako nekrotrof</b> .....	59
PIOTR SOBICZEWSKI, E.T IAKIMOVA, ARTUR MIKICIŃSKI, ELŻBIETA WĘGRZYNOWICZ-LESIAK, JOANNA PUŁAWSKA	

<b>Projekt PATBIOCON – Mieszanina efektywnych bakterii antagonistycznych</b> .....	63
<b>do kontroli mokrej zgnilizny ziemniaka w warunkach przechowywania i transportu</b>	
DOROTA M. KRZYŻANOWSKA, TOMASZ MACIĄG, JOANNA SIWIŃSKA, MARTA KRYCHOWIAK, SYLWIA JAFRA, ROBERT CZAJKOWSKI	
<b>Antagonizm wybranych szczepów ryzosfery roślin użytkowych względem patogenów</b> .....	65
<b><i>Dickeya solani</i>, <i>Pectobacterium parmentieri</i> i <i>Rhizoctonia solani</i> – mechanizm działania</b>	
DOROTA KRZYŻANOWSKA, ADAM OSSOWICKI, MAGDALENA RAJEWSKA, MAGDALENA JABŁOŃSKA, TOMASZ MACIĄG, PAOLINA GARBEVA, SYLWIA JAFRA	
<b>Gatunki bakterii o po raz pierwszy wykrytej zdolności do ochrony roślin</b> .....	67
<b>przed zarazą ogniową, Projekt BioSafeFood</b>	
ARTUR MIKICIŃSKI, PIOTR SOBICZEWSKI, JOANNA PUŁAWSKA	
<b>Eradykacja bakteryjnych patogenów roślin przy zastosowaniu wyladowań jarzeniowych</b> .....	71
<b>generowanych pod ciśnieniem atmosferycznym</b> .....	
AGATA MOTYKA-POMAGRUK, ANNA DZIMITROWICZ, PIOTR JAMRÓZ, EWA ŁOJKOWSKA, PAWEŁ POHL, WOJCIECH ŚLEDŹ	
<b>Białka różnicowe w bulwach odmian ziemniaka o różnym poziomie odporności</b> .....	75
<b>na bakterie <i>Dickeya solani</i></b> .....	
RENATA LEBECKA, ZOFIA MURAWSKA, KATARZYNA SZAJKO, JANUSZ DĘBSKI, MICHAŁ KISTOWSKI, WALDEMAR MARCZEWSKI	
<b>Aktualne kierunki badań nad bakteriozami roślin rolniczych w Instytucie Ochrony Roślin</b> .....	79
<b>– Państwowym Instytucie Badawczym</b> .....	
JOANNA KAMASA, KRZYSZTOF KRAWCZYK, AGNIESZKA ZWOLIŃSKA	
<b>Wykaz uczestników</b> .....	83

# Słowo wstępne

W bieżącym roku mija 140 lat od wykrycia pierwszej bakterii patogenicznej dla roślin – *Erwinia amylovora*, sprawcy zarazy ogniowej. Ta bardzo szkodliwa choroba znana była w Stanach Zjednoczonych już w końcu XVIII wieku, a jej etiologię przypisywano różnym czynnikom, zarówno biotycznym, jak i abiotycznym, tylko nie bakteriom. Prawidłowe zdiagnozowane zarazy ogniowej zapoczątkowało powstanie nauki o bakteryjnych chorobach roślin. Obecnie znanych jest około 200 gatunków bakterii fitopatogenicznych, a w ostatnich latach obserwujemy wzrost znaczenia gospodarczego chorób powodowanych zwłaszcza przez macerogeny i nekrogeny.

Prowadzone badania z zastosowaniem nowoczesnych metod biologii molekularnej i biochemii są ukierunkowane głównie na poznanie biologii bakterii i określenie ich stanowiska systematycznego, a dalej epidemiologii powodowanych przez nie chorób oraz opracowanie metod i strategii ochrony roślin przed bakteriozami.

W przedstawionych *Materiałach* zamieszczono obszernie streszczenia referatów z badań realizowanych w Międzyuczelnianym Wydziale Biotechnologii Uniwersytetu Gdańskiego i Gdańskiego Uniwersytetu Medycznego, Szkole Głównej Gospodarstwa Wiejskiego w Warszawie, Instytucie Ochrony Roślin – PIB w Poznaniu, Instytucie Hodowli i Aklimatyzacji Roślin – PIB w Radzikowie i w Oddziałach w Młochowie i Boninie oraz w Instytucie Ogrodnictwa w Skierniewicach. Niektóre z prezentowanych prac zostały wykonane w ramach współpracy z badaczami z renomowanych ośrodków zagranicznych: Bułgarii, Francji, Holandii, Niemiec, Szwajcarii i Włoch.

Symposium było również miłą okazją do wręczenia dwóm laureatkom tegorocznych nagród przyznanych przez Kapitułę „Nagrody Polskiego Towarzystwa Fitopatologicznego za dorobek publikacyjny polskiego naukowca – członka Polskiego Towarzystwa Fitopatologicznego”. Nagrody za badania nad bakteriozami roślin otrzymały dr Monika Kałużna z Instytutu Ogrodnictwa w Skierniewicach i mgr Agata Motyka z Uniwersytetu Gdańskiego.

Cieszy mnie także uczestnictwo w Symposiumie reprezentantów Uczelni, w których nie prowadzi się obecnie badań nad chorobami bakteryjnymi. Pozwolę sobie wyrazić nadzieję, że w niedalekiej przyszłości badania takie zostaną podjęte.

PROF. DR HAB. MAŁGORZATA MAŃKA, CZŁ. KORESP. PAN  
PRZEWODNICZĄCA ZARZĄDU GŁÓWNEGO PTFIT



# Rys historyczny badań nad chorobami bakteryjnymi roślin w Polsce

PIOTR SOBICZEWSKI

Instytut Ogrodnictwa, Skierniewice

e-mail: piotr.sobiczewski@inhort.pl

Powstanie nauki o bakteryjnych chorobach roślin, stanowiącej część szerzej rozumianej fitobakteriologii (nauki obejmującej m.in. badania nad niepatogennymi bakteriami endogennymi czy bakteriami epifitycznymi), wiąże się z odkryciami uczonych amerykańskich. Po raz pierwszy w 1878 roku, profesor Thomas Burrill z Uniwersytetu stanu Illinois wykazał, że bakterie, obok znanych wcześniej grzybów, powodują choroby roślin. W obserwowanym pod mikroskopem śluzowatym wycieku pobranym z zamierających drzew grusz stwierdził występowanie żywych bakterii, które nazwał *Micrococcus amylovorus*. Dwa lata później udowodnił, że wprowadzenie tego śluzu do zdrowych jabłoni spowodowało wywołanie objawów podobnych do tych, jakie występowały na chorych gruszach. Ze względu na objawy, gwałtowny przebieg i rozprzestrzenianie się choroby, nadał jej nazwę zaraza ogniowa (ang. *fire blight*). Burrill nie wyizolował jednak bakterii na sztucznej pożywce, ani nie sprawdził ich zdolności chorobotwórczych zgodnie z postulatami Kocha. Uczynił to dopiero w roku 1884 Joseph Arthur, pracujący na Uniwersytecie Cornella w stanie Nowy Jork, który przedstawił pierwszą w historii pracę doktorską na temat zarazy ogniowej (Van der Zwet i in., 2012).

Za twórcę nowoczesnej fitobakteriologii uważa się profesora Erwina F. Smitha prowadzącego badania na Uniwersytecie stanu Michigan. W roku 1905 opublikował on pierwsze oryginalne opracowanie na temat wykrytych do tego czasu fitopatogenów bakteryjnych, w tym sprawcy zarazy ogniowej, wówczas nazywanego *Bacillus amylovorus*. Niektórzy badacze kwestionowali jednak możliwość istnienia takich bakterii. Znana jest polemiczna dyskusja między Smithem a słynnym botanikiem i mikrobiologiem niemieckim Alfredem Fisherem, pracującym na Uniwersytecie w Lipsku. Opublikowana na łamach czasopisma „Zentralblatt für Bakteriologie”, zakończyła się pełnym sukcesem Smitha. W roku 1920 ukazał się pierwszy podręcznik jego autorstwa z wieloma fotografiami i rysunkami porażonych tkanek oraz komórek patogenicznych bakterii stanowiący fundament tej dziedziny fitopatologii (Smith, 1920). Opisał w nim 14 bakterioz oraz metody badania ich etiologii. Od imienia Smitha nadano nazwę *Erwinia* rodzajowi gramujemnych, pałeczkowatych, peritrichalnie urzęsionych bakterii.

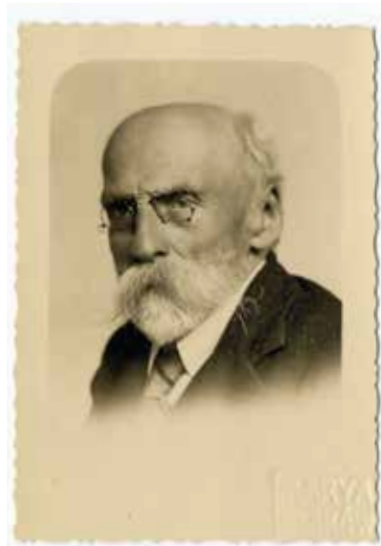
Niemal równocześnie z pierwszymi odkryciami amerykańskich i zachodnio-europejskich badaczy bakterii powodujących choroby roślin, m.in. J.H. Walkera i C.J.J. Halla, w Krakowie na Uniwersytecie Jagiellońskim, prowadził swe badania profesor **Piotr Józef Brzeziński** (1862–1939). Obok zainteresowań nowoczesną uprawą drzew owocowych i warzyw wniósł on wielki wkład w poznanie etiologii i epidemiologii raków drzew owocowych i leszczyny, udowadniając ich bakteryjne pochodzenie.

Wyniki swoich prac opublikował prof. Brzeziński w latach 1902–1904 roku, m.in. w formie rozprawy habilitacyjnej (Brzeziński, 1903). Swoje badania prowadził w Katedrze Anatomii i Fizjologii Roślin UJ kierowanej przez światowej sławy uczonego profesora Edwarda Janczewskiego oraz w Zakładzie Bakteriologii profesora Juliana Nowaka, późniejszego rektora UJ i premiera Rządu RP. Po dokładnej analizie mikroskopowej i anatomicznej porażonych gałęzi jabłoni, w maju 1899 r. stwierdził Brzeziński, że były one zasiedlone przez bakterie. Po kilku miesiącach uzyskał czyste kultury bakterii na pożywce agarowej, co m.in. pozwoliło na dokładne zbadanie ich patogeniczności. Zakażając zdrowe jabłonie wykazał, że bakterie rozmnażają się w tkankach i powodują charakterystyczne dla raka uszkodzenia drewna. Uznał je za pierwotnego sprawcę choroby i nazwał *Bacterium mali*.

Na szczególne podkreślenie zasługują wyniki badań prof. Brzezińskiego nad cechami fenotypowymi bakterii. Wykazał m.in., że *B. mali* ma kształt krótkiej pałeczki o długości około 2 mikronów i szerokości 0,6–0,7 mikrona. Jest ruchliwa i barwi się fuksyną, fioletem gencyanowym oraz fioletem metylowym. Jest tlenowcem. Na pożywce agarowej z brzeczka piwną tworzy wypukłe, okrągłe, białawo-szare kolonie, ma zdolność rozpuszczania żelatyny, bardzo wolno rozwija się już w temperaturze 0°C lub nieznacznie wyższej, a najlepiej w temperaturze około 20°C. Profesor opisał też dokładnie sposób izolacji bakterii z porażonych tkanek, zwracając szczególną uwagę na zachowanie aseptyki wszystkich czynności. Opisana metoda zasadniczo nie odbiega od stosowanej obecnie przez fitobakteriologów. Do epokowych należy zaliczyć jego szczegółowe prace dotyczące patogenyzy raka poparte licznymi rysunkami przedstawiającymi uszkodzenia komórek i tkanek spowodowane przez bakterie.

Patogeniczność *B. mali* badał prof. Brzeziński na młodych jabłoniach odmian: Kalwila Biała Zimowa, Reneta Szara Kanadyjska i Sztetyna Czerwona Zimowa, rosnących w pojemnikach oraz na odmianach: Pepina Linnego, Reneta Baumana i Reneta Kaselska rosnących w gruncie. Gałęzie drzew zakażał w drugiej połowie lata igłą uprzednio zanurzoną w czystej kulturze bakterii albo też poprzez nacinanie podłużne kory aż do miazgi, a następnie przeciągnięcie przez ranę zakażonej igły. W celu ochrony zakażonych ran przed wysychaniem i skażeniem zakładał na nie opatrunki z waty, które przytwierdzał pasemkami młodej kory. W ciągu 2–3 lat opisywał z drobiazgową dokładnością rozwijające się zmiany chorobowe dołączając do opisów unikatowe fotografie. Równocześnie prowadził szczegółowe obserwacje rozwoju raka na drzewach rosnących w sadach, wyróżniając takie jego formy, jak rak zwykły czyli powolny oraz zgorzelina czyli rak ostry.

Inną bakteriozą badaną przez profesora Brzezińskiego była guzowatość korzeni. Chociaż z bakteriami wyizolowanymi z korzeni przeprowadził podobną analizę bakteriologiczną i fitopa-



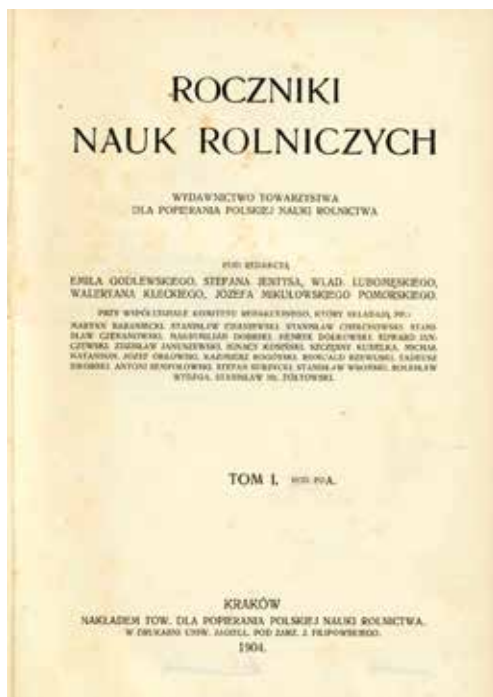
FOT. ARCHIWUM UJ



tologiczną, to nigdy nie uzyskał w wyniku inokulacji pędów typowych guzów, a jedynie zmiany o charakterze zrakowaceń. Niesłusznie doszedł też do wniosku o istotnym związku między bakteriami porażającymi nadziemną część roślin i korzenie. Nie on jeden w odniesieniu do guzowatości korzeni podał nieprawidłową diagnozę. Także wielu badaczy na Zachodzie, pracujących dziesiątki lat po profesorze Brzezińskim, nie znając rakotwórczej natury *Agrobacterium tumefaciens*, popełniało pomyłki. Dopiero odkrycia Belgów (Van Larebeke in., 1974) i Amerykanów (Chilton i in., 1977) w latach 1970. wykazały, że geny odpowiedzialne za patogeniczność tych bakterii są zlokalizowane na plazmidzie Ti i że w wyniku infekcji fragment tego plazmidu (oznaczony symbolem T-DNA) wbudowuje się do genomu rośliny powodując hiperplazję i hipertrofię. Wówczas bakterię tę zaliczono do onkogenów.

W trakcie badań nad etiologią raka jabłoni prof. Brzeziński zidentyfikował także sprawcę raka występującego na gruszach nadając mu nazwę *Bacterium pyri*. Opisał podstawowe cechy tej bakterii i przeprowadził testy patogeniczności udowadniając słabsze zdolności chorobotwórcze niż wykazywała je *B. mali* na jabłoniach. Równocześnie prowadził badania nad patogenezą choroby na gruszach oraz nad wyjaśnieniem przyczyn zgorzeli rozwijających się na krzewach leszczyny.

Obok prac nad patogenami bakteryjnymi jabłoni, gruszy i leszczyny prof. Brzeziński udowodnił także bakteryjne pochodzenie zrakowaceń występujących na drzewach pestkowych, którym często towarzyszyły gumowate wycieki. Stwierdził, że ich sprawca jest bardzo podobny do bakterii wywołujących raka na jabłoniach i gruszach, na których jednak nie obserwował tych wycieków. Dziś wiadomo, że gumoza występuje tylko na drzewach pestkowych, a mogą ją powodować różne czynniki zarówno pochodzenia biotycznego, w tym chorobotwórcze bakterie, jak i abiotycznego. Wniosek Profesora, że są to takie same lub podobne bakterie, znalazł potwierdzenie w badaniach przeprowadzonych później przez innych autorów, także w innych krajach.



Dokładnie w tym samym czasie, kiedy profesor Brzeziński formułował wnioski ze swoich pionierskich badań, w Holandii C.J.J. van Hall określił sprawcę bakteryjnej zgorzeli lilaka (1902), a w 1907 roku Niemcy R. Aderhold i W. Ruhland oznaczyli bakteryjnego sprawcę zamierania czereśni nazywając go *Bacillus spongiosus*. Ostatecznie po udowodnieniu przez Holendra polifagicznego charakteru wyizolowanej przez niego bakterii, jego nazwisko towarzyszy nazwie sprawcy raka bakteryjnego drzew owocowych. Obecnie uważa się, że *Pseudomonas syringae*, bo tak w końcu nazwano tę bakterię, poraża ponad 180 gatunków roślin, często odległych od siebie pod względem systematycznym. W jej obrębie wyróżniono liczne patowary, charakteryzujące chorobotwórcze zdolności poszczególnych szczepów.

Oceniając badania profesora P.J. Brzezińskiego należy podkreślić nie tylko ich wysoki poziom merytoryczny i szczegółowość, co wskazuje na jego ogromną docieklivość naukową, ale przede wszystkim doskonałą znajomość bakteriologii oraz anatomii i fizjologii roślin. Ponadto fakt, że napisane po francusku i niemiecku prace Profesora były cytowane przez autorów zagranicznych jeszcze po wielu latach od ich opublikowania, stawia go wśród uczonych – twórców fitobakteriologii europejskiej (Brzeziński, 1902, 1903, 1904). W uznaniu ogromnych zasług na polu naukowym, społecznym i organizacyjnym Profesor został odznaczony m.in. Krzyżem Oficerskim Odrodzenia Polski (1925), Medalem Niepodległości (1932) i Brązowym Medalem Uniwersytetu Jagiellońskiego „Za Długoletnią Służbę”.

Na uwagę zasługują również obserwacje profesora **Wincentego Siemaszki** (1887–1943), organizatora i pierwszego kierownika Katedry Fitopatologii w Szkole Głównej Gospodarstwa Wiejskiego w Warszawie. Dotyczyły one występowania guzowatości korzeni – choroby powodującej straty głównie w szkółkach drzew owocowych i róż. Ich efektem były 2 prace (Siemaszko, 1929a, b). W pracy opublikowanej w Polsce autor przedstawił odkrycia badaczy amerykańskich świadczące o bakteryjnym pochodzeniu tej choroby, opisał jej symptomy i rozwój oraz etiologię (Siemaszko, 1929b). Szczególna uwaga została zwrócona na cechy fenotypowe patogena, nazywanego wówczas *Bacterium tumefaciens*. Niejako przy okazji, Siemaszko wspomniał występowanie w środkowej Polsce innej choroby na korzeniach drzew owocowych – włosowatości korzeni, uważając, że powoduje ją ten sam patogen co guzowatość. Dziś wiemy, że sprawcami obu chorób są różne gatunki bakterii.

Badania nad bakteriami powodującymi guzowatość korzeni, nazywanymi wówczas *Pseudomonas tumefaciens* oraz bakteriami powodującymi włosowatość, nazywanymi *Phytomonas rhizogenes* prowadził również **Jan Paluch** studiujący na Uniwersytecie Jagiellońskim pod kierunkiem profesora Kazimierza Roupperta. Praca ukazała się w 1938 roku (za Majewskim, 2016).

Ośrodkiem szczególnie zasłużonym w badaniach nad guzowatością korzeni był Państwowy Instytut Gospodarstwa Wiejskiego w Puławach. W 1934 roku rozpoczęła tam badania **Krystyna Barbacka** starając się odpowiedzieć na najbardziej palące, ważne dla praktyki szkółkarskiej, pytania. Stwierdziła m.in., że *Bacterium tumefaciens*, chociaż jest polifagiem, wykazuje pewne „dostosowania” do roślin-gospodarzy, co stwarza możliwość selekcji roślin mniej podatnych na chorobę. Spośród drzew owocowych pestkowe są mniej podatne niż ziarnkowe. Barbacka udowodniła także, że szkodliwość choroby zaznaczała się szczególnie w początkowym okresie wzrostu drzewek dzikiej gruszy, a te silnie porażone zamierały, albo też rosły bardzo słabo. Zwróciła także uwagę na trudności w dezynfekcji gleby skażonej bakteriami guzowatości. Nie udało się jej uzyskać zmniejszenia porażenia korzeni drzewek po zastosowaniu takich środków jak: wapno palone, chlorek wapnia, kwas siarkowy, siarka i kainit oraz siarczan miedzi. Skuteczniejszym i tańszym zabiegiem okazała się ochrona przed zarażeniem przez zaprawianie korzeni drzewek przed posadzeniem w papce składającej się z wody, gliny i środka dezynfekcyjnego (1% ciecz bordoska, 1% siarczan miedzi, 0.5%

uspulun i siarka). Drzewka potraktowane w ten sposób wykazywały do 20% słabsze porażenie od nietraktowanych (Barbacka, 1937). Na podstawie uzyskanych wyników sformułowała ogólne zalecenia dla szkółkarzy. W latach 1937–1938 Barbacka opublikowała na temat choroby trzy artykuły oraz jedną ulotkę (za Majewskim, 2016).

Do poznania niektórych aspektów epidemiologii guzowatości oraz możliwości jej zwalczania istotnie przyczyniły się badania **Józefa Kolowcy** pracującego również w Puławach. Pod kierunkiem prof. K. Rouperta i dr. Jana Ślaskiego wykonał doświadczenia w szkółce drzewek w Broniszowie, w Kieleckim. W warunkach różnych typów gleb stwierdził m. in., że na glebie lekkiej, na korzeniach tworzyły się wyłącznie narośle miękkie, a na glebie alkalicznej – twarde. Środki takie jak: siarczan miedzi, kwas solny, siarczan amonu, kwaśna serwatka i zaprawa pylista „Ziarnik” ograniczają szkodliwość choroby. Jednak niektóre z nich, np. siarczan miedzi, zastosowane w nieodpowiednim rozcieńczeniu, mogą być fitotoksyczne. Poza tym usuwanie narośli nożem, lub przycinanie korzeni, gdy gleba lub sama roślina jest zakażona, zupełnie nie daje pożądanego rezultatu. Zawsze wytworzy się na tych ranach dużo nowych narośli, które przeszkadzają wyrastaniu młodych korzonków. Włosowate korzenie, nazywane „czarcimi miotłami” tworzą się wyłącznie na korzeniach jabłoni, podczas gdy grusze na tej samej glebie, i w sąsiedztwie jabłoni, nie tylko że nie wykazują objawów włosowatości, ale w przypadkach większego nasilenia guzowatości, brak u nich prawie zupełnie drobnych korzonków (Kolowca, 1937).

W Puławach badania nad bakteriozą liści tytoniu powodowaną przez *Bacterium tabacum* prowadził w roku 1926 r. **Lucjan Kaznowski** opisując m.in. stopień porażenia różnych odmian przez chorobę. Chorobom bakteryjnym poświęcił Kaznowski dużo miejsca w swoim podręczniku *Choroby tytoniu* opublikowanym w 1939 roku. Szczegółowo opisał w nim znane mu w Polsce choroby tej rośliny powodowane przez bakterie. Były to: brunatna bakterioza liści tytoniu (*Bacterium tabacum*), jesienna bakterioza (czarna rdza) liści tytoniu (*Bacterium angulatum*), biała bakterioza (biała rdza) liści tytoniu (*Bacillus maculicola*), brunatna plamistość liści machorki (pstrzyca liści; *Bacterium tabacum*) oraz śluzak czyli bakterioza łodyg i korzeni tytoniu (*Bacillus solanacearum*). (za Majewskim, 2016).



FOT. ARCHIWUM PTFE

Na Uniwersytecie Poznańskim badania nad bakteriozą obwódkową fasoli prowadził **profesor Karol Zaleski** (1890–1969). Choć głównym przedmiotem jego zainteresowań badawczych były grzyby jako patogeny roślin, to dzięki licznym pobytom w ośrodkach naukowych Europy Zachodniej i Stanów Zjednoczonych, w tym na Uniwersytecie Stanu Missouri i pracy pod kierunkiem wybitnego fitobakteriologa, profesora W. H. Burkholdera, zajął się też badaniami nad wymienioną bakteriozą (Burkholder, Zaleski, 1933).

Po powrocie do kraju profesor Zaleski kontynuował rozpoczęte w Stanach Zjednoczonych badania nad podatnością 140 odmian fasoli, które opublikował jako pracę habilitacyjną (Zaleski, 1933). Jest to bardzo obszerne studium powstałe w wyniku współpracy autora z różnymi zakładami naukowymi, producentami fasoli i firmami nasiennymi w całej Polsce. Badania prowadzono częściowo na poletkach, ale głównie w doświadczeniach wazonowych, w szklarni stosując inokulacje roślin w początkowej fazie ich rozwoju i oceniając stopień porażenia po 3 tygodniach, z zastosowaniem 6-stopniowej skali. Profesor wykazał, że wśród badanych odmian więcej było podatnych niż odpornych sugerując

podjęcie prac hodowlanych z wykorzystaniem genotypów charakteryzujących się wysoką odpornością. Przedstawiona praca, określana jako studium metodyczno-doświadczalne, obejmowała także informacje o historii badań nad bakteriozą obwódkową na świecie, szczegółowy opis symptomów chorobowych na różnych organach roślin, różne sposoby inokulacji roślin, pochodzenie badanych odmian, wirulencję zastosowanych szczepów patogena, sposób prowadzenia obserwacji i opracowania wyników oraz streszczenie w językach polskim i angielskim. Do pracy dołączono bogatą dokumentację fotograficzną. Profesor Zaleski prowadził także badania nad bakteriami towarzyszącymi chorobom wirusowym ziemniaka (Zaleski, Tychanicz, 1937). Były one ukierunkowane na sprawdzenie w naszych warunkach wyników badań prowadzonych w Belgii przez P. H. Biourge. Wyosobnione u nas z chorych bulw ziemniaka bakterie należały do gatunków *Bacillus mesentericus* (*B. m. vulgatus*, *B. m. ruber*, *B. m. fuscus* i *B. m. niger*) oraz *Bacillus subtilis* i *Bacillus candisus* Biourge. Opisano niektóre cechy fenotypowe tych bakterii, wykazując jednak, że nie powodują one objawów chorobowych na roślinach ziemniaka oraz że brak jest związku przyczynowego z porażeniem roślin przez wirusy. Późniejsze badania prowadzone przez innych autorów potwierdziły słuszność wyników badań prof. Zaleskiego. Na podkreślenie zasługuje również studium **Mirosława Tychanicza** nad czarną zgnilizną kapustnych wykonane 1939 pod kierunkiem profesora Ludwika Garbowskiego w PIGW, Oddział w Bydgoszczy. Autor przeanalizował otrzymany do zbadania materiał identyfikując sprawcę jako *Bacterium campestris* (za Majewskim, 2016).

## LITERATURA

- [1] Barbacka K., 1937. Obecny stan badań nad szkodliwością guzowatości drzew owocowych i jej zwalczaniem. Roczniki Ochrony Roślin tom 4, z. 3, 125-128.
- [2] Brzeziński P.J., 1903. Rak drzew, jego przyczyny i przejawy. Roczniki Nauk Rolniczych, t. 1, z.2, 221–276.
- [3] Brzeziński P.J., 1902. Etiologie du chancre et de la gomme des arbres fruitieres. Comptes rendus des seances de l'Academie des Sciences, Paris. 134, 1170–1173.
- [4] Brzeziński P.J., 1903. La chancre des arbres ses causes et ses symptomes. Bull. Ac. d. Sc. Cracovie, s. 195.
- [5] Brzeziński P.J., 1904. Einige Bemerkungen uber die Krebs-u. d. Gummikrankheit der Obstbaume. 1904. Zentralblatt f. Bakter. u. Parasitenkrankh. Jena, s. 632.
- [6] Burkholder W.H., Zaleski K., 1932. Varietal susceptibility of beans to an American and an European strain *Phytomonas medicaginis* v. *phaseolicola* and comparison of strains in culture. Phytopathology, 22, 85–115.
- [7] Chilton M-Dell, Drummond M.H., Merlo D.J., Sciaky D., Montoya A.L., Gordon M.P., Nester E.W., 1977. Stable incorporation of plasmid DNA into higher plant cells. the molecular basis of crown gall tumorigenesis, Cell. 11, 263–271.
- [8] Kolowca J., 1937. Guzowatość korzeni i próby jej zwalczania Rocznik Ochrony Roślin, tom 4 z. 3, 109–125.
- [9] Majewski T., 2016. Dzieje poznania chorób roślin w Polsce. Wyd. SGGW, s. 638.
- [10] Siemaszko W., 1929a. Phytopathologische Beobachtungen in Polen, Zentralblatt für Bakteriologie, Parasitenkunde und Infektionskrankheiten, II Abt. T. 78 Jena).
- [11] Siemaszko W., 1929b. Guzowatość korzeni drzew owocowych (*Bacterium tumefaciens* Sm. et Towns.), Choroby Roślin, Warszawa.
- [12] Smith E.F., 1920. An introduction to bacterial diseases of plants. Philadelphia. W. B. Saunders Company).
- [13] Van Larebeke N., G. Engler, M. Holsters, S. Van den Elsacker, I. Zaenen, R.A. Schilperoort, Schell J., 1974. Large plasmid in *Agrobacterium tumefaciens* essential for crown gall-inducing ability. Nature. 8, 252 (5479), 169–70.
- [14] Zaleski K., 1933. Względna odporność na bakteriozę obwódkową fasol uprawianych w Polsce. Roczniki Nauk Rolniczych i Leśnych, tom XXX, 1–77.
- [15] Zaleski K., Tychanicz M., 1937. Bakterie wewnętrzne ziemniaka i ich stosunek do chorób wirusowych ziemniaków. Roczniki Nauk Rolniczych i Leśnych, tom XLI, 392–396.

# Badania po 1945 roku

## Instytut Ochrony Roślin – Państwowy Instytut Badawczy

Badania zapoczątkowane w połowie lat pięćdziesiątych ubiegłego wieku dotyczyły początkowo bakterioz fasoli i soi. W kolejnych latach badania poszerzono o następujące zagadnienia: bakteriozy kolendry, bakterioza pierścieniowa ziemniaka (*Clavibacter michiganensis* ssp. *sepedonicus* (Cms)), czarna nóżka i mokra zgnilizna bulw ziemniaka (*Pectobacterium atrosepticum*, *Pectobacterium carotovorum* subsp. *carotovorum*), rak bakteryjny pomidora (*Clavibacter michiganensis* subsp. *michiganensis*), bakteryjna nekroza rdzenia łodyg pomidora (*Pseudomonas corrugata*), bakteryjna cętkowatość pomidora (*Pseudomonas syringae* pv. *tomato*).

Zagadnienia badawcze: identyfikacja bakteryjnych patogenów roślin i diagnostyka bakterioz, bioróżnorodność patogenów bakteryjnych, opracowanie metod dezynfekcji opakowań, narzędzi, maszyn oraz magazynów skażonych bakteriami Cms, skuteczność preparatów bakteriobójczych, badanie odporności odmian roślin na choroby bakteryjne powodowane przez *Pectobacterium carotovorum* i *P. atrosepticum*, skuteczność zapraw nasiennych w zwalczaniu bakterii fitopatogenicznych, badania nad strukturą populacji pektynolitycznych bakterii z rodzaju *Pseudomonas*, podatność odmian pomidora na bakteryjną cętkowatość pomidora, badania nad zastosowaniem pochodnych chityny (naturalnych polimerów) do zwalczania bakterii fitopatogenicznych, monitoring występowania chorób bakteryjnych kukurydzy w Polsce, badania nad rolą chwastów jako potencjalnego rezerwuaru bakterii patogenicznych dla kukurydzy, wykrywanie i identyfikacja fitoplazm w roślinach, diagnostyka chorób powodowanych przez fitoplazmy.

Ważniejsze wyniki/osiągnięcia: Opracowano metody sztucznej inokulacji oraz oceny stopnia porażenia bulw z objawami bakteriozy pierścieniowej, po raz pierwszy wykorzystano rośliny pomidora jako wskaźnik do testowania Cms, opracowano diagnostykę bakteriozy pierścieniowej ziemniaka w pozostałościach po przerobie przemysłowym bulw porażonych lub bezojawowo porażonych przez Cms, opracowano metodykę dezynfekcji opakowań, narzędzi, maszyn oraz magazynów skażonych bakteriami Cms i Cmm z zastosowaniem preparatów dostępnych na polskim rynku, opracowano diagnostykę zarazy ogniowej (*Erwinia amylovora*) z wykorzystaniem metod molekularnych i biochemicznych, opracowano metodę wykrywania infekcji latentnej w sadzonkach

pomidora przez Cmm, wykryto po raz pierwszy w Polsce bakteryjną nekrozę rdzenia łodyg pomidora oraz określono podatność kilku odmian pomidora na chorobę, stwierdzono po raz pierwszy w Polsce występowanie bakterii kwarantannowej *Clavibacter michiganensis* ssp. *insidiosus* (Cmi), udowodniono ograniczenie rozwoju bakteryjnej cętkowatości pomidora na roślinach po zastosowaniu wybranych pochodnych chityny oraz wykazano, że ich działanie było związane z indukcją systemicznej odporności nabytej (SAR – Systemic Acquired Resistance), przeprowadzono po raz pierwszy w Polsce monitoring występowania chorób bakteryjnych kukurydzy na terenie kraju i utworzono kolekcję 170 izolatów bakterii patogenicznych dla kukurydzy, które scharakteryzowano za pomocą testów patogeniczności oraz testów fizjologiczno-biochemicznych, serologicznych i molekularnych, wykryto trzy nowe, nieodnotowane dotąd w Polsce bakteryjne patogeny kukurydzy: *Pantoea ananatis*, *Enterobacter cloacae* subsp. *dissolvens*, *Pantoea agglomerans*, wykryto występowanie (w niektórych przypadkach po raz pierwszy) kilku grup fitoplazm na następujących roślinach: pomidor (16Sr I-C rDNA), groch (XII-A), lucerna (I), tuja (I) i rzepak (I-B) – prace nad fitoplazmami prowadzone są m.in. w ramach projektu europejskiego COST FA0807, wykonano liczne ekspertyzy dotyczące bakterioz roślin,

Badania prowadzili: Krystyna Adamczyk, Antoni Golenia, Maria Pajewska, Lena Żołobowska, Henryk Pospieszny, Bogusław Borowicz, Anna Maćkowiak-Sochacka, Joanna Kamasa, Krzysztof Krawczyk, Agnieszka Zwolińska,

OPRACOWAŁ DR KRZYSZTOF KRAWCZYK

## Instytut Hodowli i Aklimatyzacji Roślin – Państwowy Instytut Badawczy

Zakład Fitopatologii, Pracownia Organizmów Kwarantannowych  
IHAR-PIB w Radzikowie

Prowadzono badania nad kwarantannowymi bakteriami powodującymi choroby ziemniaka: *Clavibacter michiganensis* subsp. *sepedonicus* i *Ralstonia solanacearum*.

Zagadnienia badawcze: 1. wykrywanie i doskonalenie laboratoryjnych metod diagnostyki bakterii *R. solanacearum* w bulwach ziemniaka, wodzie, ściekach i odpadach poprodukcyjnych przemysłu spożywczego, 2. doskonalenie i zastosowanie molekularnych metod wykrywania oraz różnicowania szczepów bakterii *C. sepedonicus* – sprawy bakteriozy pierścieniowej ziemniaka.

Ważniejsze wyniki/osiągnięcia:

I. *Ralstonia solanacearum*

1. prowadzenie doświadczeń mających na celu identyfikację bakterii *Ralstonia solanacearum* w wiązkach przewodzących bulw ziemniaka z wykorzystaniem testu immunofluorescencji oraz techniki PCR z zestawem starterów specyficznych, 2. doskonalenie metod wykrywania ww. bakterii

kwarantannowej w wodzie, ściekach oraz odpadach poprodukcyjnych, 3. opracowanie skutecznych metod całkowitej eliminacji, bądź ograniczenia przeżywalności bakterii na różnych podłożach tj. w/na tkankach ziemniaka, drewnie, plastiku oraz metalu. W tym celu przetestowano różne preparaty dezynfekcyjne, w tym wprowadzony do sprzedaży preparat HuwaSan50. Ponadto w celach poznawczych i praktycznych prowadzona jest ocena podatności wybranych polskich genotypów ziemniaka na porażenie różnymi stężeniami bakterii oraz ocena wirulencji szczepów patogena. W trakcie realizacji wymienionych prac badawczych opublikowano pracę przeglądową z zakresu biologii i epidemiologii bakterii pt. *Ralstonia solanacearum – sprawca śluzaka roślin psiankowatych* 2006 r. Biuletyn IHAR nr 242.

## II. *Clavibacter sepedonicus*

W trakcie realizacji programów wieloletnich IHAR-PIB zgromadzono kolekcję 300 izolatów bakterii Cms pochodzących z różnych regionów geograficznych Polski. W ramach współpracy z Gruzją realizowano projekt pt. “Potato ring rot causative Cms specific bacteriophages morphology, properties and genome” (2014 – 2017 r.). Efektem projektu była identyfikacja i zbadanie zakresu zmienności zdolności chorobotwórczych izolatów polskich i gruzińskich. Izolaty scharakteryzowano także pod względem cech biochemicznych, biologicznych i zmienności genetycznej.

Na podstawie prowadzonych badań obejmujących zarówno tematykę badawczą realizowaną w programach wieloletnich IHAR-PIB, jak i w działalności statutowej została wykonana praca doktorska pt. „Analiza zmienności genetycznej metodami molekularnymi wybranych izolatów z populacji bakterii *Clavibacter michiganensis* subsp. *sepedonicus* (Spieckermann & Kotthoff) Davis i in.” (Agnieszka Maciejewska, 2018 r.). Zoptymalizowano metodę PCR MP z uwagi na dużą siłę rozdzielczości genetycznego różnicowania izolatów Cms zalecana jest do stosowania w molekularnych badaniach struktury populacji tej bakterii. Wbrew niejednokrotnie wyrażanym w literaturze przedmiotu poglądom o niskim zróżnicowaniu wirulencji w populacjach Cms efektem pracy było także udowodnienie istotnego zróżnicowania genetycznego i chorobotwórczego badanej populacji izolatów. Ujmując problem bardziej obrazowo, udowodniono, że populacja Cms nie jest jednym wielkim izolatem a zbiorowiskiem wielu izolatów (szczepów) istotnie różniących się pod względem wirulencji, cech biochemicznych i biologicznych.

Badania prowadzili: Edward Arseniuk, Agnieszka Maciejewska, Anna Przetakiewicz.

OPRACOWAŁ PROF. DR HAB. EDWARD ARSENIUK

## Zakład Genetyki i Materiałów Wyjściowych Ziemniaka, Oddział w Młochowie

Badania podjęte w latach 80. XX w. dotyczyły szeroko pojętej interakcji ziemniaka i bakterii pektynolitycznych powodujących czarną nóżkę ziemniaka i mokrą zgniliznę bulw ziemniaka.

Zagadnienia badawcze: doskonalenie laboratoryjnych metod oceny odporności ziemniaka (rodów i odmian) na bakterie pektynolityczne w infekcjach czysto bakteryjnych i mieszanych, charakteryzowanie nowych źródeł odporności w diploidalnych mieszańcach międzygatunkowych dzikich i prymitywnie uprawianych gatunków *Solanum*, synteza materiałów wyjściowych 2x i 4x o pod-

niesionej odporności na mokrą zgniliznę bulw ziemniaka, mapowanie w genomie ziemniaka QTL odporności na mokrą zgniliznę bulw oraz porażenie liści przez bakterie z rodzaju *Pectobacterium*, charakteryzowanie odporności ziemniaka na bakterie z zastosowaniem technik biologii molekularnej i badań proteomicznych, kolekcja izolatów bakterii, diagnostyka bakterii z rodzaju *Pectobacterium* i *Dickeya* z zastosowaniem technik biologii molekularnej i ocena wirulencji izolatów.

Ważniejsze wyniki/osiągnięcia: dopracowanie metod izolacji i diagnostyki bakterii pektynolitycznych patogenicznych dla ziemniaka, opracowanie różnych metod oceny odporności ziemniaka na czarną nóżkę i mokrą zgniliznę bulw, opracowanie metody izolacji białka z bulw ziemniaka do badań proteomicznych, przeniesienie na poziom tetraploidalny w wyniku krzyżowania  $4x-2x$  wysokiej odporności na mokrą zgniliznę bulw z  $2x$  mieszańców międzygatunkowych *Solanum* (*S. chacoense*, *S. phureja* i *S. yungasense*), przekazanie wysokoodpornych na bakterie materiałów wyjściowych do hodowli nowych odmian, z których wyhodowano odmiany o podwyższonej odporności na mokrą zgniliznę bulw (Mieszko, Tajfun, Sonda), skonstruowanie pierwszej w świecie mapy genetycznej QTL odporności na bakterie z rodzaju *Pectobacterium* bulw i liści ziemniaka, która zlokalizowała w genomie ziemniaka QTL na 10 z 12 chromosomów ziemniaka, jednocześnie wykazując częściową niezależność odporności na bakterie różnych organów roślin ziemniaka (bulwa i łodyga).

Badania prowadzili: Ewa Zimnoch-Guzowska, Renata Lebecka, Waldemar Marczewski, Bogdan Flis, Jadwiga Pietrak, Zofia Murawska, Anna Grupa-Urbańska, Krystyna Michalak.

OPRACOWAŁY:  
DR HAB. RENATA LEBECKA, PROF. NADZW. IHAR-PIB,  
PROF. DR HAB. EWA ZIMNOCH-GUZOWSKA

## Pracownia Chorób i Szkodników Kwarantannowych Ziemniaka, Oddział w Bydgoszczy

Korzenie historyczne obecnie istniejącej Pracowni Chorób i Szkodników Kwarantannowych Ziemniaka sięgają lat międzywojennych. Prace dotyczące chorób i szkodników ziemniaka prowadzone są w Bydgoszczy od 1926 roku. Jednostka jako jedna z pierwszych placówek naukowych w Polsce podjęła tematykę dotyczącą biologii *Clavibacter michiganensis* subsp. *sepedonicus* (Cms) oraz epidemiologii bakteriozy pierścieniowej ziemniaka.

Zagadnienia badawcze: W Pracowni prowadzona jest od wielu lat ocena genotypów ziemniaka pod kątem podatności na porażenie przez Cms oraz analiza patogeniczności populacji bakterii wyizolowanych na terenie Polski. Ważnymi zagadnieniami są badania metod chemicznej i biologicznej inaktywacji Cms.

Ważniejsze wyniki/osiągnięcia: Opracowane metodyki badań pozwoliły, w znacznym stopniu, doprecyzować warunki prowadzonych doświadczeń nad trudnym w identyfikacji mikroorganizmem. W ramach działalności Pracowni zostało przebadane przeszło 80 odmian ziemniaka pod kątem podatności na porażenie przez Cms.



Pracownia uczestniczyła w szkoleniach i organizowaniu zaplecza badawczego w laboratoriach służb fitosanitarnych oraz upowszechniała wiedzę o kwarantannowych chorobach ziemniaka.

Badania prowadzili: Piotr Leszczeko, Kazimierz Malec, Krystyna Stefan, Elżbieta Malinowska, Teresa Pastuszewska, Grzegorz Gryń

OPRACOWAŁ DR GRZEGORZ GRYŃ

## Zakład Nasiennictwa i Ochrony Ziemniaka, Oddział w Boninie (wcześniej Instytut Ziemniaka w Boninie)

Prace badawcze podjęte pod koniec lat 60. XX w. wiązały się z początkami Instytutu Ziemniaka i dotyczyły epidemiologii, bakteriologii, diagnostyki oraz podstaw hodowli odpornościowej ziemniaka na bakteriozy. Obecnie większość badań dotyczących patogenów bakteryjnych wykonywana jest w ramach Pracowni Diagnostyki Molekularnej i Biochemii.

Zagadnienia badawcze: usprawnienie istniejących oraz opracowanie nowatorskich testów diagnostycznych z zastosowaniem technik immunologicznych, mikrobiologicznych, molekularnych do wykrywania i identyfikacji bakteryjnych (w szczególności kwarantannowych) patogenów ziemniaka, sprawców śluzaka ziemniaka (*Ralstonia solanacearum*) oraz bakteriozy pierścieniowej ziemniaka (*Clavibacter michiganensis* ssp. *sepedonicus*), opracowanie nowatorskich materiałów diagnostycznych, poliklonalnych przeciwciał króliczych oraz markerów molekularnych do izolacji i identyfikacji patogenów bakteryjnych ziemniaka, różnicowanie szczepów patogenów, diagnostyka w ocenie podatności odmian ziemniaka na porażenie bakteriami Cms, opracowanie bio- i nanocząsteczek służących do zwalczania i inaktywacji patogenów bakteryjnych ziemniaka.

Ważniejsze wyniki/osiągnięcia: opracowano sposoby pozyskiwania wysoce specyficznych poliklonalnych przeciwciał króliczych skierowanych na komórki bakterii kwarantannowych ziemniaka oraz opracowano startery reakcji PCR, Real-Time i LAMP do ich identyfikacji, opracowano metodyki syntezy i koniugacji nanocząsteczek koloidów metali (złota, srebra, platyny i miedzi) z cząstkami receptorowymi (IgG, sondami DNA), jak również sposoby wytwarzania i modyfikacji nowych materiałów na bazie polimerów naturalnych i syntetycznych służących opracowaniu wysoce specyficznych immunopodłoży do selektywnej izolacji i identyfikacji bakteryjnych patogenów ziemniaka. Opracowano i usprawniono również metodykę przyżyciowej izolacji patogenów bakteryjnych oraz izolacji i identyfikacji DNA badanych bakterii z trudnych diagnostycznie prób środowiskowych. Oryginalność tych badań potwierdzono m. in. uzyskaniem ośmiu (w tym dwóch międzynarodowych) patentów oraz przyznaniem dla IHAR-PIB dwóch ogólnopolskich wyróżnień, w tym projakościowego znaku „Jakość Roku 2010”. Uniwersalność opracowanych testów pozwala na rozszerzenie badań nie tylko na inne patogeny ziemniaka, lecz również na patogeny bakteryjne innych roślin.

Ponadto, w ramach prowadzonych badań wyizolowano i zidentyfikowano białka i peptydy ziemniaka posiadające aktywność peroksydazową, antibakteryjną i antygrzybową. Badano również wzajemne oddziaływanie zróżnicowanych mukoidalnie szczepów bakterii Cms, jak i ich oddziaływanie z innymi patogenami ziemniaka, mikroorganizmami środowiskowymi oraz roślinami ziemniaka.

Opracowano sposoby wytwarzania substancji na bazie bio- i nanotechnologii, służących dezynfekcji i inaktywacji sprawców chorób kwarantannowych ziemniaka, jak również zapewnieniu zdrowotności mikrobiologicznej materiałów wyjściowych znajdujących się w Banku Zasobów Genowych In Vitro Ziemniaka w Boninie.

ZNiOZ w Boninie organizuje coroczne szkolenia dla służb fitosanitarnych PIORiN oraz upowszechnia wiedzę na temat bakteryjnych (w tym kwarantannowych) chorób ziemniaka.

Badania prowadzili: Wiesława Lewosz, Jadwiga Komorowska-Jędrys, Elżbieta Malinowska, Jerzy Lewosz, Ewa Łojkowska, Teresa Pastuszewska, Krzysztof Treder, Agnieszka Przewodowska, Włodzimierz Przewodowski, Katarzyna Salamońska, Wioleta Stochła, Dorota Szarek.

OPRACOWAŁ DR INŻ. WŁODZIMIERZ PRZEWODOWSKI

## Instytut Ogrodnictwa w Skierniewicach

Zakład Fitopatologii (przed reorganizacją Instytut Sadownictwa i Kwaciarnictwa im. Szczepana Pieniążka oraz Instytut Warzywnictwa im. Emila Chroboczka)

Badania podjęte w 1965 roku dotyczyły początkowo zarazy ogniowej (*Erwinia amylovora*) i raka bakteryjnego drzew pestkowych (*Pseudomonas syringae*). W kolejnych latach prace rozszerzono o guzowatość korzeni (*Agrobacterium tumefaciens*), a następnie bakteryjną zgorzel orzecha włoskiego (*Xanthomonas arboricola* pv. *juglandis*) i leszczyny (*Xanthomonas arboricola* pv. *corylina*), bakteryjną kanciastą plamistość liści truskawki (*Xanthomonas fragariae*), bakteriozy derenia jadalnego i borówki wysokiej (*Pseudomonas* spp.), bakteryjną plamistość pieczarki (*Pseudomonas tolaasii*) oraz bakteryjną cętkowatość pomidora (*Pseudomonas syringae* pv. *tomato*).

Zagadnienia badawcze: etiologia i epidemiologia chorób, bioróżnorodność patogenów bakteryjnych, prognozowanie zarazy ogniowej, podatność genotypów jabłoni na zarazę ogniową, opracowanie i udoskonalenie metod ochrony roślin przed bakteriozami, w tym z wykorzystaniem czynników biologicznych, choroba replantacji sadów, genetyka i ekologia bakterii fitopatogenicznych, opracowanie podstaw hodowli odpornościowej wybranych roślin ogrodniczych na bakteriozy oraz opracowanie metod diagnostycznych z zastosowaniem technik biologii molekularnej, taksonomia bakteryjnych patogenów roślin z wykorzystaniem genomiki i bioinformatyki, a także prace nad molekularnymi aspektami interakcji patogenów z roślinami na poziomie ekspresji genów (transkryptomika).

Ważniejsze wyniki/osiągnięcia: opracowanie szybkich, nowatorskich metod wykrywania: tumorigennych bakterii kompleksu *Agrobacterium/Rhizobium* w glebie, *Erwinia amylovora* w materiale roślinnym oraz ras *Pseudomonas syringae* pv. *morsprunorum* w materiale roślinnym, wykrycie i zidentyfikowanie po raz pierwszy w Polsce bakterii: i/ *Xanthomonas arboricola* pv. *corylina* oraz pv. *juglandis* – sprawców, odpowiednio bakteryjnej zgorzeli leszczyny i orzecha włoskiego, ii/ *Xanthomonas axonopodis* pv. *dieffenbachiae* – sprawcy bakteryjnej plamistości na anturium,

iii/ *Acidovorax cattleyae* – sprawcy bakteryjnej brązowej plamistości *Phalenopsis*, iv/*Paenibacillus polymyxa* i innych pektynolitycznych bakterii – sprawców bakteryjnej miękkiej zgnilizny cantedeskiej. W badaniach nad zróżnicowaniem genetycznym ważnym było wykazanie przydatności techniki PCR MP do rozróżniania patowarów i ras bakterii *Pseudomonas syringae* – sprawców raka bakteryjnego, a także patowarów z gatunku *X. arboricola*. Innymi ważnymi osiągnięciami są: wyselekcjonowanie efektywnych bakterii do ochrony jabłek przed chorobami przechowalniczymi oraz zarazą ogniową, opracowanie molekularnej metody identyfikacji genów odporności pomidora na bakteryjną cętkowość, wyhodowanie wysoko odpornych genotypów pomidora na bakteryjną cętkowość, opracowanie i opatentowanie wspólnie z Pabianickimi Zakładami Farmaceutycznymi „Polfa” biopreparatu Polagrocyna przeciwko guzowatości korzeni oraz preparatu Hortocyna przeciwko zarazie ogniowej, opracowanie metod i procedur wykrywania i identyfikacji patogenów bakteryjnych roślin sadowniczych, scharakteryzowanie czterech nowych plazmidów bakterii *E. amylovora*, opracowanie metody izolacji mRNA *E. amylovora* oraz *Xanthomonas fragariae* z czystej kultury bakteryjnej i materiału roślinnego, odkrycie nowych gatunków bakterii: *Rhizobium skierniewicense*, *R. nepotum*, *R. tumorigenes*, *Agrobacterium arsenijevicei*, *A. rosae*, *Pararhizobium polonicum*, *Pseudomonas cerasi*.

Badania prowadzili: Zbigniew Borecki, Krystyna Łyskanowska, Andrzej Burkowicz, Piotr Sobiczewski, Joanna Puławska, Elżbieta Kozik, Jan Szymański, Monika Kałużna, Władysław Macias, Artur Mikiciński, Marzena Nowakowska, Stanisław Berczyński, Jolanta Bogatko, Stanisław A. Piotrowski, Wawrzyniec Podrzucki.

OPRACOWAŁ  
PROF. DR HAB. PIOTR SOBICZEWSKI

## Szkoła Główna Gospodarstwa Wiejskiego w Warszawie

Wydział Ogrodnictwa, Biotechnologii i Architektury Krajobrazu  
Katedra Genetyki, Hodowli i Biotechnologii Roślin

Badania dotyczące bakteryjnej kanciastej plamistości ogórka (*Pseudomonas syringae* pv. *lachrymans*) prowadzone są od 2001 roku.

Zagadnienia badawcze: zróżnicowanie genetyczne szczepów wywołujących bakteryjną kanciastą plamistość ogórka; identyfikacja plazmidów i efektorów wirulencji patowaru *lachrymans*; poszukiwanie źródeł odporności ogórka na kanciastą plamistość i mapowanie genów odporności; molekularne aspekty interakcji *P. syringae* pv. *lachrymans* – ogórek; opracowanie podstaw hodowli odpornościowej ogórka na kanciastą plamistość.

Ważniejsze wyniki/osiągnięcia: (1) opracowano metodykę wykonywania testów podatności ogórka na kanciastą plamistość wywoływaną przez *P. syringae* pv. *lachrymans*; (2) utworzono kolekcję szczepów *Pseudomonas* spp. wyizolowanych z liści roślin dyniowatych; (3) wykonano klasyfikację

zebranych szczepów oceniając ich wirulencję, wykonując testy biochemiczne i analizy molekularne oraz wytypowano szczepy reprezentujące patowar *lachrymans*; (4) stwierdzono występowanie dwóch różniących się grup szczepów w obrębie patowaru *lachrymans*; (5) zsekwencjonowano genom wysoce wirulentnego szczepu 814/98 i wykonano analizy plazmidów oraz zidentyfikowano efekторы wirulencji występujące u tego szczepu; (6) w genomie ogórka zmapowano gen *psl* i loci odporności *psl5.1* i *psl5.2* na kanciastą plamistość; (7) wykonano profilowanie transkryptomiczne i zidentyfikowano geny ogórka ulegające zróżnicowanej ekspresji w pierwszej fazie przebiegu bakteryjnej kanciastej plamistości; (8) wykonano ocenę podatności linii i odmian ogórka gruntowego na kanciastą plamistość, w tym polskich linii hodowlanych i odmian komercyjnych.

Badania prowadzili: Helena Olczak-Woltman, Renata Słomnicka, Katarzyna Niemirowicz-Szczytt, Małgorzata Schollenberger i Grzegorz Bartoszewski. Ponadto z zespołem współpracowali: Aleksander Masny z Instytutu Biotechnologii i Antybiotyków w Warszawie oraz Michał Oskiera z Zakładu Mikrobiologii Instytutu Ogrodnictwa w Skierniewicach.

OPRACOWALI: DR HELENA OLCZAK-WOLTMAN,  
PROF. DR HAB. GRZEGORZ BARTOSZEWSKI

## Samodzielny Zakład Fitopatologii (dawniej Katedra Fitopatologii)

Badania dotyczące chorób bakteryjnych roślin są prowadzone od początku lat 70. XX wieku

Zagadnienia badawcze: etiologia i epidemiologia bakterioz roślinnych, ocena podatności materiałów hodowlanych na bakteriozy, bioróżnorodność patogenów, opracowanie charakterystyk fenotypowych fitopatogenicznych bakterii, bakterie i produkty naturalnego pochodzenia w ochronie roślin przed chorobami bakteryjnymi.

Ważniejsze wyniki/osiągnięcia: wykrycie i opisanie po raz pierwszy w Polsce gatunków bakterii: *Pseudomonas syringae* pv. *morsprunorum* – sprawcy raka bakteryjnego drzew pestkowych, *Pseudomonas savastanoi* pv. *glycinea* – sprawcy bakteryjnej plamistości soi, *Xanthomonas translucens* pv. *traslucens* – sprawcy czernienia plew pszenicy, *Xanthomonas translucens* pv. *graminis* – sprawcy bakteryjnego wędnięcia życicy trwałej, *Xanthomonas hortorum* pv. *hederae* – sprawcy bakteryjnej plamistości bluszczu, *Burkholderia gladioli* – sprawcy bakteryjnej pierścienowej zgorzeli łodygi eustomy, oceniono podatność odmian pelargonii rabatowej i bluszczolistnej na bakteryjną zarazę pelargonii (*Xanthomonas hortorum* pv. *pelargonii*) oraz odmian chryzantemy na guzowatość (tumorogenne bakterie z rodziny Rhizobiaceae), opracowano metodę oceny podatności materiałów hodowlanych fasoli na ostrą bakteriozę fasoli (*Xanthomonas axonopodis* pv. *phaseoli*), określono znaczenie raka bakteryjnego drzew owocowych (*Pseudomonas syringae* pv. *syringae*) w uprawach gruszy azjatyckiej.

Badania prowadziły: Małgorzata Schollenberger, Krystyna Łyskanowska.

OPRACOWAŁA DR HAB. MAŁGORZATA SCHOLLENBERGER, PROF. NADZW. SGGW

# Uniwersytet Przyrodniczy w Poznaniu

Wydział Ogrodnictwa i Architektury Krajobrazu,  
Katedra Fitopatologii i Nasiennictwa (w latach 1996–2008  
Akademia Rolnicza im. Augusta Cieszkowskiego, Katedra Fitopatologii)

Badania podjęte w 1975 roku dotyczyły czarnej nóżki ziemniaka (*Erwinia carotovora*/Jones/Bergey et al., var. *atroseptica*/Van Hall/Dye).

Zagadnienia badawcze: 1/ Źródła czarnej nóżki ziemniaka: występowanie choroby w zależności od przystolonowego porażenia ziemniaków i warunków atmosferycznych, wpływ inokulacji sadzeniaków ziemniaka na występowanie choroby, wpływ inokulacji sadzeniaków i łodyg ziemniaka na występowanie choroby w zależności od przedplonu. 2/ Znaczenie selekcji negatywnej i zaprawiania sadzeniaków w ograniczaniu występowania czarnej nóżki ziemniaka: występowanie choroby i wpływ selekcji negatywnej na jej pojaw, wpływ zaprawiania sadzeniaków (bez lub z dodatkiem antybiotyku) na występowanie choroby. 3/ Występowanie i wielkość populacji *E. carotovora* var. *atroseptica* oraz czynniki stymulujące pojaw czarnej nóżki w okresie wegetacji: izolacje drobnoustrojów z bulw porażonych przystolonowo, wpływ wiosennego przygotowania sadzeniaków do badań na występowanie patogena w ich zewnętrznej warstwie, przeżywalność *E. carotovora* var. *atroseptica* w glebie, wpływ metabolitów grzyba *Rhizoctonia solani* na wzrost *E. carotovora* var. *atroseptica*, wpływ usuwania z pola roślin ziemniaka z objawami czarnej nóżki na wielkość populacji sprawcy choroby w glebie, wpływ fungicydów Dithane M-45 i Rizoktonu na wzrost *E. carotovora* var. *atroseptica*, wpływ 24-godzinnego utrzymywania w wodzie bulw ziemniaka przed ich sadzeniem na występowanie czarnej nóżki

Ważniejsze wyniki/osiągnięcia: wykazanie, po raz pierwszy w warunkach Polski, ograniczającego wpływu niższej temperatury (14,1°C), utrzymującej się w pierwszej połowie okresu wegetacji, na pojaw czarnej nóżki ziemniaka; wykazanie, że temperatury 16,1°C i 16,7°C bardziej sprzyjały występowaniu choroby; wykazanie, że termin inokulacji (jesień, zima, wiosna) sadzeniaków zawiesiną bakterii *E. carotovora* var. *atroseptica*, zwłaszcza ich części wierzchołkowej, wpływa nie tylko na zwiększenie liczby roślin chorych, ale także na termin pojawienia się choroby; wykazanie, że głównym, a przy zachowaniu wszystkich zasad płodozmianu i uprawy – praktycznie jedynym źródłem czarnej nóżki ziemniaka są sadzeniaki; wykazanie, że układ temperatur i oddziaływanie innych drobnoustrojów oraz obecność resztek porażonych roślin są czynnikami decydującymi o przeżywalności sprawcy choroby; wykazanie, że występowanie czarnej nóżki ziemniaka w większym stopniu zależy od warunków przechowywania i traktowania (np. sortowania) sadzeniaków niż od nasilenia tej choroby w poprzednim okresie wegetacji; wskazanie, że usuwanie z pola roślin z objawami czarnej nóżki ziemniaka należy traktować jako zabieg ograniczający gnicie bulw w czasie przechowywania i pojaw choroby w następnym okresie wegetacji; wskazanie, że przy zaprawianiu ziemniaków przeciwko rizoktoniozie z zastosowaniem preparatów Rizokton i Dithane M-45 należy zwracać uwagę, aby nie powstawały warunki stresowe dla sadzeniaków (nagle zmiany temperatury, brak tlenu i inne), które mogą uaktywnić infekcje bezobjawowe i zwiększyć nasilenie choroby.

Badania wykonał: Zbigniew Weber.

Wcześniej badania nt: etiologii, epidemiologii i zwalczania bakteryjnego gnicia róż kalafiora (*Pseudomonas maculicola*), bakteryjnej karłowatości goździka (*Erwinia parthenii* var. *dianthicola*), bakteryjnego pęknięcia łodyg goździka (*Pseudomonas caryophylli*) przeprowadził Tadeusz Glaser.

OPRACOWAŁ PROF. DR HAB. PIOTR SOBICZEWSKI

## Katedra Dendrologii, Sadownictwa i Szkółkarstwa (do roku 1972 Wyższa Szkoła Rolnicza, Katedra Sadownictwa)

Badania podjęte w 1963 roku dotyczyły raka bakteryjnego drzew owocowych (*Pseudomonas syringae*) na czereśniach uprawianych w Wielkopolsce.

Zagadnienia badawcze: symptomatyka, występowanie oraz szkodliwość raka bakteryjnego czereśni, etiologia choroby i jej zwalczanie, podatność odmian czereśni na chorobę.

Ważniejsze wyniki/osiągnięcia: stwierdzenie epifitozyjnego nasilenia choroby w sadach w okolicach Poznania, w latach 1963–1965, i określenie rocznego wskaźnika śmiertelności drzew od 1,9 do 8,1%; wykazanie, na podstawie charakterystyki fenotypowej wyizolowanych bakterii, że sprawcą raka bakteryjnego jest *Pseudomonas syringae*; wykazanie, że okresem najbardziej sprzyjającym izolacji bakterii z porażonych organów drzew jest jesień, zima i wiosna; wykazanie wysokiej wirulencji badanych bakterii w stosunku do pędów czereśni, pędów lilaka oraz owoców cytryny; wykazanie, że krótkopędy owocowe czereśni były najbardziej podatnym organem drzew na porażenie, a do infekcji dochodziło przez blizny poliściowe, pąki liściowe i kwiatowe oraz wszelkiego rodzaju rany; wykazanie ujemnego wpływu antypki na zdrowotność okulizowanych na niej niektórych odmian czereśni oraz, że te same odmiany szczepione na dzikiej czereśni były słabiej porażone; udowodnienie wysokiej skuteczności cieczy bordoskiej w zwalczaniu choroby oraz podobnej skuteczności strepromycyny.

Badania wykonał: Walenty Babilas.

OPRACOWAŁ PROF. DR HAB. PIOTR SOBICZEWSKI

## Uniwersytet Przyrodniczy w Lublinie

Wydział Ogrodnictwa i Architektury Krajobrazu, Katedra Ochrony Roślin, Zakład Fitopatologii i Mykologii (wcześniej Akademia Rolnicza, Katedra Fitopatologii)

Badania prowadzone w latach 1996–2004 dotyczyły bakterii powodujących gnicie czosnku w okresie przechowywania oraz uszkadzających owoce leszczyny w południowo-wschodniej Polsce.

Zagadnienia badawcze: izolacja i identyfikacja bakterii z chorych organów, przeprowadzanie testów patogeniczności oraz wybranych testów fizjologiczno-biochemicznych, epidemiologia chorób.

Ważniejsze wyniki/osiągnięcia: wykazanie szkodliwości *Pseudomonas marginalis* i *Erwinia* (sof rot group) dla ząbków czosnku w czasie przechowywania oraz szczepów należących do *Pseudomonas fluorescens* i *Erwinia* (sof rot group) dla orzechów laskowych w okresie wegetacji.

Badania prowadziły: Zofia Machowicz-Stefaniak, Ewa Król, Ewa Zalewska.

OPRACOWAŁA DR HAB. EWA KRÓL, PROF. UP W LUBLINIE

## Międzyuczelniany Wydział Biotechnologii Uniwersytetu Gdańskiego i Gdańskiego Uniwersytetu Medycznego (MWB UG i GUMed)

Bezpośrednio po utworzeniu w roku 1993 MWB UG i GUMed rozpoczęto tworzenie w tej jednostce Pracowni Fitopatologii. Było to bezpośrednio związane z zatrudnieniem na Wydziale dr hab. Ewy Łojkowskiej. W roku 2000 Pracownia została przekształcona w Zakład Ochrony i Biotechnologii Roślin, którym kierowała Ewa Łojkowska.

Pierwsze badania prowadzone jeszcze w Pracowni Fitopatologii, a w efekcie pierwsza zrealizowana praca doktorska, dotyczyły analizy roli drugorzędowych liaz kwasu poligalakturonowego w patogenezie bakterii z gatunków *Erwinia chrysanthemi* (obecnie rodzaj *Dickeya*). Rozprawa doktorska zatytułowana: „Rola drugorzędowych liaz kwasu poligalakturonowego PelI, PelL, PelZ w patogenezie bakterii z gatunku *Erwinia chrysanthemi* oraz badanie przydatności starterów opartych o sekwencję genu *pelL* do diagnostyki tego gatunku” została przygotowana przez Sylwię Jafre (1999).

Kolejne badania dotyczyły monitoringu i badania bioróżnorodności bakterii z gatunków: *Erwinia atroseptica* (obecnie *Pectobacterium atrosepticum*), *Erwinia carotovora* (obecnie *Pectobacterium carotovorum*) i *Erwinia chrysanthemi* (obecnie rodzaj *Dickeya*) izolowanych z plantacji nasien-nych ziemniaka oraz zastosowania markerów molekularnych do badania zmienności bakterii nale-żących do tych gatunków. Prace prowadzono w ścisłej współpracy z Państwową Inspekcją Ochrony Roślin i Nasiennictwa. Efektem tych badań były dwie kolejne rozprawy doktorskie: „Wykrywanie, identyfikacja i badanie zróżnicowania genetycznego polskiej kolekcji bakterii *Erwinia carotovora subsp. atroseptica/Pectobacterium carotovorum subsp. atrosepticum*” przygotowana przez Wojcie-cha Śledzia (2002) i „Zastosowanie markerów molekularnych w badaniu zmienności genetycznej bakterii z rodzaju *Erwinia*” przygotowana przez Małgorzatę Waleron (2002).

W następnych latach kontynuowano badania nad regulacją procesu wirulencji w komórkach bakterii z rodzaju *Dickeya* oraz poszukiwaniem czynników biologicznych mogących ograniczać rozprzestrzenianie się infekcji wywoływanej przez bakterie pektynolityczne. Rozprawę doktorską z tego zakresu zatytułowaną „Analiza czynnika warunkującego wyciszenie sygnalizacji międzyko-

mórkowej, opartej o laktony acylo-homoserynowe, wytwarzanego przez *Ochrobactrum* sp. A44” przygotowała Joanna Przysowa (2008).

Kontynuacja prac nad polską populacją bakterii powodujących choroby zwane: czarna nóżka i mokra zgnilizna ziemniaka i opracowywaniem nowoczesnych metod ich wykrywania i identyfikacji doprowadziła do przygotowania przez Monikę Sławiak w roku 2009 rozprawy doktorskiej zatytułowanej „Nowe markery i sondy molekularne do wykrywania, identyfikacji i klasyfikacji bakterii z rodzaju *Pectobacterium* i *Dickeya*”.

Dalsze prace naszego zespołu doprowadziły do wykrycia po raz pierwszy w Polsce obecności na plantacjach nasiennych ziemniaka bakterii z rodzaju *Dickeya*, później zaliczonych do nowo ustanowionego gatunku *Dickeya solani*. W publikacji ustanawiającej nowy gatunek współautorami byli pracownicy Zakładu Ochrony i Biotechnologii Roślin: Ewa Łojkowska, Małgorzata Waleron i Marta Potrykus.

W kolejnych latach kontynuowano badania nad poszukiwaniem biologicznych czynników ochrony roślin ziemniaka przed bakteriami pektynolitycznymi. Sylwia Jafra w ramach rozprawy habilitacyjnej zatytułowanej „Analiza czynnika degradującego lakt związku o kluczowym znaczeniu w patogenie bakterii pektynolitycznych” (2011) scharakteryzowała szczep bakterii z rodzaju *Ochrobactrum* spp. wytwarzający enzym degradujący związki ony *N*-acylo-homoseryny, sygnałowe istotne w procesie sygnalizacji między komórkami bakterii (tzw. sygnalizator zagęszczenia populacji bakterii, ang. *quorum sensing* i mogący znaleźć zastosowanie w biokontroli bakterii pektynolitycznych.

Poszukiwania związków biologicznych o aktywności antybakteryjnej doprowadziły do obrony przez Annę Szpitter w roku 2012 rozprawy doktorskiej zatytułowanej „Badanie mechanizmu przeciwbakteryjnego działania ekstraktów z roślin owadożernych z gatunku *Dionaea muscipula*”. Inna grupa badań prowadzonych w ZOBR to badania dotyczące możliwości wykorzystania bakteriofagów w ochronie roślin przed bakteriami pektynolitycznymi. Osiągnięcie naukowe zatytułowane, „Nowe bakteriofagi lityczne o szerokim zakresie gospodarza i ich potencjał w biologicznej ochronie ziemniaka (*Solanum tuberosum* L.) przed bakteriami pektynolitycznymi z rodzaju *Pectobacterium* spp. i *Dickeya* spp.” Było podstawą uzyskania przez Roberta Czajkowskiego w roku 2016 stopnia dr. habilitowanego.

Dalsze prace doktorantów ZOBR koncentrowały się na badaniach czynników molekularnych warunkujących patogeniczność bakterii z rodzaju *Dickeya solani*. W roku 2015 Marta Potrykus obroniła rozprawę doktorską zatytułowaną „Charakterystyka molekularnego mechanizmu warunkującego patogeniczność bakterii z rodzaju *Dickeya* spp. na roślinach” a Małgorzata Golanowska „Charakterystyka szczepów *Dickeya solani* i identyfikacja związków pochodzenia roślinnego indukujących produkcję czynników wirulencji przez te bakterie”.

Równocześnie kontynuowana była tematyka dotycząca zastosowania nowych technologii w identyfikacji różnicowaniu bakteryjnych patogenów roślin. W roku 2017 Małgorzata Waleron uzyskała stopień dr. habilitowanego na podstawie osiągnięcia naukowego zatytułowanego: „Opracowanie metod identyfikacji i różnicowania genetycznego bakteryjnych patogenów roślin z wykorzystaniem technik RFLP i sekwencjonowania genów metabolizmu podstawowego”.

Obecnie w ZOBR realizowane są badania dotyczące charakterystyki pangenomu i badań z zakresu genomiki porównawczej bakterii z gatunku *Dickeya solani*: „Analiza pangenomu bakterii z gatunku *Dickeya solani*, czynnika sprawczego strat w uprawie ziemniaka w Europie” – Agata Motyka (obrona rozprawy doktorskiej przewidziana w roku 2019) i *Pectobacterium parmentieri*: „Badania pangenomu i modelowanie metabolizmu bakteryjnych patogenów roślin z gatunku *Pectobacterium parmentieri* – Sabina Żołędowska (obrona rozprawy doktorskiej przewidziana w roku 2019).



Działalność naukowa pracowników ZOBR była finansowana w ramach projektów Komitetu Badań Naukowych, Ministerstwa Nauki i Szkolnictwa Wyższego, Narodowego Centrum Nauki (OPUS, HARMONIA, ETIUDA, PRELUDIUM), projektów z 5, 6, 7 Programu Ramowego Komisji Europejskiej oraz projektu ERA-NET EUPHRESKO. Prace naukowe były realizowane we współpracy z badaczami zagranicznymi: dr Nicole Hugouvieux-Cotte-Pattat (INSA, Lyon, Francja), dr Jan van der Wolf i dr Cor Schoen (Wageningen University, Wageningen, Holandia), prof. Alessio Mengoni i prof. Marco Bazzicalupo (Uniwersytet Florencki, Florencja, Włochy).

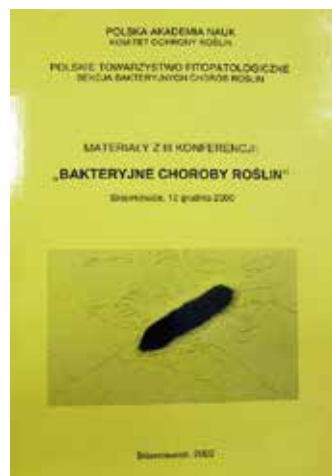
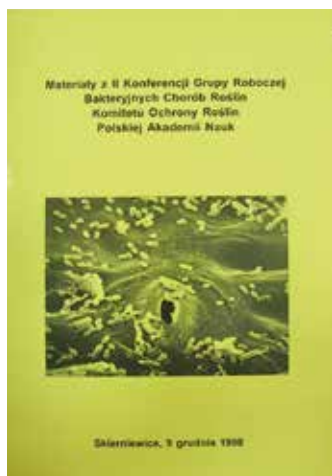
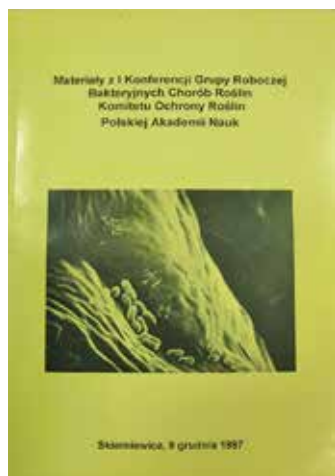
W roku 2018 działające w ramach ZOBR Laboratorium Badawczo-Wdrożeniowe prowadzące działalność usługową z zakresu wykrywania i identyfikacji bakterii pektynolitycznych w materiale roślinnym, wodzie i w glebie uzyskało Certyfikat Jakości w związku z wprowadzeniem systemu zarządzania wg normy PN-EN ISO/IEC 17025:2005+Ap1:2007 (Certyfikat Jakości Nr 1/3/2018/LAB). Badania są prowadzone w oparciu o opatentowaną przez pracowników ZOBR: Martę Potrykus, Wojciecha Śledzia i Ewę Łojkowską metodę opartą o Multiplex PCR i pozwalającą na równoczesne wykrywanie bakterii z gatunków *Pectobacterium atrosepticum*, *Pectobacterium carotovorum*, *Pectobacterium parmentieri* i rodzaju *Dickeya* (Patent PL 223540).

OPRACOWAŁA PROF. DR HAB. EWA ŁOJKOWSKA

## Inne informacje:

W 1974 roku powstała, w ramach Komitetu Ochrony Roślin Polskiej Akademii Nauk, Grupa Robocza Bakteryjnych Chorób Roślin, której przewodniczącym do 1993 roku był prof. dr hab. Antoni Golenia z Instytutu Ochrony Roślin w Poznaniu.

W latach 1993–1995 przewodniczącym Grupy był prof. dr hab. Piotr Sobiczewski z Instytutu Sadownictwa i Kwiaciarnictwa (obecnie Instytut Ogrodnictwa) w Skierniewicach. Począwszy od nowej kadencji KOR PAN w 1995 roku, prace dotyczące bakterioz roślin były prowadzone w ramach Sekcji Chorób Roślin KOR PAN kierowanej przez prof. Sobiczewskiego. Po reorganizacji



komitetów PAN w 2016 roku, tematyka ta jest ujęta programie działania Komitetu Nauk Agronomicznych PAN, Sekcji Hodowli i Ochrony Roślin.

W roku 1999 powstała także Sekcja Bakteryjnych Chorób Roślin Polskiego Towarzystwa Fitopatologicznego, której przewodniczącym jest prof. Sobiczewski.

W latach 1997, 1998 i 2002 odbyły się ogólnopolskie konferencje poświęcone chorobom bakteryjnym i bakteriom fitopatogenicznym. Problematyka ta jest prezentowana na różnych konferencjach naukowych i popularno-naukowych, krajowych i zagranicznych, organizowanych m.in. przez Polskie Towarzystwo Fitopatologiczne, Instytut Ochrony Roślin, Instytut Ogrodnictwa i inne jednostki naukowe i organizacje.

# Problemy z diagnostyką bakteryjnych chorób roślin

MAŁGORZATA SCHOLLENBERGER

Samodzielny Zakład Fitopatologii

Szkoła Główna Gospodarstwa Wiejskiego w Warszawie

malgorzata\_schollenberger@sggw.pl

Choroby, których objawom towarzyszą oznaki etiologiczne uważane są powszechnie za proste w diagnozowaniu. I rzeczywiście w przypadku takich chorób jak mączniaki prawdziwe, rdze czy mączniaki rzekome obserwacja grzybni czy zarodnikowania nie nastręcza trudności w ich rozróżnieniu. W przypadku bakterioz roślin, które również zaliczane do grupy chorób łatwych do diagnozowania ze względu na obecność wiskozowych wycieków komórek bakteryjnych, sprawa nie jest tak oczywista. Nie wszystkim bakteriozom towarzyszą oznaki etiologiczne a dodatkowo o ich obecności decydują warunki atmosferyczne, czas jaki upłynął od porażenia roślin oraz rodzaj i wiek porażonej tkanki. Zwykle jako przykład bakterioz, którym towarzyszą oznaki etiologiczne podawane są zaraza ogniowa oraz większość chorób typu plamistości liści. Jednak i w tych przypadkach są okresy, że konieczna jest izolacja bakterii i określenie cech fenotypowych do postawienia prawidłowej diagnozy.

Objawy zarazy ogniowej na jabłoni w postaci nekroz i zgorzeli powstałych na pniu czy gałęziach mogą być podobne zarówno do raka bakteryjnego drzew owocowych, jak i raka drzew owocowych, dwóch chorób o odmiennej etiologii (tabela 1). Zamieranie kory może powstać także w wyniku wystąpienia zgorzeli kory jabłoni i cytosporozy jabłoni. Podobny typ objawów poza wymienionymi chorobami grzybiczymi może być spowodowany porażeniem przez kilka innych patogenów rzadziej występujących. Oczywiście dokładna analiza symptomów często jest bardzo pomocna w postawieniu właściwej diagnozy. Czasem konieczne jest przedłużenie okresu obserwacji rozwoju objawów by móc określić formy zarodnikowania grzybów zarówno anamorfy jak i teleomorfy. Jednak gdy mamy do czynienia z materiałem szkółkarskim tego czasu nie ma i konieczna jest izolacja i identyfikacja sprawcy zarazy ogniowej, gdyż jest to patogen kwarantannowy podlegający obowiązkowi zwalczania na materiale rozmnożeniowym (Lista A2 EPPO).

Zgorzel kwiatów gruszy może być powodowana przez dwie bakterie (tabela 1). W tym przypadku nawet przy braku oznak etiologicznych rozróżnienie chorób zwykle nie nastręcza trudności. Charakterystyczny dla raka bakteryjnego jest brak systemicznego rozprzestrzeniania objawów na młode pędy i gałęzie.

Na drzewach pestkowych, głównie wiśniach i czereśniach, występowanie zrakowaceń, którym towarzyszą gumowate wycieki związane może być zarówno z rakiem bakteryjnym drzew owocowych, jak i z leukostomozą drzew pestkowych (tabela 1). W przypadku tej drugiej choroby zrakowacenia są niewielkie, ale drzewa mogą szybciej zamierać. Zwykle pomocna w diagnozowaniu sprawcy zgorzeli kwiatów drzew pestkowych jest obecność typowych zrakowaceń w koronie drzewa. Gdy ich brak, zamieranie kwiatów prawdopodobnie powodowane jest przez brunatną zgniliznę drzew pestkowych. Jest jednak pewna różnica, bowiem rak bakteryjny powoduje brunatno-czarne przebarwienia kwiatów, a w przypadku brunatnej zgnilizny są one najczęściej jasno czekoladowe. Podobnie przy dziurkowatości liści obecność zrakowacenia jako źródła patogenicznej bakterii może świadczyć, że mamy do czynienia z bakteriozą. W przypadku wirozy, dziurkowatości towarzyszą chlorotyczne pierścienie, a przy porażeniu przez grzyb *Stigmina carpophila* plamki otacza wyraźna brunatna obwódka.

Obu chorobom orzecha włoskiego towarzyszą bardzo podobne objawy (tabela 1). Pewną wskazówką może być wygląd plam od dolnej strony blaszki liściowej, które w przypadku bakteriozy są równie ciemne jak na górnej stronie blaszki. Przy antraknozie ich barwa jest mniej wyrazista, gdyż są one brunatne.

Unikatowa sytuacja może wystąpić przy diagnozowaniu plamistości liści ogórka, gdyż może być ona powodowana przez choroby, którym towarzyszą oznaki etiologiczne (tabela 1). Wydawałoby się, że gdy mamy do czynienia z bakteriozą, której nierzadko towarzyszą wycieki komórek bakterii od spodniej strony blaszki liściowej, i mączniakiem rzekomym, któremu towarzyszy nalot trzonek sporangialnych z zarodnikami również od spodniej strony liścia, to rozróżnienie chorób nie powinno sprawiać żadnych problemów. Jednak na początku rozwoju objawów chorobowych w obu przypadkach obserwuje się od spodniej strony liścia plamy jakby nasiąknięte wodą typowe dla bakterioz. Dopiero z czasem pojawia się nalot trzonek lub wycieki komórek bakteryjnych dzięki czemu możliwe jest rozróżnienie obu chorób.

Przedstawione powyżej przykłady to problemy z diagnozowaniem, gdy ten sam typ objawów chorobowych powodują bakterie i grzyby czy łęgniowce. Zwykle wnikliwa obserwacja objawów pozwala na prawidłową diagnozę bez uciekania się do izolacji czynnika sprawczego.

Inaczej przedstawia się sytuacja, gdy ten sam typ objawów powodowany jest przez różne gatunki bakterii. Patrząc prozaicznie od strony ochrony roślin czasem wydaje się wystarczające rozróżnienie bakterie – grzyby by móc podjąć konkretne zabiegi ochronne. Jednak pominięte zostają wówczas istotne elementy też związane z ochroną a mianowicie znajomość źródła patogena i epidemiologia choroby.

Przykład plamistości liści i strąków fasoli pokazuje jak ważne jest rozróżnienie dwóch chorób i ich sprawców (tabela 1). Opinia, że w warunkach polowych nie da się rozróżnić objawów bakteriozy obwódkowej fasoli i ostrej bakteriozy fasoli jest powszechna zarówno w literaturze przedmiotu, jak i w praktyce. Oczywiście bywa to możliwe na samym początku rozwoju objawów chorobowych, gdy da się zaobserwować wycieki komórek bakteryjnych. Jednak wraz z rozwojem nekrotycznych plam na liściach dochodzi do rozerwania blaszek liściowych w miejscu nekroz co ma miejsce w przypadku obu chorób, a co z kolei uniemożliwia obserwacje wycieków bakteryjnych. Jedynie na strąkach jest możliwa taka obserwacja i wtedy często okazuje się, że mamy do czynienia z infekcją mieszaną. Problem tkwi w tym, że sprawca ostrej bakteriozy fasoli jest patogenem kwarantannowym w związku z czym konieczna jest izolacja i identyfikacja zgodna z określonymi procedurami.

**Tabela 1**  
**Zestawienie chorób/patogenów powodujących podobne objawy na wybranych roślinach**

Roślina	Typ objawów	Choroba/Patogen
jabłoń	nekrozy, zgorzele na pniach, gałęziach	<ul style="list-style-type: none"> <li>● zaraza ogniowa / <i>Erwinia amylovora</i></li> <li>● rak bakteryjny drzew owocowych / <i>Pseudomonas syringae</i> pv. <i>syringae</i></li> <li>● rak drzew owocowych / <i>Neonectria ditissima</i></li> <li>● zgorzel kory jabłoni / <i>Neofabrea malicorticis</i></li> <li>● cytosporoza jabłoni / <i>Valsaria insitiva</i>, <i>Valsa malicorticis</i></li> </ul>
grusza	zgorzel kwiatów	<ul style="list-style-type: none"> <li>● zaraza ogniowa / <i>Erwinia amylovora</i></li> <li>● rak bakteryjny drzew owocowych / <i>Pseudomonas syringae</i> pv. <i>syringae</i></li> </ul>
wiśnia, czereśnia	zrakowacenie	<ul style="list-style-type: none"> <li>● rak bakteryjny drzew owocowych / <i>Pseudomonas syringae</i> pv. <i>syringae</i>, <i>Pseudomonas syringae</i> pv. <i>morsprunorum</i></li> <li>● leukostomoza drzew pestkowych /</li> <li>● <i>Valsaria insitiva</i>, <i>Leucostoma persoonii</i></li> </ul>
	zgorzel kwiatów	<ul style="list-style-type: none"> <li>● rak bakteryjny drzew owocowych / <i>Pseudomonas syringae</i> pv. <i>syringae</i></li> <li>● brunatna zgnilizna drzew pestkowych / <i>Monilinia laxa</i></li> </ul>
	dziurkowatość liści	<ul style="list-style-type: none"> <li>● rak bakteryjny drzew pestkowych / <i>Pseudomonas syringae</i> pv. <i>syringae</i></li> <li>● nekrotyczna pierścieniowa plamistość drzew pestkowych / <i>Prunus necrotic ringspot virus</i> PNRSV</li> <li>● dziurkowatość liści drzew pestkowych / <i>Stigmina carpophila</i></li> </ul>
orzech włoski	plamistość liści	<ul style="list-style-type: none"> <li>● bakteryjna zgorzel orzecha włoskiego / <i>Xanthomonas arboricola</i> pv. <i>juglandis</i></li> <li>● antraknoza orzecha włoskiego / <i>Ophiognomonium leptostyla</i></li> </ul>
szkółkarski materiał roślin sadowniczych	guzowatość korzeni	<ul style="list-style-type: none"> <li>● guzowatość korzeni / <i>Agrobacterium tumefaciens</i>, <i>Rhizobium nepotum</i>, <i>Rh. skierniewicense</i></li> </ul>
ogórek	plamistość liści	<ul style="list-style-type: none"> <li>● bakteryjna kanciasta plamistość ogórka / <i>Pseudomonas syringae</i> pv. <i>lachrymans</i></li> <li>● mączniak rzekomy ogórka / <i>Pseudoperonospora cubensis</i></li> </ul>

Tabela 1 c.d.

## Zestawienie chorób/patogenów powodujących podobne objawy na wybranych roślinach

Roślina	Typ objawów	Choroba/Patogen
fasola	plamistość liści i strąków	<ul style="list-style-type: none"> <li>• bakterioza obwódkowa fasoli / <i>Pseudomonas savastanoi</i> pv. <i>phaseolicola</i></li> <li>• ostra bakterioza fasoli <i>Xanthomonas axonopodis</i> pv. <i>phaseoli</i></li> </ul>
pomidor	nekroza rdzenia łodygi	<ul style="list-style-type: none"> <li>• nekroza rdzenia łodygi pomidora / <i>Pseudomonas corrugata</i>, <i>P. cichorii</i>, <i>P. mediterranea</i>, <i>P. viridiflava</i></li> </ul>
	plamistość liści, owoców	<ul style="list-style-type: none"> <li>• bakteryjna plamistość pomidora / <i>Xanthomonas vesicatoria</i>, <i>X. euvesicatoria</i>, <i>X. gardneri</i>, <i>X. perforans</i></li> </ul>
cebula	zgnilizna cebuli	<ul style="list-style-type: none"> <li>• bakterioza cebuli / <i>Pectobacterium carotovorum</i> subsp. <i>carotovorum</i>, <i>Burkholderia gladioli</i> pv. <i>allii</i>cola, <i>B. cepacia</i>, <i>Pantoea allii</i></li> </ul>
ziemniak	zgnilizna bulw	<ul style="list-style-type: none"> <li>• mokra zgnilizna bulw ziemniaka / <i>Pectobacterium carotovorum</i> subsp. <i>carotovorum</i>, <i>P. atrosepticum</i>, <i>P. parmentieri</i>, <i>Dickeya solani</i></li> </ul>
chryzantema	guzowatość	<ul style="list-style-type: none"> <li>• guzowatość / <i>Agrobacterium tumefaciens</i>, <i>Rhizobium skierniewicense</i></li> </ul>
goździk	guzowatość	<ul style="list-style-type: none"> <li>• guzowatość / <i>Agrobacterium tumefaciens</i>, <i>Pantoea agglomerans</i> pv. <i>gypsophile</i></li> </ul>
aster, asparagus, begonia, bluszcz, dalia, fikus, kalanchoe, kaktus, pelargonie, rhododendron, róża	guzowatość	<ul style="list-style-type: none"> <li>• guzowatość tumorogenne bakterie z rodziny <i>Rhizobiaceae</i></li> </ul>
fikus benjamina	guzowatość	<ul style="list-style-type: none"> <li>• guzowatość / <i>Rhizobium larrymoorei</i></li> </ul>

Bardzo specyficzny typ objawów tj. nekrozę rdzenia łodygi pomidora opisano w Wielkiej Brytanii a jego sprawcą okazał się nowy gatunek bakterii *Pseudomonas corrugata*. Choroba jest o tyle nietypowa, że w jej przypadku nie dochodzi do rozprzestrzeniania patogena w okresie wegetacji.

Niemniej choroba ta pojawiała się w różnych rejonach świata i w każdym przypadku sprawcą okazywał się ten sam gatunek bakterii. Obecnie znane są trzy inne gatunki bakterii powodujące nekrozę rdzenia łodygi, przy czym dwa z nich to polifagiczne bakterie, a jeden to całkiem nowy gatunek, który opisano w Turcji (tabela 1). Taka sytuacja powoduje, że w praktyce nie wiedząc, który konkretnie gatunek jest sprawcą choroby trudno jest podjąć decyzję o metodzie zapobiegania jej rozprzestrzenianiu.

Wykorzystywanie licznych metod biologii molekularnej do identyfikacji nowo izolowanych bakterii pozwala na precyzyjne różnicowanie uzyskiwanych szczepów. Owocuje to oznaczaniem coraz to nowych gatunków bakterii, w tym także patogenicznych dla roślin. Taka sytuacja zaistniała ostatnio przy badaniu sprawców plamistości liści i owoców pomidora. Dotychczas znany był jeden gatunek powodujący bakteryjną plamistość pomidora i papryki tj. *Xanthomonas vesicatoria*, gatunek kwarantannowy, niewystępujący w Polsce. Od 2015 roku na liście A2 EPPO pojawiły się trzy inne gatunki powodujące przede wszystkim bakteryjną plamistość pomidora (tabela 1). W związku z tym pojawienie się na roślinach pomidora odmiennych od cętkowatości objawów chorobowych będzie wymagało izolacji i identyfikacji patogena zgodnej z określonymi procedurami kwarantannowymi.

W przypadku takich samych symptomów powodowanych przez kilka różnych bakterii, poza problemami natury badawczej, istnieje problem związany z prezentacją bakterioz we wszelkich opracowaniach fitopatologicznych. Zasadą jest, że przy opisach chorób w postaci tekstu czy prezentacji symptomów podaje się dane dotyczące etiologii. I przykładowo opatrzenie opisu mokrej zgnilizny bulw ziemniaka listą bakterii, które mogą ją wywołać napotyka na opór fitopatologów, nie mówiąc o studentach czy producentach (tabela 1). Oczywiście w tym przypadku można, nie popełniając rażącego błędu, podać dominującego patogena. Natomiast, jeżeli chodzi o guzowatość to określenie sprawcy/ów jako tumorogenne bakterie z rodziny Rhizobiaceae wzbudza powszechne niezrozumienie i trudno się dziwić fitopatologom, że najczęściej zostają przy nazwie *Agrobacterium tumefaciens*.

Przedstawione powyżej uwagi wskazują na wagę symptomatologii w diagnozowaniu bakteryjnych chorób roślin, zwłaszcza, że często objawom towarzyszą oznaki etiologiczne. Jednak z drugiej strony oparcie się na samych objawach może prowadzić do błędnych diagnoz stąd konieczna staje się procedura izolacji i identyfikacji sprawców chorób. Kolejne kroki związane są ze stosowaniem metod konwencjonalnych dla określenia cech fenotypowych uzyskanych izolatów, ale najważniejszy na tym etapie jest test patogeniczności dzięki któremu mamy pewność, że uzyskaliśmy w warunkach *in vitro* patogena. Techniki serologiczne umożliwiają nam identyfikację bakterii do gatunku a techniki molekularne pozwalają na bardzo precyzyjne rozróżnienie patowarów, ras czy wykazanie pokrewieństwa czy różnic między konkretnymi szczepami patogenicznych bakterii.

## LITERATURA

- [1] Borecki Z., Schollenberger M. (red.), 2017. Polskie nazwy chorób roślin uprawnych. Polskie Towarzystwo Fitopatologiczne, Poznań.
- [2] Janse J.D., 2005. Phyto bacteriology: principles and practice. CABI Publishing, Wallingford, Oxfordshire OX10 8DE.
- [3] Sobiczewski P., Schollenberger M., 2002. Bakteryjne choroby roślin ogrodniczych. Państwowe Wydawnictwo Rolnicze i Leśne, Warszawa, 156 + 31.





# Diagnostyka bakteriozy pierścieniowej ziemniaka w próbach środowiskowych – istniejące trudności i proponowane rozwiązania

WŁODZIMIERZ PRZEWODOWSKI, AGNIESZKA PRZEWODOWSKA,  
KATARZYNA SALAMOŃSKA, WIOLETA STOCHŁA,  
DOROTA SZAREK

Instytut Hodowli i Aklimatyzacji Roślin – Państwowy Instytut Badawczy, Oddział w Boninie,  
Pracownia Diagnostyki Molekularnej i Biochemii  
e-mail: w.przewodowski@ihar.edu.pl

Kwarantanna bakteria *Clavibacter michiganensis* subsp. *sepedonicus* (Spickermann et Kothoff) Davis et al., (Cms) – sprawca bakteriozy pierścieniowej ziemniaka, to jeden z najmniejbezpieczniejszych i najbardziej uciążliwych patogenów ziemniaka (Lee i in., 1997; Lebecka i Zimnoch-Guzowska, 2005; OEPP/EPPO 2006).

Wykrycie i potwierdzenie porażenia już w jednej bulwie/roślinie skutkuje nie tylko dyskwalifikacją plantacji i koniecznością utylizacji materiału roślinnego, ale również nałożeniem restrykcji fitosanitarnych na miejsce produkcji (Dyrektywa Komisji WE 2006/56). W praktyce oznacza to kłopoty finansowe niejednokrotnie prowadzące do bankructwa przedsiębiorstwa (Chotkowski i Rembeza, 2013).

Kontrola rozprzestrzeniania się i wykrywanie bakterii Cms jest bardzo trudne (Easton, 1979; Van der Volf i in., 2005).

Sprawca bakteriozy pierścieniowej ziemniaka posiada szereg unikalnych cech, które stwarzają wysokie ryzyko niekontrolowanego rozprzestrzeniania się tej choroby na nowe obszary (Van der Volf i in., 2005). Podobnie jak niektóre podgatunki *Clavibacter michiganensis*, bakterie Cms często wywołują bezobjawową (latentną) formę choroby (De Boer i in., 2005; OEPP/EPPO, 2006). Niska koncentracja komórek bakteryjnych w tkankach, jak również tolerancyjność względem Cms niektórych odmian ziemniaka, skutkuje brakiem widocznych objawów infekcji w roślinach (Pastuszewska i in., 2010). Kłopotliwa do zdiagnozowania jest również pełnoobjawowa postać choroby, która uwidacznia się zazwyczaj pod koniec okresu wegetacji lub dopiero w trakcie przechowywania bulw i często mylona jest z objawami innych chorób (Dyrektywa Komisji WE 2006/56; Przewodowski i Treder, 2008).

Jednym z najpoważniejszych problemów w skutecznym zwalczaniu sprawcy bakteriozy pierścieniowej ziemniaka są trudności z wiarygodną i skuteczną diagnostyką, szczególnie w próbach środowiskowych typu tkanki roślin i bulw ziemniaka, gleba i woda, charakteryzujących się zazwyczaj dużą objętością i niską koncentracją bakterii *Cms* (Van der Volf i in., 2005). Są one ponadto bogate w różnego rodzaju zanieczyszczenia (mikrobiologiczne, chemiczne, biochemiczne, biologiczne i fizykochemiczne), których obecność może doprowadzić do zafałszowania wyniku testu diagnostycznego. Nie ma obecnie metody, która pozwoliłaby na całkowitą eliminację tego rodzaju zanieczyszczeń podczas izolacji bakterii *Cms* z prób środowiskowych (OEPP/EPPO, 2006). Istnieje kilka ważnych przyczyn, a mianowicie:

- Brak odpowiednio specyficznych przeciwciał do diagnostyki *Cms* (Kokoskova i Pankova, 1998; Przewodowski i Przewodowska, 2017). Przy dużym zróżnicowaniu szczepów bakterii *Cms* pod względem ilości i zawartości wytwarzanych przez nie śluzów, efektywna detekcja i identyfikacja komórek *Cms* metodami immunologicznymi jest bardzo utrudniona. Oferowane komercyjnie przeciwciała poliklonalne skierowane na bakterie *Cms* wykrywają głównie komponenty śluzów bakteryjnych, dając wynik fałszywie negatywny przy identyfikacji szczepów niemukoidalnych. Z kolei przeciwciała monoklonalne, które charakteryzują się zbyt wysoką specyficznością, nie rozpoznają wielu szczepów bakterii *Cms* (Baer i Gudmestad, 1993; Przewodowski i Przewodowska, 2017).
- Brak metody izolacji *Cms* z prób środowiskowych, która pozwoliłaby na zachowanie żywotności badanych komórek bakteryjnych i jednocześnie pozbycie się wszelkich substancji oraz innych mikroorganizmów działających toksycznie na komórki *Cms*. Dodatkowe utrudnienie stanowi brak w pełni selektywnych podłoży mikrobiologicznych dla namnażania bakterii *Cms* oraz obecność w próbce innych, szybko rosnących mikroorganizmów, co znacznie ogranicza możliwość uzyskania czystych izolatów *Cms* i wykonania testu biologicznego pozwalającego na określenie patogeniczności *Cms* (OEPP/EPPO, 2006).
- Ograniczenia metod mikroskopowych (np. testu immunofluorescencyjnego IFAS), wynikające z obecności w badanych próbach resztek tkanek roślin i bulw ziemniaka oraz gleby, które podczas identyfikacji *Cms* w polu widzenia mikroskopu powodują przysłonięcie badanych komórek dając wynik fałszywie negatywny.
- Ograniczenia molekularnych metod identyfikacji bakterii *Cms*, które mimo swojej wysokiej czułości i specyficzności mogą być zakłócane przez działanie obecnych w próbach środowiskowych inhibitorów reakcji PCR (Salamońska i in., 2016). Jedną z podstawowych przyczyn wpływających na nieprawidłową diagnostykę molekularną bakterii *Cms* jest brak odpowiedniej metody izolacji materiału genetycznego z badanych prób środowiskowych. Zalecana przez EPPO w Dyrektywach Komisji Europejskiej metodyka nie pozwala na całkowite usunięcie znajdujących się w badanej próbce zanieczyszczeń oraz inhibitorów reakcji PCR, co może prowadzić do uzyskania w toku analizy molekularnej wyniku fałszywie negatywnego.

Z uwagi na ww. ograniczenia zalecanych przez KE metod diagnostycznych, żaden ze stosowanych testów nie jest sam w sobie 100% wiarygodny. Dlatego zgodnie z przyjętymi wymogami fitosanitarnymi dla przeprowadzenia wiarygodnej diagnostyki *Cms* należy stosować przynajmniej dwa testy przesiewowe oparte na różnych zasadach biologicznych łącznie z testem patogeniczności na roślinie bioindykatorowej (OEPP/EPPO, 2006). Takie rozwiązanie może jednakże znacznie wydłużyć diagnostykę badanych prób, nie dając jednocześnie gwarancji uzyskania prawidłowego wyniku diagnostyki. Dlatego nadal podejmuje się liczne próby opracowania odpowiednio czułych i specyficznych metod do diagnostyki sprawcy bakteriozy pierścieniowej ziemniaka.

Jednym z rozwiązań zaproponowanych przez nasz zespół było opracowanie nowego rodzaju, wysoce specyficznych, poliklonalnych przeciwciał skierowanych na komórki bakterii Cms (Przewodowski, 2012). Opracowany i opatentowany sposób wytwarzania IgG pozwolił uzyskać unikalne dla badanych przeciwciał cechy, jak wysoka czułość i specyficzność oraz zdolność wykrywania bakterii Cms niezależnie od stopnia mukoidalności badanych szczepów (Przewodowski i Przewodowska, 2017). Z kolei opracowanie odpowiednich matryc z wykorzystaniem nanocząsteczek metali koloidalnych, naturalnych oraz syntetycznych polimerów oraz opracowanych cząstek receptorowych, pozwoliło uzyskać wysoce specyficzne immunopodłoża oraz opracować i opatentować szereg różnych metod i testów diagnostycznych pozwalających na selektywną izolację i identyfikację bakterii Cms z prób środowiskowych (Przewodowski, 2013 a, b, c, d, 2014, 2016).

## LITERATURA

- [1] Baer D., Gudmestad N.C., 1993. Serological detection of nonmucoid strains of *Clavibacter michiganensis* subsp. *sepedonicus* in potato. *Phytopathology* 83: 157–163.
- [2] Chotkowski J., Rembeza J., 2013. Bakterioza pierścieniowa ziemniaka jako choroba kwarantanna – uzasadniona ostrożność, czy forma protekcji handlowej. *Stowarzyszenie Ekonomistów Rolnictwa i Agrobiznesu. Roczniki Naukowe Tom XV, zeszyt 1*: 12 – 17.
- [3] De Boer S.H., Charkowski A.O., Zink R.T., Martínez-Soriano J.P., and Flores-Olivas A., 2005. Procedure for detection and identification of *Clavibacter michiganensis* subsp. *sepedonicus* (Spieckermann and Kotthoff) Davis, Gillaspie, Vidaver and Harris, in potato (*Solanum tuberosum* L.) tubers. *Revista Mexicana de Fitopatología* 23: 329–334.
- [4] Dyrektywa Komisji Wspólnot Europejskich Nr 2006/56 z dnia 12 czerwca 2006 zmieniająca załączniki do dyrektywy Rady EEC 93/85 w sprawie zwalczania bakteriozy pierścieniowej ziemniaka. *Dziennik Urzędowy Unii Europejskiej* L 182/27 4.7.2006 PL.
- [5] Easton G.D., 1979. The biology and epidemiology of potato ring rot. *Am. Potato J.* 56: 45–460.
- [6] Kokoskova B, Pankova I., 1998. Sensitivity and specificity of polyclonal antisera for determination of *Clavibacter michiganensis* subsp. *sepedonicus* and their use by the slide agglutination. *Plant Protect. Sci.* 32: 121–125.
- [7] Lebecka R., Zimnoch-Guzowska E., 2005. Choroby bakteryjne ziemniaka (*Solanum tuberosum* L.) – strategie ochrony. *Biuletyn IHAR* 237/238: 161–168.
- [8] Lee I.-M., Bartoszyk I.M., Gundersen D.E., Mogen B., Davis R. E., 1997. Nested PCR for Ultrasensitive Detection of the Potato Ring Rot. Bacterium, *Clavibacter michiganensis* subsp. *sepedonicus*. *Applied And Environmental Microbiology* July: 2625–2630.
- [9] OEPP/EPPO, 2006. *Clavibacter michiganensis* subsp. *sepedonicus*. *OEPP/EPPO Bulletin* 36: 99–109.
- [10] Pastuszewska T., Gryń G., Franke K., 2010. Podatność wybranych odmian ziemniaka na porażenie przez *Clavibacter michiganensis* subsp. *sepedonicus*. *Prog. Plant Protection/Post. Ochr. Roślin* 50 (1): 245–248.
- [11] Przewodowski W., Lewosz J., 2012. Sposób usuwania śluzów bakteryjnych. Patent UP RP nr P 210394.
- [12] Przewodowski W., 2012. Test immunologiczny na obecność bakterii. Patent UP RP nr P 210395.
- [13] Przewodowski W., 2013a. Zestaw do wykrywania albo przeżyciowego izolowania bakterii *Clavibacter michiganensis* subsp. *sepedonicus* w analizowanej próbce. Patent UP RP nr PL 213855.
- [14] Przewodowski W., 2013b. Zestaw inkubacyjny do wykrywania albo przeżyciowego izolowania wybranych bakterii, *Clavibacter michiganensis* subsp. *sepedonicus*. Patent UP RP nr PL 213856.
- [15] Przewodowski W., 2013c. Sposób wykrywania obecności bakterii Cms z wykorzystaniem membran poliwęglanowych zawierających immobilizowane przeciwciała. Patent UP RP nr PL 213857.
- [16] Przewodowski W., 2013d. Sposób wykrywania obecności bakterii *Clavibacter michiganensis* subsp. *sepedonicus* w analizowanej próbce. Patent UP RP nr PL 213858.
- [17] Przewodowski W., 2014. Immunological tests for the presence of bacteria which make use of antibodies obtained using a specific method. Patent amerykański przyznany przez USPTO nr US 8,642,275 B2.

- [18] Przewodowski W., 2016. Immunological tests for the presence of bacteria which make use of antibodies obtained using a specific method. Patent europejski przyznany przez EPO nr EP 2 205 735.
- [19] Przewodowski W., Przewodowska A., 2017. Development of a Sensitive and Specific Polyclonal Antibody for Serological Detection of *Clavibacter michiganensis* subsp. *sepedonicus*. PLoSONE12 (1): e0169785.DOI: 10.1371/journal.pone.0169785.
- [20] Przewodowski W., Treder K., 2008. Trudności związane z diagnozą i eliminacją bakteriozy pierścieniowej ziemniaka. Ziemiak Polski 2008 (4): 1–3.
- [21] Salamońska K., Stochła W., Przewodowski W., 2016. Nowoczesne metody diagnostyczne w identyfikacji molekularnej bakterii kwarantannowych ziemniaka. Ziemiak Polski 4: 41–45.
- [22] Van der Wolf J.M., Elphinstone J.G., Stead D.E., Metzler M., Müller P., Hukkanen, A. & Karjalainen R., 2005. Epidemiology of *Clavibacter michiganensis* subsp. *sepedonicus* in relation to control of bacterial ring rot (No. 95). PRI Bioscience.

# Charakterystyka pangenu i monitoring występowania *Dickeya solani* i *Pectobacterium parmentieri* w Polsce

EWA ŁOJKOWSKA<sup>1</sup>, MARTA POTRYKUS<sup>1</sup>, AGATA MOTYKA<sup>1</sup>,  
SABINA ŻOŁĘDOWSKA<sup>1</sup>, WOJCIECH ŚLEDŹ<sup>1</sup>,  
MAŁGORZATA GOLANOWSKA<sup>1</sup>,  
NICOLE HUGOUVIEUX-COTTE PATTAT<sup>2</sup>, ALESSIO MENGONI<sup>3</sup>

<sup>1</sup>Międzyuczelniany Wydział Biotechnologii Uniwersytetu Gdańskiego  
i Gdańskiego Uniwersytetu Medycznego,

<sup>2</sup>UMR5240, INSA Lyon, France

<sup>3</sup>University of Florence, Italy

e-mail: ewa.lojkowska@biotech.ug.edu.pl

Monitoring bakterii pektynolitycznych prowadzony jest w naszym laboratorium od roku 1996 z różną częstotliwością. W trakcie prowadzonych badań wykryliśmy w Polsce na plantacjach nasiennej ziemniaka bakterie pektynolityczne z następujących gatunków: *Dickeya dianthicola*, *Dickeya solani*, *Pectobacterium atrosepticum*, *Pectobacterium carotovorum* subsp. *carotovorum*, *Pectobacterium carotovorum* subsp. *brasiliense* i *Pectobacterium parmentieri*.

Bakterie z niedawno wyróżnionych gatunków *Dickeya solani* (wyodrębniony w 2014 r.) i *Pectobacterium parmentieri* (wyodrębniony w 2016 r.) należą do rodziny *Pectobacteriaceae*, rzędu *Eubacteriales* i są ważnymi gospodarczo patogenami ziemniaka oraz szeregu roślin warzywniczych i ozdobnych. Badania pangenu dwóch wymienionych gatunków bakterii przeprowadzono na podstawie analizy sekwencji 14 szczepów *D. solani* i 15 szczepów *P. parmentieri* wyizolowanych w Polsce, Belgii, Finlandii, Francji, Holandii, Izraelu, Niemczech i USA. Sekwencje genomowe wymienionych szczepów wyizolowanych w Polsce uzyskano za pomocą technologii NGS: Illumina i PacBio (4 szczepy *D. solani* i 12 szczepów *P. parmentieri*) a pozostałe uzyskano z GenBank (8 genomów *D. solani* i 3 genomy *P. parmentieri*). Genomy szczepów zsekwencjonowanych w naszym laboratorium złożono za pomocą programów Illumina reads i SPAdes a następnie optymalizowano za pomocą PacBio reads i Quiver software.

Szczepy badanych gatunków bakterii różnią się istotnie bioróżnorodnością; szczepy *D. solani* charakteryzują się wysoką homogennością genomu, jednocześnie wykazując zróżnicowaną wiru-

lencję, natomiast szczepy *P. parmentieri* wykazują znacznie większą zmienność w obrębie genomu oraz zróżnicowaną wirulencję. Przeprowadzone badania wykazały, iż genom podstawowy (ang. core genome) obu gatunków jest podobnej wielkości i obejmuje odpowiednio 3756 i 3706 genów w przypadku *D. solani* i *P. parmentieri*. Na podstawie przeprowadzonych analiz stwierdzono, iż genom dodatkowy (ang. accessory genome) i unikatowy (ang. unique genome) *P. parmentieri* jest większy i obejmuje odpowiednio 1408 i 1847 genów, podczas gdy w przypadku *D. solani* odpowiednie genomy obejmują 510 i 690 genów.

Wirulencja bakterii gatunków *D. solani* i *P. parmentieri* związana jest przede wszystkim z wytwarzaniem szerokiej gamy enzymów degradujących składniki roślinnych ścian komórkowych: pektynaz, celulaz i proteaz, ale także wytwarzaniem biofilmu i sideroforów oraz zdolnością do ruchu. Nasze badania zmierzają do identyfikacji ważnych w procesie patogenyzy genów strukturalnych i mających wpływ na ich ekspresję genów regulatorowych. Prowadzone badania pozwolą na lepsze opisanie mechanizmów warunkujących wirulencję i bioróżnorodność *D. solani* i *P. parmentieri*, dwóch nowo zidentyfikowanych w Europie gatunków patogenów roślin oraz na opracowanie w przyszłości efektywnych metod ochrony roślin uprawnych przed tymi patogenami.

# Nowe gatunki *Pectobacterium* i ich występowanie w Polsce

MAŁGORZATA WALERON<sup>1</sup>, AGNIESZKA MISZTAK<sup>1</sup>,  
JOANNA JOŃCA<sup>2</sup>, KRZYSZTOF WALERON<sup>2</sup>

<sup>1</sup>Katedra Biotechnologii, Międzyuczelniany Wydział Biotechnologii,  
Uniwersytetu Gdańskiego i Gdańskiego Uniwersytetu Medycznego

<sup>2</sup>Katedra i Zakład Mikrobiologii Farmaceutycznej, GUMed  
e-mail: malgorzata.waleron@biotech.ug.edu.pl

Bakterie z rodzaju *Pectobacterium* są szeroko rozpowszechnione w przyrodzie, izolowane są na wszystkich kontynentach, z wyjątkiem Antarktydy ([www.faostat.fao.org](http://www.faostat.fao.org)). Występują zarówno w powietrzu, glebie, jak i wodach gruntowych, izoluje się je również z przewodu pokarmowego bezkręgowców (Glasner i in., 2008). Znane są głównie jako patogeny roślin. Mają szeroki zakres gospodarzy i w większości nie wykazują specyficzności w stosunku do gatunku roślin, na których wywołują objawy chorobowe. Ponadto, większość gatunków i podgatunków *Pectobacterium* może zasiedlać różnych gospodarzy, od ziemniaka po kaktusy (Perombelon, 2002). Intensywna wymiana międzynarodowa materiału roślinnego zarówno sadzonek, roślin doniczkowych, nasion, jak i żywności, wraz z zachodzącymi zmianami klimatycznymi, spowodowały gwałtowne rozprzestrzenianie się bakterii fitopatogennych na inne regiony klimatyczne, o czym świadczy rosnąca liczba raportów o ich występowaniu. Rodzaj ten jest uznawany za jeden z 10 najważniejszych patogenów roślin z gospodarczego, jak i naukowego punktu widzenia (Mansfield i in., 2012).

W ostatnich latach wraz z rozwojem technik stosowanych do klasyfikacji bakterii taksonomia rodzaju *Pectobacterium* ulega szybkim zmianom. Obecnie w obrębie rodzaju wydzielono 10 gatunków: *P. cacticidum*, *P. aroidearum*, *P. atrosepticum*, *P. betavasculorum*, *P. peruvienne*, *P. parmentirii*, *P. polaris*, *P. wasabiae*, *P. zantedeschiae* i *P. carotovorum*, dla którego opisano cztery podgatunki: *P. c.* subsp. *carotovorum*, *P. c.* subsp. *brasiliense*, *P. c.* subsp. *odoriferum* i *P. c.* subsp. *actinidiae*. Jednak nowo wyodrębnione gatunki, *P. peruvienne*, *P. zantedeschiae* oraz podgatunek *P. c.* subsp. *actinidiae* nie zostały jeszcze zatwierdzone przez Międzynarodowy Kodeks Nomenklatury Bakterii. Ponadto w 2018 roku zaproponowano również transfer części szczepów *P. carotovorum* do genomogatunku *P. maceratum* kandydującego do rangi gatunku (Shirshikov i in., 2018).

Do roku 2013 szczepy bakterii z rodzaju *Pectobacterium* izolowane w Polsce klasyfikowano jako *P. atrosepticum* i *P. c.* subsp. *carotovorum* (Śledź in., 2000, Waleron i in., 2002). W związku z licznymi rewizjami i re-aranżacjami w taksonomii *Pectobacterium* lista gatunków występujących w naszym kraju uległa zmianom.

Z badań prowadzonych przez różne zespoły badawcze, wiadomo iż na terenie naszego kraju oprócz wyżej wymienionych taksonów izolowane są szczepy *Pectobacterium* należące do gatunków: *P. parmentieri* (Waleron i in., 2013, Żołędowska i in., 2018), *P. aroidearum* (Oskiera i in., 2017), *P. polaris* (Waleron i in., 2018), jak również podgatunków *P. c.* subsp. *odoriferum* (Waleron i in., 2014) oraz *P. c.* subsp. *brasiliense* (Waleron i in. 2015, Dees i in., 2017).

Wykorzystując analizy gnomiczne (ANI i isDDH) uzupełnione o analizy chemotaksonomiczne (FAME, MALDITOF-MS), fingerprint (ERIC-PCR), MLSA oraz profilowanie metaboliczne, atypowe szczepy *P. atrosepticum* izolowane z Kalijki etiopskiej wyodrębniono i opisano jako nowy gatunek *P. zantedeschiae* (Waleron i in., 2018). Ponadto analizy MLSA oraz fylogenomiczne wskazują na potrzebę przeklasyfikowania części szczepów *P. c.* subsp. *carotovorum* do nowego genomogatunku „*P. maceratum*” (Waleron i in. dane nieopublikowane).

Należy zauważyć, iż większość spośród występujących w Polsce gatunków i podgatunków *Pectobacterium*, poza szerokim spektrum roślin żywicielskich, szybkim tempem rozprzestrzeniania się oraz dużymi zdolnościami adaptacyjnymi, cechuje silna wirulencja co stwarza poważne zagrożenie dla środowiska, do którego zostaną wprowadzone. Bakterie te mogą stanowić problem nie tylko w uprawie i eksporcie roślin, ale również w trakcie przechowywania zbiorów w naszym kraju, który jest jednym z wiodących producentów i eksporterów owoców i warzyw w Europie.

Badania finansowano z projektu NCN Opus 9 [2015/17/B/NZ9/01730]

## LITERATURA:

- [1] Dees M.W., Lebecka R., Perminow J.I.S., Czajkowski R., Grupa A., Motyka A., Brurberg M.B., 2017. Characterization of *Dickeya* and *Pectobacterium* strains obtained from diseased potato plants in different climatic conditions of Norway and Poland. *Europ J Plant Pathol*, 148, 839–851.
- [2] Glasner J.D., Marquez-Villavicencio M., Kim H.S., Jahn C.E., Ma B., Biehl B.S., Rissman A.I., Mole B. et al., 2008. Niche-specificity and the variable fraction of the *Pectobacterium* pan-genome. *Mol Plant Microbe Interact.* 21: 1549–1560.
- [3] Mansfield J., Genin S., Magori S., Citovsky V., Sriariyanum M., Ronald P., Foster G.D., 2012. Top 10 plant pathogenic bacteria in molecular plant pathology. *Mol Plant Pathol*, 13, 614–629.
- [4] Nabhan S., De Boer S.H., Maiss E., Wydra K., *Pectobacterium aroidearum* sp. nov., a soft rot pathogen with preference for monocotyledonous plants. *Int J Syst Evol Microbiol.* 2013; 63: 2520–2525.
- [5] Oskiera M., Kałużna M., Kowalska B., Smolińska U., 2017. *Pectobacterium carotovorum* subsp. *odoriferum* on cabbage and Chinese cabbage: Identification, characterization and taxonomic relatedness of bacterial soft rot causal agents. *J Plant Pathol.* 99, DOI: 10.4454/jpp.v99i1.3831.
- [6] Pérombelon M.C.M., 2002. Potato diseases caused by soft rot erwinias: an overview of pathogenesis. *Plant Pathol.* 51, 1–12.
- [7] Shirshikov F.V., Korzhenkov A.A., Miroshnikov K.K., Kabanova A.P., Barannik A.P., Ignatov A.N., Miroshnikov K.A., 2018. Draft genome sequences of new genomospecies “*Candidatus Pectobacterium maceratum*” strains, which cause soft rot in plants. *Genome Announc* 6:e00260–18.
- [8] Śledź W., Jafra S., Waleron M., Łojkowska E., 2000. Genetic diversity of *Erwinia carotovora* strains isolated from infected plants grown in Poland. *EPP0 Bull* 30, 403–407.



- [9] Waleron M., Waleron K., Podhajska A., Łojkowska E., 2002. Genotyping of bacteria belonging to the former *Erwinia* genus by PCR-RFLP analysis of *recA* gene fragment. *Microbiology UK*, 148: 583–595.
- [10] Waleron M., Waleron K., Łojkowska E., 2013. Occurrence of *Pectobacterium wasabiae* in potato field samples. *Eur J Plant Pathol.* 137: 149–158.
- [11] Waleron M., Waleron K., Łojkowska E., 2014. Characterization of *Pectobacterium carotovorum* subsp. *odoriferum* causing soft rot of stored vegetables. *Eur J Plant Pathol.* 139: 457–469.
- [12] Waleron M., Waleron K., Łojkowska E., 2015. First Report of *Pectobacterium carotovorum* subsp. *brasiliense* Causing Soft Rot on Potato and Other Vegetables in Poland. *Plant Dis.* 99; 9: 1271.
- [13] Waleron M., Misztak A., Waleron M.M., Franczuk M., Wielgomas B., Waleron K., 2018. Transfer of *Pectobacterium carotovorum* subsp. *carotovorum* strains isolated from potatoes grown at high altitudes to *Pectobacterium peruvienne* sp. nov. *Syst. Appl. Microbiol.* 41:85–93.
- [14] Waleron M., Misztak A., Waleron M.M., Franczuk M., Jońca J., Wielgomas B., Mikiciński A., Popowicz T., Waleron K., 2018. *Pectobacterium zantedeschiae* sp. nov. a new species of a soft rot pathogen isolated from Calla lily (*Zantedeschia* spp.). *Syst. Appl. Microbiol.* DOI: 10.1016/j.syapm.2018.08.004.
- [15] Waleron M., Misztak A., Jońca J., Waleron K., 2018. First Report of *Pectobacterium polaris* Causing Soft Rot of Potato in Poland. *Plant Dis.* DOI: 10.1094/PDIS-05-18-0861-PDN.
- [16] Zoledowska S., Motyka A., Zukowska D., Śledź W., Łojkowska E., 2017. Population structure and biodiversity of *Pectobacterium parmentieri* isolated from potato fields in temperate climate. *Plant Disease*, 102, 154–164.



# Bioróżnorodność fitopatogenicznych bakterii z rodzaju *Pseudomonas*, odkrycie gatunku *Pseudomonas cerasi* sp. nov. (non Griffin, 1911)

MONIKA KAŁUŻNA, JOANNA PUŁAWSKA, PIOTR SOBICZEWSKI

Instytut Ogrodnictwa, Skierniewice

email: monika.kaluzna@inhort.pl

Bakterie rodzaju *Pseudomonas* występują powszechnie w różnych środowiskach, od Antarktydy do tropików (Peix i in., 2009). Większość z nich to organizmy komensalne, nie mające wyraźnego wpływu na inne organizmy, ale są też takie, które powodują choroby roślin, ludzi i zwierząt. Ich bioróżnorodność jest efektem wpływu na bakterie zarówno czynników biotycznych jak i abiotycznych, prowadzących do niedziedzicznych zmian fenotypu, jak i zmian w materiale genetycznym.

Obecnie rodzaj *Pseudomonas* obejmuje 270 zwalidowanych gatunków, w tym 18 podgatunków (ang. List of Prokaryotic Names with Standing in Nomenclature LPSN; Parte, 2018), a tym samym stanowi jedną z najliczniejszych grup bakterii Gram-ujemnych.

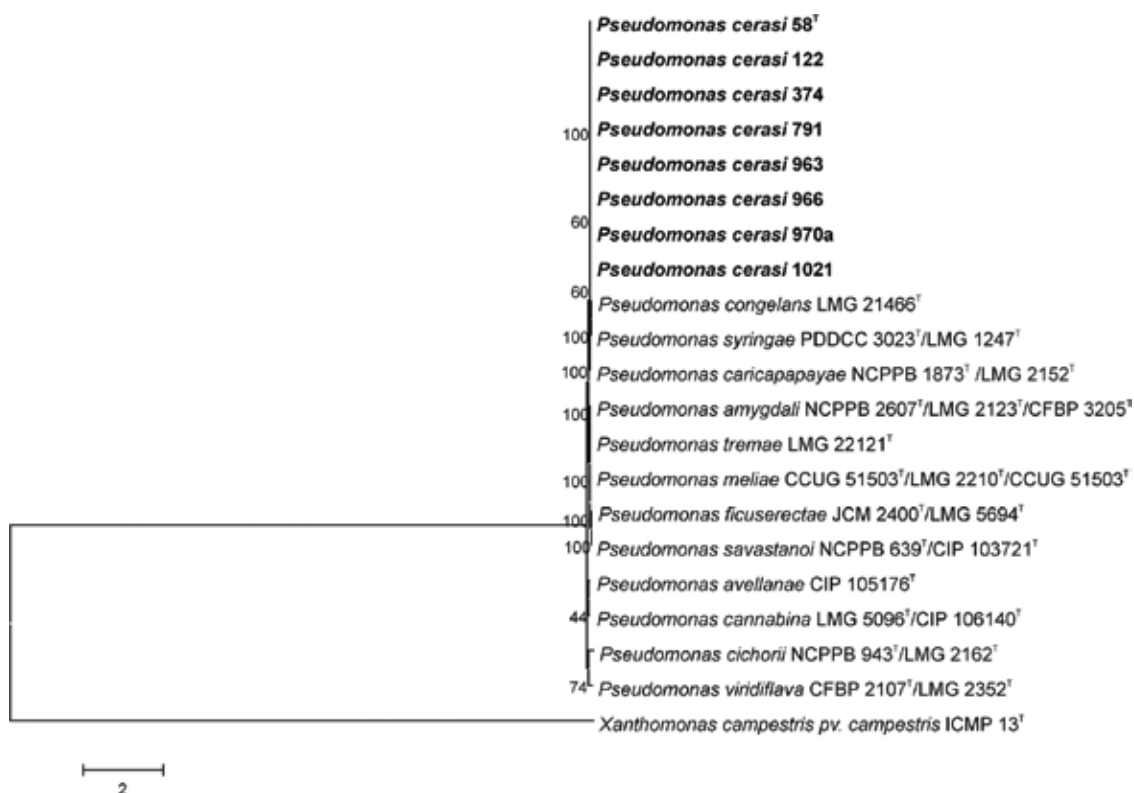
W obrębie tego rodzaju najbardziej powszechny jest polifagiczny gatunek *Pseudomonas syringae* – poraża ponad 180 gatunków roślin, zarówno jednorocznych, jak i wieloletnich, w tym rośliny sadownicze, warzywne i ozdobne (Bultreys i Kałużna, 2010). Gatunek ten zawiera 60 patowarów zdefiniowanych na podstawie ich zdolności do infekcji określonego gatunku rośliny-gospodarza (Young, 2010). Został podzielony na 9 genomogatunków wyodrębnionych na podstawie hybrydyzacji DNA: DNA (Gardan i wsp., 1999) oraz 13 tak zwanych grup filogenetycznych (PG) (Parkinson i wsp., 2011, Berge i wsp., 2014) zdefiniowanych na podstawie analizy sekwencji genów metabolizmu podstawowego (MLSA). Wśród patogenów wywołujących raka bakteryjnego drzew pestkowych, które są głównie przedmiotem naszych badań, dotychczas zidentyfikowano 4 patowary *P. syringae*: *syringae* (*Pss*), *morsprunorum* rasa 1 (*Psm1*), *morsprunorum* rasa 2 (*Psm2*), *avii* (*Psa*) i *persicae* (*Psp*), (Wormald, 1932, Freigoun and Crosse, 1975, Ménard i wsp., 2003), z których pierwsze trzy występują w Polsce. Różnią się one między sobą zarówno cechami fenotypowymi jak i cechami genetycznymi (Bultreys i Kałużna, 2010; Vicente i in., 2004; Vicente i Roberts, 2007; Kałużna i in., 2010a i b; Kałużna i in., 2012; Kałużna, 2014).

Badania nad etiologią raka bakteryjnego wykazały występowanie grupy bakterii (56), wyizolowanych głównie z wiśni, posiadających nietypowe cechy fenotypowe, wskutek czego nie można

ich było zaklasyfikować do żadnego z opisanych dotychczas taksonów (patowarów i ras) (Kałużna, 2014). Cechy te: zdolność upłynniania żelatyny, brak zdolności hydrolizy eskuliny, tyrozyny oraz wykorzystania kwasu winowego ( $G^+A^-T^-Ta^-$ ) były charakterystyczne dla bakterii *Pss* albo dla rasy 1 i 2 *Psm*. W teście patogeniczności na zawiązkach owoców czereśni szczepy te powodowały objawy podobne do tych jakie powodują szczepy rasy 1 i 2 *Psm*. W przypadku cech genetycznych omawiane szczepy wyróżniały się brakiem genów kodujących produkcję toksyn: syringomycyny, typowej dla *Pss* oraz koronatyny, typowej dla *Psm1*, a także sideroforu yersiniabaktyna, typowego dla *Psm2*. Stwierdzono także wysoką i swoistą homogenność wzorów amplifikacji odrębną od innych taksonów *Pss* i *Psm*, co wskazywało, że stanowią one nowy, dotychczas nie opisany takson. W celu określenia ich pozycji taksonomicznej podjęto szczegółowe badania z zastosowaniem zestawu metod klasycznych i biologii molekularnej spełniających kryteria klasyfikacji bakterii do gatunku.

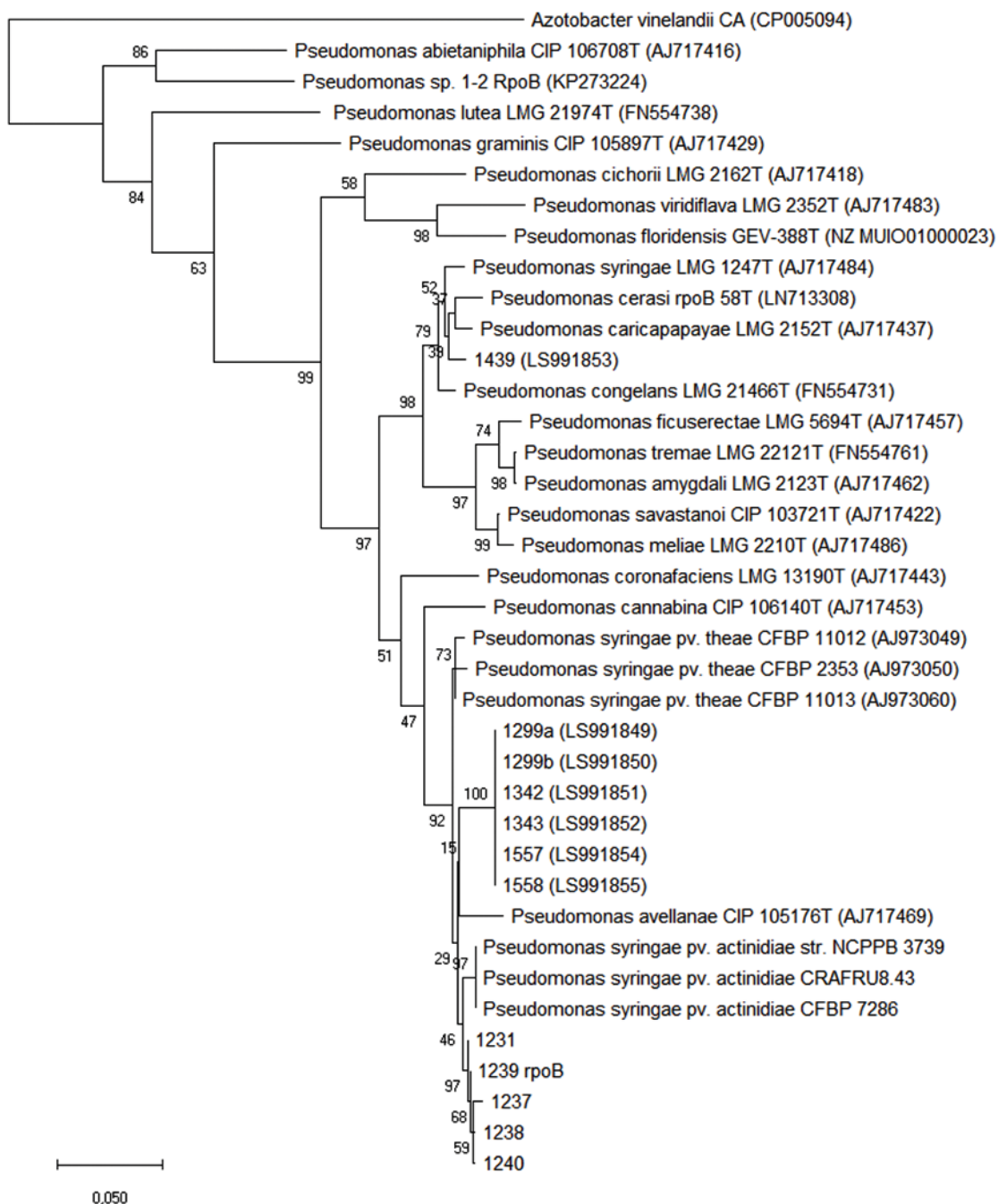
Na podstawie analizy genu 16S rRNA stwierdzono, że przedstawione szczepy są najbardziej spokrewnione ze szczepami typowymi gatunków *Pseudomonas ficuserectae* JCM 2400<sup>T</sup> i *P. congelans* DSM 14939<sup>T</sup> (podobieństwo sekwencji ponad 99,9%) (Rys. 1). Natomiast analiza filogenetyczna ukierunkowana na określenie sekwencji genów metabolizmu podstawowego (ang. *housekeeping genes*): *gyrB*, *rpoD* i *rpoB* wykazała, że szczepy te tworzą oddzielny klaster i są najbardziej spokrewnione z *P. syringae* NCPPB 281<sup>T</sup> i *P. congelans* LMG 21466<sup>T</sup>. Hybrydyzacja DNA-DNA wykonana dla szczepu 58<sup>T</sup>, reprezentującego nowe szczepy z czereśni i wiśni, oraz szczepów typowych najbardziej spokrewnionych gatunków, wykazała stopień homologii na poziomie, odpowiednio 58,2% i 41,9%. Wynik ten został dodatkowo potwierdzony analizami genomu (Average Nucleotide Identity-ANI) oraz Genome-to-Genome Distance (GGDC), które były zgodne z wynikami uzyskanymi na podstawie analizy połączonych sekwencji genów *gyrB*, *rpoD* i *rpoB* (Multilocus Sequence Analysis (MLSA)). Pozycję taksonomiczną badanych szczepów potwierdzono także metodą jonizacji próbki MALDI (ang. Matrix Assisted Laser Desorption and Ionisation) połączonej z pomiarem jej masy w spektrometrze masowym MS (ang. Mass Spectrometry). Wykazano, że utworzyły one oddzielny homogeny klaster z wysokim prawdopodobieństwem – wartość bootstrap 100% i były spokrewnione ze szczepami *P.s. pv. syringae* LMG 1247<sup>T</sup> oraz *P. congelans* LMG 21466<sup>T</sup>. Analiza kwasów tłuszczowych (FAME) wykazała, że dominowały wśród nich: 16:0 i cechy zsumowane 3 (16:1 ω7c/15:0 iso 2OH). Charakterystyka fenotypowa opracowana dla nowych szczepów oraz szczepów typowych gatunków najbardziej z nimi spokrewnionych wykazała, że nowe szczepy różnią się od szczepów typowych gatunków aż 18 cechami. Zawartość par G+C genomowego DNA szczepu 58<sup>T</sup> z wiśni wynosiła 59%.

W oparciu o wyniki kompleksowych badań taksonomicznych wykazano, że grupa siedmiu szczepów wyizolowanych z wiśni i jednego szczepu z czereśni reprezentuje nowy gatunek w rodzaju *Pseudomonas*, dla którego zaproponowano nazwę *Pseudomonas cerasi* sp. nov. (non Griffin, 1911) (Kałużna i in., 2016). Nazwa ta koresponduje do źródła izolacji, czyli *Prunus cerasus*. W odniesieniu do reguły 33c punkt 3 Międzynarodowego Kodu Nomenklatury Bakterii wskazanie w nazwie gatunku „non Griffin, 1911” zostało dodane ponieważ nazwa *P. cerasi* (z roku 1911) pomimo, że nie jest włączona do listy zatwierdzonych gatunków, była używana w Indeksie Bergeyana [Buchanan et al.,] jako synonim *Bacterium cerasi* [Griffin, 1911], patogena powodującego bakteryjną gumozę na drzewach czereśni w USA. Obecnie obie nazwy wskazujące przynależność do rodzaju i rodziny, odpowiednio *Bacterium* i *Bacteriaceae*, znajdują się na liście nazw odrzuconych/usuniętych [Dye i in., 1975; Gardan i in., 1999].



Rys. 1. Dendrogram Maximum Likelihood przedstawiający relacje filogenetyczne między szczepami 58<sup>T</sup>, 122, 374, 791, 963, 966, 970a i 1021 i blisko spokrewnionymi szczepami typowymi innych gatunków, na podstawie analizy połączonych sekwencji nukleotydów genów *gyrB*, *rpoB* i *rpoD*. Podane wartości liczbowe przy węzłach oznaczają współczynnik poparcia – bootstrap (wyrażone jako procent z 1000 powtórzeń). Skala umieszczona w lewym dolnym rogu oznacza długość gałęzi odpowiadającą 2 podstawienia nukleotydowego na jedną zasadę porównywanych sekwencji.

Przedmiotem badań były także izolaty *Pseudomonas* spp. pozyskane z liści borówki wysokiej (*Vaccinium corymbosum*) oraz liści derenia jadalnego (*Cornus mas* L.) na których występowały nekrotyczne plamy o różnej wielkości i zabarwieniu (Kałużna i in., 2013, Kałużna, 2018). Z próbek chorych liści pobranych z obu roślin-gospodarzy wyizolowano bakterie, o morfologii kolonii podobnej do bakterii rodzaju *Pseudomonas* – szczepu typowego *P. syringae* LMG1247<sup>T</sup>. Określenie cech fenotypowych izolatów pozwoliło na ich zaklasyfikowanie izolatów z derenia do gatunku *P. syringae*, LOPAT + – – – +, natomiast izolaty z borówki miały podobne cechy jednak nie posiadały zdolności do wytwarzania lewanu z sacharozy – LOPAT – – – – + (Lelliott i in., 1966). Nową, raczej niespotykaną, cechą izolatów z borówki i derenia jadalnego była zdolność do wytwarzania na pożywcze King B brązowego pigmentu. Analiza sekwencji genu 16S rRNA izolatów z derenia jadalnego i borówki wykazała, że były one najbardziej podobne do gatunku *Pseudomonas avellanae* BPIC 631<sup>T</sup> (ponad 99% podobieństwa), sprawcy bakteryjnej zgorzeli leszczyny (Janse i in., 1996). Także analizy sekwencji genów *gyrB* i *rpoB* wszystkich szczepów typowych gatunków w obrębie



Rys. 2. Dendrogram Maximum Likelihood przedstawiający relacje filogenetyczne między szczepami *Pseudomonas* pozyskanymi z derenia jadalnego i borówki, blisko spokrewnionymi szczepami typowymi innych gatunków oraz *P. s. pv. actinidiae*, *P. s. pv. theae*, na podstawie analizy sekwencji nukleotydów genu *rpoB*. Podane wartości liczbowe przy węzłach oznaczają współczynnik poparcia – bootstrap (wyrażone jako procent z 500 powtórzeń). Skala umieszczona w lewym dolnym rogu oznacza długość gałęzi odpowiadającą 0,050 podstawienia nukleotydowego na jedną zasadę porównywanych sekwencji.

rodzaju *Pseudomonas* i izolatów z derenia jadalnego oraz genu *rpoB* dla izolatów z borówki potwierdziły ich podobieństwo do *P. avellanae* CIP 105176<sup>T</sup>. Ze względu na ten fakt, przeprowadzono PCR ze starterami specyficznymi dla gatunku *P. avellanae* (Pa), (Scortichini i Marchesi, 2001) i uzyskano pozytywną reakcję ze wszystkimi szczepami z borówki i derenia jadalnego. Dodatkowy dendrogram wykorzystujący sekwencje genu *rpoB* szczepów należących do patowarów *P. syringae* wykazał także bliskie podobieństwo tych szczepów z borówki i derenia jadalnego do groźnych patogenów aktinidii i herbaty, odpowiednio *P. s. pv. actinidiae* (Psa) i *pv. theae* (Pst) (Rys. 2). W oparciu o to odkrycie, dodatkowo wykonano PCR ze starterami PsaF1/R2 specyficznymi dla Psa (Rees-George i in., 2010) i okazało się, że dla wszystkich szczepów derenia jadalnego i borówki uzyskano specyficzny produkt wielkości 280 pz.

Aktualnie prowadzone są badania nad opracowaniem szczegółowej charakterystyki fenotypowej i genetycznej szczepów z derenia jadalnego i borówki wysokiej, których wyniki będą pomocne w określeniu ich pozycji taksonomicznej oraz innych blisko spokrewnionych patowarów (Kałużna i in., 2013, Kałużna, 2018; Scortichini i in., 2013; Kałużna i in., 2014).

Badania były finansowane z projektu Narodowego Centrum Nauki, Granty: UMO-2017/25/B/NZ9/01565 i UMO-2013/08/M/NZ9/00138 oraz programu Statutowego 2.1.5.

## LITERATURA

- [1] Berge O., Monteil C.L., Bartoli C., Chandeysson C., Guilbaud C., Sands, D.C., Morris, C.E., 2014. A user's guide to a data base of the diversity of *Pseudomonas syringae* and its application to classifying strains in this phylogenetic complex. *PLoS One*, 9, e105547.
- [2] Buchanan R.E., Holt J.G., Lessel E.F. (Eds.). Index Bergeyana. An Annotated Alphabetic Listing of Names of the Taxa of the Bacteria, Williams and Wilkins, Baltimore, pp. 1–1472.
- [3] Bultreys A., Kałużna M., 2010. Bacterial cankers caused by *Pseudomonas syringae* on stone fruit species with special emphasis on the pathovars *syringae* and *morsprunorum* race 1 and race 2. *J Plant Pathol* 92: S21-S33.
- [4] Dye D.W., Bradbury J.F., Goto M., Hayward A.C., Lelliott R.A., Schroth M.N., 1980. International standards for naming pathovars of phytopathogenic bacteria and a list of pathovar names and pathotype strains. *Review of Plant Pathology* 59: 153–168.
- [5] Dye D.W., Bradbury J.F., Dickey R.S., Goto M., Hale C.N., Hayward A.C., Kel-man A., Lelliott R.A., Patel P.N., Sands D.C., Schroth M.N., Watson D.R.W., Young J.M., 1975. Proposals for a reappraisal of the status of the names of plant-pathogenic *Pseudomonas* species. *International Journal of Systematic Bacteriology*, 25, 252–257.
- [6] Freigoun S.O., Crosse J.E., 1975. Host relations and distribution of a physiological and pathological variant of *Pseudomonas morsprunorum*. *Annals of Applied Biology*, 81: 317–330.
- [7] Gardan L., Shafik H., Belouin S., Broch R., Grimont F., Grimont P.A.D., 1999. DNA relatedness among the pathovars of *Pseudomonas syringae* and description of *Pseudomonas tremae* sp. nov. and *Pseudomonas cannabina* sp. nov. (ex Sutic and Dowson 1959). *International Journal of Systematic Bacteriology*, 49: 469–478.
- [8] Griffin F. L., 1911. A bacterial gummosis of cherries. *Science*, 34: 615–616.
- [9] Janse J.D., Rossi M.P., Angelucci L., Scortichini M., Derks J.H.J., Akkermans A.D.L., De Vrijer R. and Psallidas P.G., 1996. Reclassification of *Pseudomonas syringae* pv. *avellanae* as *Pseudomonas avellanae* (sp. nov.), the bacterium causing canker of hazelnut (*Corylus avellana* L.). *Systematic and Applied Microbiology*, 19: 589–595.
- [10] Kałużna M., Willems A., Pothier J.F., Ruinelli M.F., Sobiczewski P., Puławska J., 2016. *Pseudomonas cerasi* sp. nov. (non Griffin, 1911) isolated from diseased tissue of cherry. *Systematic and Applied Microbiology*, 39 (6): 370–7.

- [11] Kałużna M., Puławska J., Sobiczewski P., 2014. Biodiversity and phylogenetic position of bacteria causing bacterial canker of stone fruits trees in Poland. 11<sup>th</sup> EFPP Conference, Kraków Poland, 8–13 September 2014, p.27.
- [12] Kałużna M., Puławska J., Meszka B., 2013. A new bacterial disease on blueberry (*Vaccinium Corymbosum*) caused by *Pseudomonas* spp. *Journal of Plant Protection Research*, 53: 32–36.
- [13] Kałużna M., 2018. Characterization and phylogeny of the novel taxon of *Pseudomonas* spp., closely related to *Pseudomonas avellanae* as causal agent of a bacterial leaf blight of cornelian cherry (*Cornus mas* L.) and *Pseudomonas syringae* pv. *syringae* as a new bacterial pathogen of red dogwood (*Cornus sanguinea* L.). *Journal of Plant Pathology*, DOI: 10.1007/s42161-018-0189-5.
- [14] Kałużna M., Ferrante P., Sobiczewski P., Scortichini M., 2010a. Characterization and genetic diversity of *Pseudomonas syringae* isolates from stone fruits and hazelnut using repetitive-PCR and MLST. *Journal of Plant Pathology*, 92: 781–787.
- [15] Kałużna M., Puławska J., Sobiczewski P., 2010b. The use of PCR melting profile for typing of *Pseudomonas syringae* isolates from stone fruit trees. *European Journal of Plant Pathology*, 126: 437–443.
- [16] Lattore B.A., Jones A.L., 1979. *Pseudomonas morsprunorum*, the cause of bacterial canker of sour cherry in Michigan and its epiphytic association with *P. syringae*. *Phytopathology*, 69: 335–339.
- [17] Lelliott R.A., Billing E., Hayward A.C., 1966. A determinative scheme for the fluorescent plant pathogenic Pseudomonads. *Journal of Applied Bacteriology*, 29: 470–489.
- [18] Masny A., Plucienniczak A., 2003. Ligation mediated PCR performed at low denaturation temperatures-PCR melting profiles. *Nucleic Acids Research* 31, e114.
- [19] Ménard M., Sutra L., Luisetti J., Prunier J.P., Gardan L., 2003. *Pseudomonas syringae* pv. *avii* (pv. nov.), the causal agent of bacterial canker of wild cherries (*Prunus avium*) in France. *European Journal of Plant Pathology* 109: 565–576.
- [20] Parkinson N., Bryant R., Bew J., Elphinstone J., 2011. Rapid phylogenetic identification of members of the *Pseudomonas syringae* species complex using the *rpoD* locus. *Plant Pathology*, 60: 338–344.
- [21] Parte A.C., 2018. LPSN – List of Prokaryotic names with Standing in Nomenclature (bacterio.net), 20 years on. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*, 68: 1825–1829.
- [22] Peix A., Ramírez-Bahena M. H., Velázquez E., 2009. Historical evolution and current status of the taxonomy of genus *Pseudomonas*. *Infection, Genetics and Evolution*, 9: 1132–1147.
- [23] Rees-George J., Vanneste J.L., Cornish D.A., Pushparajah I.P.S., Yu J., Templeton M.D., Everett K.R., 2010. Detection of *Pseudomonas syringae* pv. *actinidiae* using polymerase chain reaction (PCR) primers based on the 16S–23S rDNA intertranscribed spacer region and comparison with PCR primers based on other gene regions. *Plant Pathology*, 59: 453–464.
- [24] Scortichini M., Marcelletti S., Ferrante P., Firrao G., 2013. A Genomic Redefinition of *Pseudomonas avellanae* species. *PloS one*. 8. e75794. 10.1371/journal.pone.0075794.
- [25] Scortichini M., Marchesi U., 2001. Sensitive and specific detection of *Pseudomonas avellanae* using primers based on 16S rRNA gene sequences. *Journal of Phytopathology*, 149: 527–532.
- [26] Vicente J., Roberts S., 2007. Discrimination of *Pseudomonas syringae* isolates from sweet and wild cherry using rep-PCR. *European Journal of Plant Pathology*, 117: 383–392.
- [27] Vicente J.G., Roberts S.J., Russell K., Alves J.P., 2004. Identification and discrimination of *Pseudomonas syringae* isolates from wild cherry in England. *European Journal of Plant Pathology*, 110: 337–351.
- [28] Wormald H., 1932. Bacterial diseases of stone fruit trees in Britain. IV. The organism causing bacterial canker of plum trees. *Transactions of the British Mycological Society* 17, 157–169.
- [29] Young J.M., 2010. Taxonomy of *Pseudomonas syringae*. *Journal of Plant Pathology*, 92: 5–14.



# Zróżnicowanie genetyczne szczepów *Pseudomonas syringae* pv. *lachrymans*

RENATA SŁOMNICKA<sup>1</sup>, HELENA OLCZAK-WOLTMAN<sup>1</sup>,  
MAŁGORZATA SCHOLLENBERGER<sup>2</sup>, MICHAŁ OSKIERA<sup>3</sup>,  
KATARZYNA NIEMIROWICZ-SZCZYTT<sup>1</sup>, GRZEGORZ BARTOSZEWSKI<sup>1\*</sup>

<sup>1</sup>Katedra Genetyki Hodowli i Biotechnologii Roślin, Wydział Ogrodnictwa,  
Biotechnologii i Architektury Krajobrazu, Szkoła Główna Gospodarstwa Wiejskiego  
w Warszawie

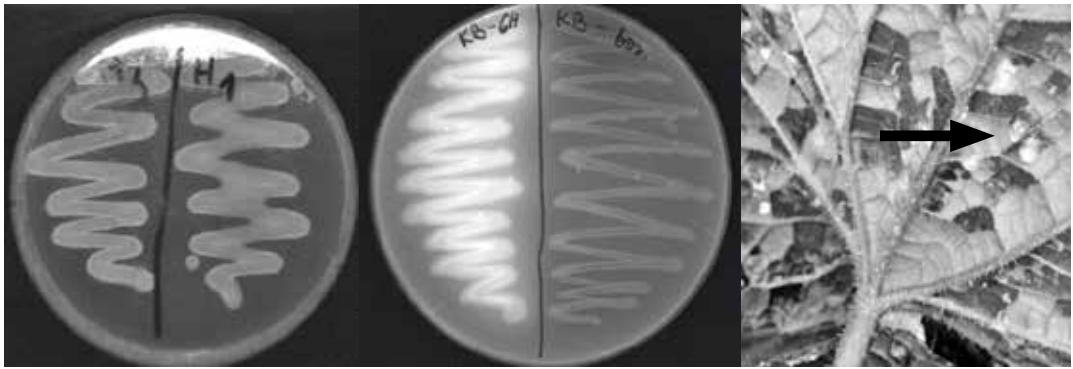
<sup>2</sup>Samodzielny Zakład Fitopatologii, Wydział Ogrodnictwa,  
Biotechnologii i Architektury Krajobrazu, Szkoła Główna Gospodarstwa Wiejskiego  
w Warszawie

<sup>3</sup>Zakład Mikrobiologii, Instytut Ogrodnictwa, Skierniewice  
\*e-mail: grzegorz\_bartoszewski@sggw.pl

Kolekcja szczepów *Pseudomonas syringae*, zgromadzona w Katedrze Genetyki, Hodowli i Biotechnologii Roślin SGGW, utrzymywana jest od 2001 roku i obejmuje obecnie około 40 izolatów, zakwalifikowanych do kilku patowarów, głównie do patowaru *lachrymans* (16 szczepów), będącego sprawcą bakteryjnej kanciastej plamistości ogórka. Dodatkowo w kolekcji znajdują się pojedyncze szczepy należące do *P. fluorescens*. Wszystkie szczepy zostały wyizolowane z liści roślin dyniowatych i pochodzą z kilku krajów europejskich. Charakterystyka szczepów obejmowała testy patogeniczności, wykonane na liściach roślin ogórka i tytoniu, jak również testy biochemiczne i analizy molekularne. Przykładowe zobrazowanie wyniku jednego z testów LOPAT, fluorescencji na pożywce King B w świetle UV oraz oznak etiologicznych na ogórku, przedstawiono na rysunku 1.

Zróżnicowanie genetyczne szczepów analizowano za pomocą różnych metod molekularnych: PCR-RFLP, fingerprintingu ERIC i REP, technik ADSRRS i PCR-MP, amplifikacji i sekwencjonowania loci MLST, sekwencjonowania i analizy genomu szczepu 814/98 oraz analiz porównawczych genomów zgromadzonych w publicznych bazach danych. Zastosowane metody pozwoliły na ujawnienie różnicowania genetycznego szczepów na poziomie molekularnym oraz ich grupowanie (Olczak-Woltman et al., 2007, Słomnicka et al., 2015, Słomnicka et al., 2018).

W oparciu o wyniki testów patogeniczności i analizy molekularne stwierdzono, że szczepy należące do patowaru *lachrymans*, jakkolwiek wszystkie patogenne dla ogórka, różnią się wirulencją i wykazują zróżnicowanie genetyczne. Analiza filogenetyczna wykonana na podstawie danych



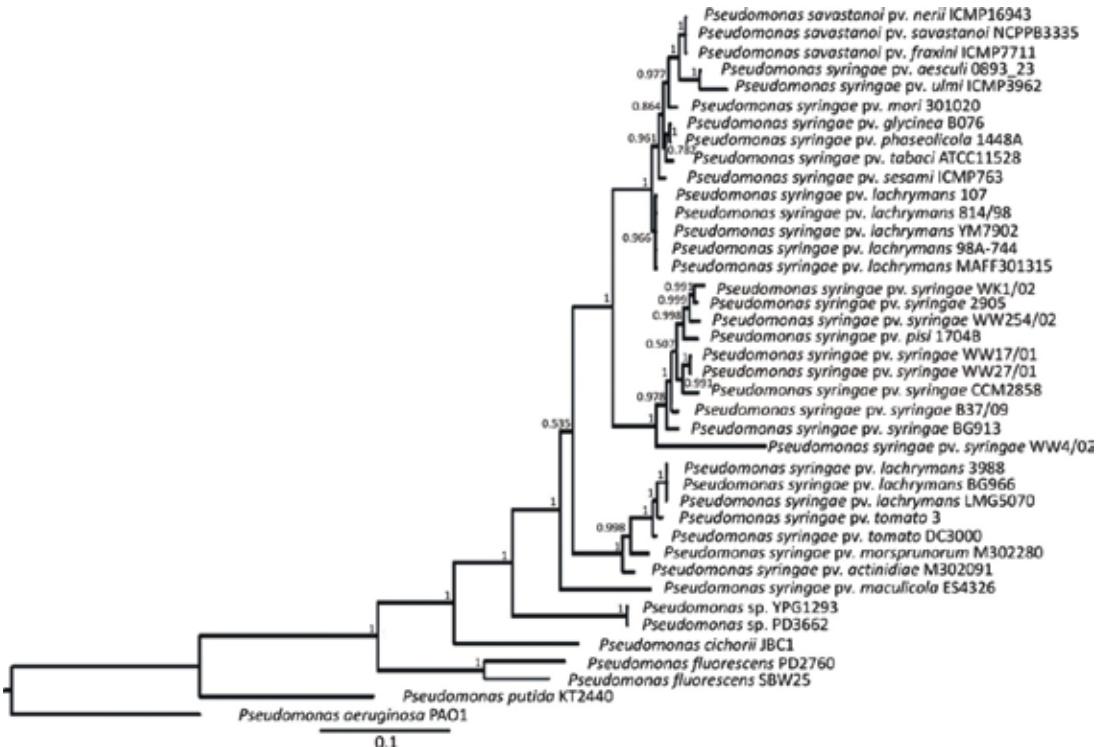
Rys. 1. Mukoidalny wzrost bakterii na pożywce agarowej zawierającej sacharozę – wytwarzanie lewanu, zróżnicowana fluorescencja szczepów na pożywce King B w świetle UV, oznaki etiologiczne w teście patogeniczności na liściach podatnej linii ogórka jako przykłady testów służących identyfikacji szczepów należących do patowaru *lachrymans*.

sekwencyjnych MLST, uzyskanych zarówno dla szczepów z kolekcji, jak i dla szczepów, których sekwencje zdeponowano w bazach danych NCBI, pozwoliła na wyróżnienie dwóch podgrup szczepów w obrębie patowaru *lachrymans*, z których jedna wykazuje podobieństwo m.in. do patowaru *phaseolicola*, zaś druga do patowaru *tomato* (Rys. 2, Słomnicka et al., 2018).

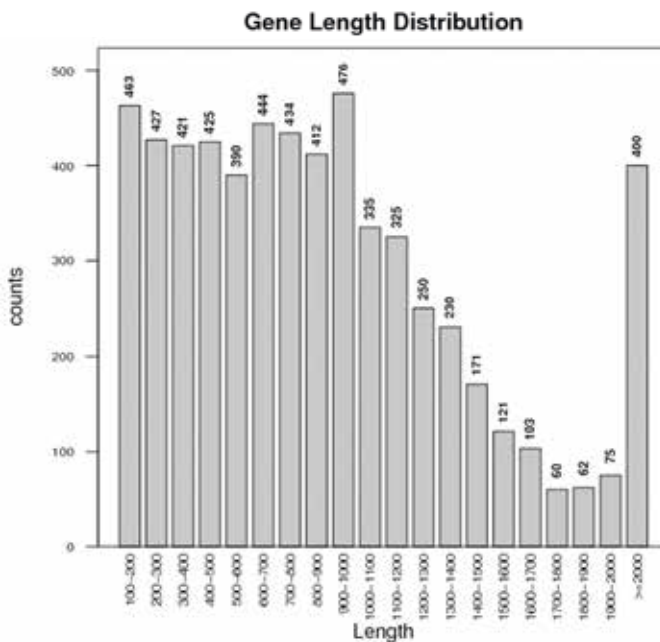
W puli szczepów wykazujących podobieństwo genetyczne do patowaru *phaseolicola* znajdują się szczepy z kolekcji własnej – 814/98 i CCM2857 charakteryzujące się silną wirulencją oraz dobrze opisany przez Baltrus i wsp. (2011) szczep MAFF301315. Szczepy te powodują powstawanie rozległych chloroz i nekroz otoczonych chlorotycznym halo z wyciekami bakteryjnymi na liściach wrażliwej linii ogórka. Do grupy wykazującej podobieństwo do patowaru *tomato* należą szczepy LMG5070 i BG966 z kolekcji własnej, charakteryzujące się słabszą wirulencją oraz opisany w literaturze szczep MAFF302278 (Baltrus et al., 2011). Szczepy te powodują powstawanie niewielkich, „papierowych” nekroz bez chloroz (Słomnicka et al., 2018).

Wybrane szczepy analizowano pod kątem obecności plazmidów i ich potencjalnego znaczenia w patogeniczności i wirulencji. Plazmidy rozdzielano techniką Eckhardta u 10 szczepów z kolekcji i stwierdzono, że szczep *Psl* 814/98 posiada trzy lub cztery plazmidy o wielkości około 200 kb, 100 kb, 50 kb i 40 kb. Trzy szczepy (BG283, BG966 i WW17/01) posiadają jeden plazmid o wielkości około 40–50 kb, a cztery szczepy (WK1/02, WW254/02, CCB37/09 i PD2021) posiadają jeden megaplazmid. Stwierdzono, że obecność plazmidów nie korelowała z wirulencją szczepów (Słomnicka et al., 2015). Podobne obserwacje przedstawili Romanczuk i wsp. (2014) w oparciu o wyniki badań nad megaplazmidem pMPPla107.

Wykonano sekwencjonowanie genomu szczepu *Psl* 814/98, będącego jednym z najbardziej wirulentnych szczepów należących do patowaru *lachrymans* w naszej kolekcji. Stwierdzono, że genom ten ma wielkość 6,58 Mb i zawartość GC 58% (NCBI GenBank Accession NBLF00000000, BioProject PRJNA380232). W genomie tego szczepu zidentyfikowano ponad 6000 genów kodujących białka, spośród których najliczniejsze były geny kodujące białka związane z metabolizmem i transportem komórkowym. Większość genów miała wielkość nieprzekraczającą 1000 pz (Rys. 3). Analiza strukturalna genomu wykazała obecność 208 tandemowych powtórzeń DNA. Były to długie powtórzenia oraz powtórzenia minisatelitarne i mikrosatelitarne. Nie zidentyfikowano powtórzeń typu CRISPR.

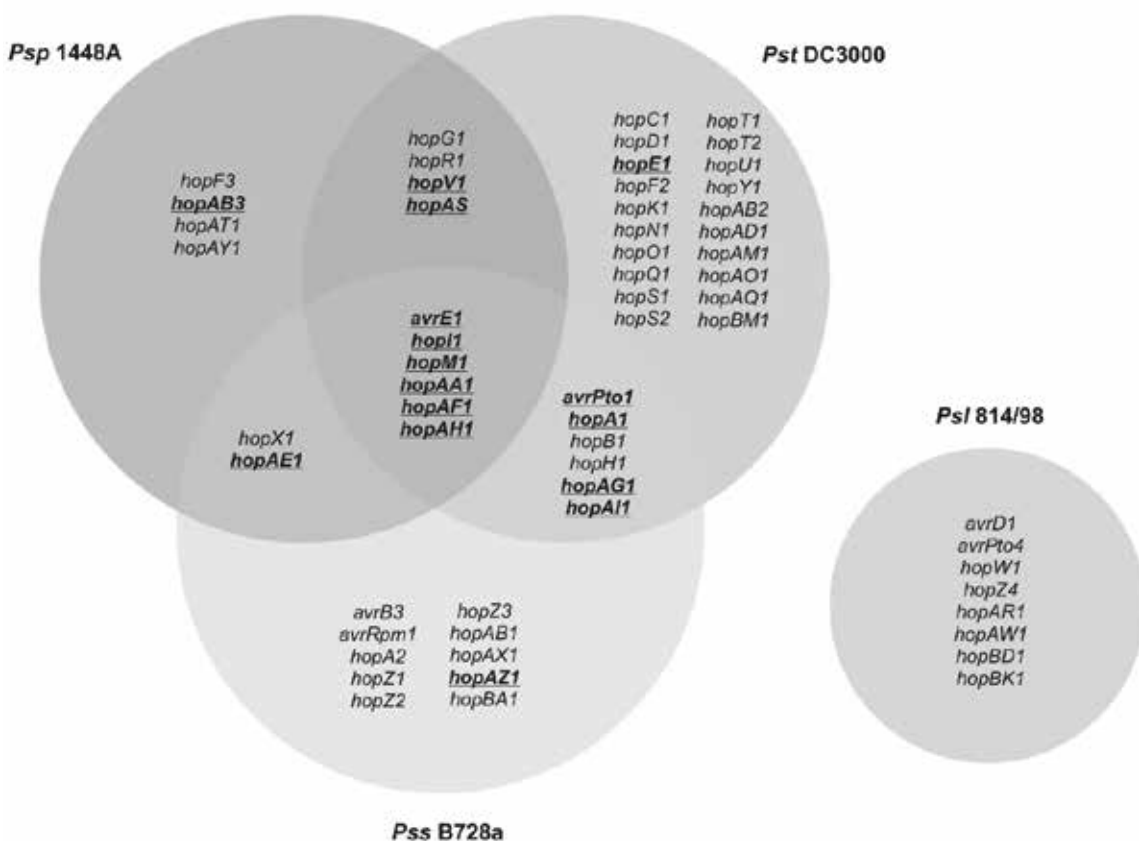


Rys. 2. Zróźnicowanie genetyczne szczepów *Pseudomonas* spp. – filogenetyczna analiza bayesowska wykonana na podstawie sekwencji fragmentów trzech genów MLST: *acn*, *gyrB* i *pgi* (Słomnicka et al., 2018).



Rys. 3. Zestawienie liczby i długości genów zidentyfikowanych w genomie *Psi* 814/98. Długość genów przedstawiono w parach zasad.

Analizy bioinformatyczne genomu *Psl* 814/98 potwierdziły obecność trzech hipotetycznych plazmidów. Na plazmidach tych zidentyfikowano 203 geny (odpowiednio 87, 69 i 47), jednak spośród tych genów tylko jeden kodował czynnik wirulencji (*hopAF1*). Tak więc wydaje się, że plazmidy występujące w szczepie 814/98 należącym do patowaru *lachrymans* nie mają wpływu na jego patogeniczność, a czynniki warunkujące wirulencję ulokowane są na chromosomie bakteryjnym. Wykorzystując analizy bioinformatyczne na chromosomie bakteryjnym szczepu *Psl* 814/98 zidentyfikowano 24 efekторы T3SS spośród 90 ogólnie znanych. Taki sam zestaw efektorów stwierdzono u 3 innych szczepów patowaru *lachrymans* (98A-744, 107 i YM7902) należących do tej samej podgrupy filogenetycznej, podczas gdy u szczepów MAFF302278 i 3998, należących do podgrupy szczepów *lachrymans* wykazujących podobieństwo do patowaru *tomato*, występował inny zestaw efektorów T3SS. Zestawienie efektorów wirulencji występujących u szczepów *P. syringae*, których genomy są dostępne w publicznych bazach danych, zobrazowane za pomocą diagramu Venna, przedstawiono



Rys. 4. Efekторы wirulencji obecne u szczepów referencyjnych – *P. syringae* pv. *tomato* DC3000, *P. syringae* pv. *syringae* B728A i *P. syringae* pv. *phaseolicola* 1448A. W części wspólnej diagramu znajdują się efekторы rdzenne (podstawowe) dla wszystkich szczepów *P. syringae*. Ponadto efekторы charakterystyczne dla patowaru *lachrymans* zostały pogrubione i podkreślone. Efekторы unikalne dla szczepu 814/98 przedstawiono oddzielnie (Słomnicka et al., 2018).

na rysunku 4. Stwierdzono występowanie efektorów podstawowych, obecnych u wszystkich szczepów referencyjnych, jak i efektorów unikalnych, charakterystycznych dla pojedynczych szczepów. Szczep *PsI* 814/98 posiada zestaw podstawowych, rdzennych efektorów TTE, 10 efektorów wspólnych dla szczepów patowaru *lachrymans* (podkreślone i pogrubione na rysunku 4) i osiem TTE unikalnych dla szczepu 814/98.

Przyrównując genomy reprezentujące dwie grupy szczepów ujawniono różnice strukturalne pomiędzy nimi. Z przeprowadzonych analiz bioinformatycznych wynika, że genom *PsI* 814/98 wykazuje największe podobieństwo do genomów szczepów 98A-744, 107, YM7902 i nieco mniejsze do MAFF301315. Pewnym ograniczeniem w analizach genomów szczepów należących do patowaru *lachrymans*, dostępnych w publicznych bazach danych, jest to, że sekwencjonowano i składowano je różnymi metodami, co przełożyło się na jakość sekwencji tych genomów i utrudnia analizy porównawcze. Zestawienie danych dotyczących dostępnych szczepów przedstawiono w tabeli 1.

Tabela 1. Dane dotyczące zsekwencjonowanych genomów szczepów *P. syringae* należących do patowaru *lachrymans*. Zestawienie wykonano w sierpniu 2018 w oparciu o bazę danych NCBI.

#	Nazwa szczepu	Technologia	Pokrycie genomu	Całk. dł. genomu [Mbp]	Liczba kontigów	Liczba skafoldów	Instytucja/Rok
1	814/98	Illumina Hiseq	157×	6,58	102	35	KGHIBR, SGGW w Warszawie, 2015
2	M301315	Illumina/454	b.d.	6,80	791	222	University of North Carolina, 2011
3	M302278	Illumina/454	b.d.	5,94	798	90	University of North Carolina, 2011
4	98A-744	Illumina Hiseq	510×	6,28	187	69	Korea Research Institute of Bioscience & Biotechnology, 2015
5	107	Illumina	216×	7,32	262	75	University of Toronto, 2015
6	YM7902	Illumina	187×	6,47	194	95	University of Toronto, 2015
7	ICMP3507	Illumina Miseq	35×	6,12	1521	512	University of Toronto, 2015
8	3988	Illumina	728×	6,06	264	128	University of Toronto, 2015
9	BS2122	Illumina Miseq	227×	6,56	26	b.d.	DOE Joint Genome Institute, 2016
10	NM002	PacBio	120×	6,01	1	1	Chinese Academy of Agricultural Sciences, 2017

Przeprowadzone badania pokazują zróżnicowanie szczepów *P.syringae* przynależnych do patogenu *lachrymans*. Zróżnicowanie to wykazano zarówno w testach patogeniczności wykonanych na roślinach wrażliwej linii ogórka, jak i w analizach zróżnicowania genetycznego opartego o analizy bakteryjnego DNA.

Badania realizowano w ramach programu badań podstawowych na rzecz postępu biologicznego w produkcji roślinnej dotowanego przez Ministerstwo Rolnictwa i Rozwoju Wsi.

## LITERATURA

- [1] Baltrus D.A., Nishimura M.T., Romanchuk A., Chang J.H., Mukhtar M.S., Cherkis K., Roach J., Grant S.R., Jones C.D., Dangi J.L., 2011. Dynamic evolution of pathogenicity revealed by sequencing and comparative genomics of 19 *Pseudomonas syringae* isolates. *PLoS Pathogens* 7 (7), e1002132.
- [2] Olczak-Woltman H., Masny A., Bartoszewski G., Plucienniczak A., Niemirowicz-Szczytt K., 2007. Genetic diversity of *Pseudomonas syringae* pv. *lachrymans* strains isolated from cucumber leaves collected in Poland. *Plant Pathol.* 56, 373–382.
- [3] Romanchuk A., Jones C.D., Karkare K., Moore A., Smith B.A., Jones C., Dougherty K., Baltrus D.A., 2014. Bigger is not always better: Transmission and fitness burden of ~1 MB *Pseudomonas syringae* megaplasmid pMPPla107. *Plasmid* 73,16–25.
- [4] Słomnicka R., Olczak-Woltman H., Bartoszewski G., Niemirowicz-Szczytt K., 2015. Genetic and pathogenic diversity of *Pseudomonas syringae* strains isolated from cucurbits. *Eur. J. Plant Pathol.* 141, 1–14.
- [5] Słomnicka R., Olczak-Woltman H., Oskiera M., Schollenberger M., Niemirowicz-Szczytt K., Bartoszewski G., 2018. Genome analysis of *Pseudomonas syringae* pv. *lachrymans* strain 814/98 indicates diversity within the pathovar. *Eur. J. Plant Pathol.* 151,663–676.

# „Omics” w badaniach nad bakteryjnymi patogenami roślin w Instytucie Ogrodnictwa

JOANNA PUŁAWSKA<sup>1</sup>, MONIKA KAŁUŻNA<sup>1</sup>, ARTUR MIKICIŃSKI<sup>1</sup>,  
WOJCIECH WARABIEDA<sup>1</sup>, NEMANJA KUZMANOVIĆ<sup>2</sup>, J.F. POTHIER<sup>3</sup>

<sup>1</sup>Instytut Ogrodnictwa, Skierniewice

<sup>2</sup>Julius Kühn-Institut, Braunschweig, Niemcy

<sup>3</sup>Institute of Natural Resource Sciences, Zurych, Szwajcaria

e-mail: joanna.pulawska@inhort.pl

Terminem „omics” są określane badania z dziedziny biologii, które mają na celu zbiorową charakterystykę i obliczanie puli cząsteczek biologicznych, które przekładają się na strukturę i funkcję organizmu lub organizmów. Wraz z rozwojem technik pozwalających na masową analizę cząstek będących składowymi organizmów żywych, badania wpisujące się w grupę „omics” odgrywają coraz większą rolę również w badaniach nad mikroorganizmami i są coraz częściej stosowane. Do najpowszechniejszych w bakteriologii należą genomika, transkryptomika, proteomika i metabolomika.

Sekwencjonowanie (MiSeq Illumina) i analiza genomu są już obecnie standardem w badaniach taksonomicznych, niezbędnym przy opisywaniu np. nowych gatunków bakterii. W Zakładzie Fitoopatologii Instytutu Ogrodnictwa, niejednokrotnie przy analizie materiału roślinnego z objawami chorobowymi, izolowano bakterie, które nie mogły być zaklasyfikowane do żadnego z istniejących gatunków. Porównanie ANI (Average Nucleotide Identity) ich genomów i genomów gatunków blisko spokrewnionych, co jest głównym kryterium klasyfikacji do gatunku, pozwoliło na opisanie szeregu nowych gatunków. Wśród bakterii wyizolowanych z roślin wykazujących objawy guzowatości odkryto i opisano: *Agrobacterium arsenijevici*, *A. rosae*, *Pararhizobium polonicum*, *Rhizobium tumorigenes*, natomiast z tkanek z objawami raka bakteryjnego na wiśniach – *Pseudomonas cerasi*. Przy charakterystyce szczepów nowych gatunków wykorzystano również analizę proteomiczną z zastosowaniem spektrometrii mas MALDI-TOF MS, dzięki której możliwe było porównanie profili białkowych szczepów badanych z najbliższej filogenetycznie spokrewnionymi.

Bakteria *Erwinia amylovora* wywołuje zarazę ogniową – najpoważniejszą chorobę bakteryjną jabłoni i grusz. Mimo, że szczepy tego gatunku mają bardzo podobne sekwencje DNA chromosomalnego, niektóre z nich różnią się składem DNA plazmidowego. Badania nad DNA plazmidowym 162

szczepów *E. amylovora* pochodzących z Polski i 160 z innych rejonów geograficznych wykazały, że w 5 szczepach, oprócz powszechnego plazmidu pEA29 obecne są dodatkowe plazmidy o innej wielkości. Ich sekwencjonowanie wykazało, że są to plazmidy o wielkości od 27 do 68 kbp, które oznaczono pEA27, pEA30, pEA68. Dodatkowo na podstawie porównawczych analiz sekwencji stwierdzono, że plazmid pEA68 był podobny do dwóch wcześniej opisanych plazmidów: pEA72 z USA i pEA78 z Meksyku. Analiza wykazała również, że tworzą one nową rodzinę plazmidów opisaną jako „rodzina pEA68”. Plazmid pEA68 jest podstawą tej rodziny, ponieważ jest najmniejszy i zawiera najwięcej genów występujących także w pozostałych plazmidach tej rodziny.

Chociaż bakterie *E. amylovora* stanowią bardzo homogeny gatunek zarówno pod względem cech biochemicznych jak i genetycznych, wykazują znaczne różnice w poziomie wirulencji. Celem naszych badań było poznanie bakteryjnych mechanizmów interakcji *E. amylovora* z rośliną gospodarzem – jabłonią (*Malus x domestica*), poprzez analizę porównawczą transkryptomów bakterii w procesie infekcji i rozwoju choroby na dwóch odmianach jabłoni: podatnej (Idared) i odpornej (Free Redstar) na zarazę ogniową. W celu sekwencjonowania transkryptomów *E. amylovora* szczepu 650, izolowano całkowite RNA bakterii rosnących na pożywce mikrobiologicznej TY oraz z zakażonych pędów jabłoni odm. Idared i Free Redstar po 24 h i 6 dniach od inokulacji. Z uzyskanych preparatów usuwano rRNA i przygotowywano biblioteki, które w dalszym etapie były sekwencjonowane na sekwenatorze genomowym MiSeq (Illumina) (Genomed S.A.). Uzyskane odczyty poddano analizie bioinformatycznej w celu określenia różnic w ekspresji genów bakteryjnych w poszczególnych kombinacjach. Największe różnice obserwowano między transkryptomami bakterii rosnących na podłożu TY oraz *in planta* (około 1500 genów o znacząco odmiennej ekspresji). Wśród genów bakterii o zwiększonej ekspresji *in planta*, nadreprezentowane były kategorie eggNOG/COG związane z transportem i metabolizmem aminokwasów, węglowodanów, jonów nieorganicznych.

Porównując ekspresję genów bakterii w podatnej i odpornej odmianie jabłoni, największe różnice były obserwowane po 24 h od inokulacji – 150 genów o zwiększonej i 142 geny o zmniejszonej ekspresji na odm. Idared w porównaniu do Free Redstar. Różnice te były nieznaczne w próbkach analizowanych 6 dni po inokulacji. W odmianie Free Redstar wyższą ekspresję obserwowano dla grupy genów związanych z odpowiedzią na stres, co może sugerować, że w tkankach tej odmiany panuje środowisko bardziej toksyczne dla bakterii. Wśród genów z najwyższą krotnością zmiany ekspresji między kombinacjami eksperymentalnymi lub najwyższą liczebnością transkryptów jest wiele genów bez przypisanych funkcji, które jak dotąd nie były testowane pod kątem ich roli w patogenności bakterii.

Wyniki uzyskane techniką RNA-seq zostały walidowane techniką RT-qPCR. Ekspresja 15 genów badanych była normalizowana wg najbardziej stabilnych genów referencyjnych: *proC*, *recA* i *ffh*. PCR w czasie rzeczywistym przeprowadzono z nowo zaprojektowanymi starterami. Badano wszystkie powtórzenia biologiczne do oceny ekspresji transkrypcji genów szczepu *E. amylovora* i każde powtórzenie biologiczne testowano w trzech powtórzeniach technicznych. Do oceny korelacji między RNA-seq i RT-qPCR zastosowano metodę Pearsona. Wysoka wartość współczynnika korelacji Pearsona ( $r = 0,954$ ;  $p < 0,001$ ;  $R^2 = 0,909$ ) wykazała dodatnią korelację między dwiema zmiennymi.

Analiza transkryptomów bakterii *Xanthomonas fragariae* IPO3485 szczepu sprawcy kanciastej plamistości liści truskawki, również wykazała podobny jak w przypadku badań nad *E. amylovora* poziom zmiany ekspresji genów *in planta* w stosunku do ekspresji na podłożu mikrobiologicznym. Geny w genomie szczepu zostały zaklasyfikowane do kategorii COG/eggNOG (Clusters of Orthologous Groups). W celu określenia, które z kategorii COG/eggNOG były statystycznie nadre-



prezentowane wśród genów o zwiększonej i zmniejszonej ekspresji przeprowadzono analizę rozkładu hipergeometrycznego przy  $FDR < 0,05$ . Analiza wykazała, że podczas infekcji najbardziej zwiększona jest ekspresja genów związanych z ruchliwością komórek, przewodzeniem sygnałów, transportem i metabolizmem jonów i węglowodanów oraz transkrypcją a najbardziej zmniejszona ekspresja genów związanych m.in. z produkcją energii i metabolizmem podstawowym, metabolizmem i transportem nukleotydów i tłuszczu. Wśród genów o najbardziej zwiększonej ekspresji *in planta* znalazły się przede wszystkim geny związane z syntezą flagelli i chemotaksją. Interesującym jest również fakt, że spośród 31 genów zlokalizowanych na plazmidzie, aż 16 podlegało odmiennej ekspresji *in planta* co może świadczyć o ich potencjalnej roli w interakcji bakterii z rośliną. Wśród genów o zróżnicowanej ekspresji zlokalizowanych zarówno na chromosomie jak i plazmidzie, znajduje się wiele takich, które kodują białka o nieznannej funkcji.

W celu określenia, geny których szlaków metabolicznych były statystycznie nadreprezentowane wśród genów o zwiększonej i zmniejszonej ekspresji przeprowadzono analizę rozkładu hipergeometrycznego przy  $FDR < 0,05$ . Analiza wykazała, że podczas infekcji najbardziej zwiększona jest ekspresja genów biorących udział w szlakach metabolicznych odpowiedzialnych za syntezę metabolitów wtórnych, ruchliwość komórek, transdukcję sygnałów a najbardziej zmniejszona ekspresja genów biorących udział w szlakach metabolicznych odpowiedzialnych za przemianę energii, syntezę kwasów nukleinowych, translację. Wyniki te uzyskane dla nowej wersji genomu szczepu IPO3485 nie różniły się od tych uzyskanych dla starej wersji genomu.

## LITERATURA

- [1] Ismail E., Blom J., Bultreys A., Ivanović M., Obradović A., van Doorn J., Bergsma-Vlami M., Maes M., Willems A., Duffy B., Stockwell V.O., Smits T.H.M., Puławska J., 2014. A novel plasmid pEA68 of *Erwinia amylovora* and the description of a new family of plasmids. *Archives of Microbiology* 196: 891–899.
- [2] Kałużna M., Willems A., Pothier J. F., Ruinelli M., Sobiczewski P., Puławska J., 2016. *Pseudomonas cerasi* sp. nov. (non Griffin, 1911) isolated from diseased tissue of cherry. *Systematic and Applied Microbiology* 39: 370–377.
- [3] Kuzmanović N., Puławska J., Prokić A., Ivanović M., Zlatković N., Jones J. B., Obradović A., 2015. *Agrobacterium arsenijevicii* sp. nov., isolated from crown gall tumors on raspberry and cherry plum. *Systematic and Applied Microbiology* 38: 373–378.
- [4] Kuzmanović N., Puławska J., Smalla K., Nesme X., 2018. *Agrobacterium rosae* sp. nov., isolated from galls on different agricultural crops. *Systematic and Applied Microbiology* 41 (3): 191–197
- [5] Kuzmanović N., Smalla K., Gronow S., Puławska J., 2018. *Rhizobium tumorigenes* sp. nov., a novel plant tumorigenic bacterium isolated from cane gall tumors on thornless blackberry. *Scientific Reports (Nature Publisher Group)*, 8, 1–8.
- [6] Kuzmanović N., Smalla K., Gronow S., Puławska J., 2018. *Rhizobium tumorigenes* sp. nov., a novel plant tumorigenic bacterium isolated from cane gall tumors on thornless blackberry. *Scientific Reports (Nature Publisher Group)*, 8, 1–8.
- [7] Puławska J., Kałużna M., Warabieda W., Mikiciński A., 2017. Comparative transcriptome analysis of a lowly virulent strain of *Erwinia amylovora* in shoots of two apple cultivars – susceptible and resistant to fire blight. *BMC Genomics* 18:868.
- [8] Puławska J., Kuzmanović N., Willems A., Pothier J.F., 2016. *Pararhizobium polonicum* sp. nov. isolated from tumors on stone fruit rootstocks. *Systematic and Applied Microbiology* 39 (3): 164–169.



# *Erwinia amylovora* jako nekrotrof

PIOTR SOBICZEWSKI<sup>1</sup>, ELENA T. IAKIMOVA<sup>2</sup>, ARTUR MIKICIŃSKI<sup>1</sup>,  
ELŻBIETA WĘGRZYNOWICZ-LESIAK<sup>1</sup>, JOANNA PUŁAWSKA<sup>1</sup>

<sup>1</sup>Instytut Ogrodnictwa, Skierniewice

<sup>2</sup>Institute of Ornamental and Medicinal Plants, Sofia-Negovan, Bułgaria

e-mail: Piotr.Sobiczewski@inhort.pl

Zaraza ogniowa (*Erwinia amylovora*) jest jedną z najbardziej szkodliwych chorób jabłoni (*Malus*) i grusz (*Pyrus*). W Polsce występuje od ponad 50 lat i corocznie wyrządza szkody o znaczeniu gospodarczym, zwłaszcza w sadach. Sprawca choroby jest polifagiem, ale oprócz szczepów porażających wyłącznie rośliny z rodzaju *Rubus*, nie wykazuje specjalizacji patogenicznej. Poraża ponad 130 gatunków roślin, głównie z rodziny różowatych, m.in.: głóg (*Crataegus*), pigwę (*Cydonia*), pigwowca (*Chaenomeles*) ognik (*Pyracantha*), irgę (*Cotoneaster*), jarząba (*Sorbus*) i świdośliwę (*Amelanchier*), (Van der Zwet i in., 2012). Źródłem pierwotnych infekcji roślin są bakterie, które przetrzymały jako pasożyty w zgorzelach powstałych na zdrewniałych organach roślin, a także bezobjawowo – w porażonych pędach i pąkach. W okresie wegetacji *E. amylovora* ma także zdolność przeżywania na powierzchni, zwłaszcza nowo rozwijających się organów, bez nawiązania z nimi pasożytniczego stosunku, jako epifit (Miller i Schroth, 1972; Sobiczewski, 1998; Thomson, 2000). Dotychczas nie udało się udowodnić zdolności przeżywania tej bakterii na obumarłej materii organicznej, np. w glebie, a także, że jest ona patogenem nekrotroficznym.

W celu wyjaśnienia możliwości przeżywania *E. amylovora* w zamartych tkankach roślin przeprowadzono badania na drzewkach jabłoni odm. Idared/M.26 oraz na roślinach tytoniu odm. Sam-sun, rosnących w pojemnikach w szklarni kwarantannowej i tunelu foliowym. Badania wykonane w 3 sezonach (2011/12, 2012/2013 i 2013/14), obejmowały następujące zagadnienia:

## 1. Przeżywalność *E. amylovora* w zamartych liściach jabłoni

Aktywnie rosnące wierzchołki niezdrewniałych pędów jabłoni inokulowano przez ich ucięcie poniżej pierwszego rozwiniętego liścia nożyczkami uprzednio zanurzonymi w zawiesinie szczepu Ea659 bakterii *E. amylovora* ( $10^7$  jtk/ml). W ciągu 4–5 tygodni zaraza ogniowa opanowała całe pędy i liście, a następnie rozprzestrzeniła się na pędy zdrewniałe. Po 5, 6, 7 i 8 miesiącach od inokulacji, ze znekrotyzowanych liści (oddzielnie z nerwu głównego i otaczającego go miękiszu,

nerwów bocznych oraz miękiszu między nerwami) pobierano próbki do badań na obecność bakterii stosując metody konwencjonalną (izolacja bakterii na pożywkę agar odżywczy z sacharozą) oraz zagnieżdżoną (nested) PCR (Llop i in., 2000) ze starterami AJ75 i AJ76 (McManus i Jones, 1995) oraz PEANT1 i PEANT2 (Llop i in., 2000). W celu sprawdzenia żywotności komórek tych liści zastosowano barwienie błękitem Evansa (Iakimova i in., 2013). Obserwacje mikroskopowe wykazały, że po 6 miesiącach od inokulacji pędów wszystkie komórki liści były zamarte. Żywe bakterie *E. amylovora* wykryto w ponad 50% próbek pobranych z nerwu głównego liści i z powyżej 10% nerwów bocznych. Natomiast w żadnym terminie badań nie wykryto bakterii w tkance miękiszowej liści. Stosując metodę PCR, DNA patogena wykryto w ponad 50% wszystkich prób, z których nie udało się wyizolować żywych komórek bakterii. Metoda ta nie pozwala jednak na odróżnienie żywych od martwych komórek *E. amylovora*. Badania nad wyjaśnieniem źródła odżywiania bakterii w zamartych liściach jabłoni wykazały występowanie w ich nerwie głównym oraz miękiszu glukozy [0,3–0,7 g/100g suchej masy – SM], sacharozy [12–22 g/100 SM] i skrobi [1–2,5 g/100 g SM], (Sobiczewski in., 2016). Wskazuje to na obecność potencjalnego źródła pożywienia dla patogena podczas zimy, sprzyjającego jego przeżywaniu, a co za tym idzie stanowiącego zagrożenie porażeniem roślin wiosną w okresach najbardziej sprzyjających – kwitnienie i wzrost młodych pędów.

### 2. Przeżywalność *E. amylovora* w nekrotycznych plamach na liściach jabłoni powstałych w wyniku reakcji nadwrażliwości (HR)

Na 4-tygodniowych pędach drzewek jabłoni inokulowano punktowo trzeci i czwarty liść od wierzchołka w kilku miejscach między nerwami bocznymi. Inokulacje wykonano zawiesiną szczepu Ea659 ( $10^8$  jtk/ml) za pomocą strzykawki lekarskiej bez igły (otwór 2 mm), (Iakimova i in., 2013). Po 18–48 h w miejscach inokulacji rozwinęły się okrągłe, nekrotyczne plamy o średnicy 5–6 mm, wyraźnie oddzielone od otaczających żywych komórek liści ciemnobrązową obwódką. Analiza morfologicznych i biochemicznych zmian komórek tych plam, z zastosowaniem barwienia błękitem Evansa wskazywała na ich fenotypowe podobieństwo do plam powstających wskutek reakcji nadwrażliwości HR na liściach tytoniu (plamy mikro- i makro HR). Morfologia zamartych komórek liści jabłoni (kurczenie się protoplastu i jego odrywanie się od ściany komórkowej przypominało efekt programowanej śmierci komórki). Indukcję reakcji nadwrażliwości, potwierdzono barwieniem 3,3'-diamino-benzzydynam (DAB) wykazując wytwarzanie  $H_2O_2$  w komórkach plam. W badaniach modelowych wykazano także, że powstawaniu plam towarzyszył podwyższony poziom produkcji etylenu (Iakimova i in., 2013). Plamy nie powiększały się w ciągu co najmniej 4 tygodni po inokulacji liści. Obecność żywych bakterii w plamach oraz otaczających tkankach badano metodą konwencjonalną (izolacje na pożywkę agar odżywczy z sacharozą) po 30 minutach, 24 godzinach i 4 tygodniach od inokulacji. Stwierdzono 4-krotny wzrost liczebności bakterii w tym okresie w miejscach plam, przy bardzo niewielkiej ich liczbie w tkankach otaczających nekrozę (Sobiczewski i in., 2016).

### 3. Przeżywalność *E. amylovora* w nekrotycznych plamach na liściach tytoniu powstałych w wyniku reakcji nadwrażliwości (HR)

Sposób inokulacji liści oraz wykonane analizy były podobne jak w przypadku jabłoni. Wielkość plam, które pojawiły się już 8 h po inokulacji, a całkowicie rozwinęły po 18 h, wynosiła 10–14 mm. Zamarta tkanka była sucha, biaława i o nieregularnym kształcie. Wykazano, że plamy te były wynikiem indukcji reakcji nadwrażliwości i nie powiększały się przez okres co najmniej 4 tygodni. Liczba żywych komórek *E. amylovora* w plamach zmniejszyła się około 10-krotnie w ciągu

24 godzin po inokulacji, ale w okresie następnym 4 tygodni zwiększyła się ponad 20-krotnie. Natomiast w tkance bezpośrednio przylegającej do nekrotycznej plamy bakterii nie wykryto w ogóle.

Tożsamość reizolowanych bakterii *E. amylovora* we wszystkich doświadczeniach potwierdzono metodami: konwencjonalną (morfologia kolonii na pożywkach), testem na indukcję reakcji nadwrażliwości na tytoniu, testem patogeniczności na zawiązkach owoców gruszy oraz metodą PCR ze starterami AJ75/AJ76 (McManus i Jones, 1995).

Przedstawione wyniki wskazują, że sprawca zarazy ogniowej wykazał zdolność przeżywania jako nekrotrof, co ma znaczenie epidemiologiczne, zwłaszcza z punktu widzenia obecności pierwotnego źródła infekcji wiosną i zagrożenia upraw roślin-gospodarzy (Sobiczewski in., 2016).

Badania zostały częściowo sfinansowane z projektu towarzyszącego EC Erasmus + Program w ramach współpracy między Instytutem Ogrodnictwa w Skierniewicach i Institute of Ornamental and Medicinal Plants, Sofia-Negovan, Bułgaria.

## LITERATURA

- [1] Iakimova E.T., Sobiczewski P., Michalczyk L., Węgrzynowicz-Lesiak E., Mikiciński A., Woltering E.J., 2013. Morphological and biochemical characterization of *Erwinia amylovora*-induced hypersensitive cell death in apple leaves. *Plant Physiology and Biochemistry* 63: 292–305.
- [2] Llop P., Bonaterra A., Peñalver J., López M.M., 2000. Development of a highly sensitive nested PCR procedure using a single closed tube for detection of *Erwinia amylovora* in asymptomatic plant material. *Applied and Environmental Microbiology* 66, 2071–78.
- [3] McManus P.S., Jones A.L., 1995. Detection of *Erwinia amylovora* by nested PCR and PCR-dot blot and reverse-blot hybridizations. *Phytopathology* 85, 618–23.
- [4] Miller T.D., Schroth M.N., 1972. Monitoring the epiphytic population of *Erwinia amylovora* on pear with selective medium. *Phytopathology* 62: 1175–1182.
- [5] Sobiczewski P., Klos E.J., 1998. Survival and scanning electron microscopy of *Erwinia amylovora* on apple leaves. *Phytopath. Pol.* 15: 57–63.
- [6] Sobiczewski P., Iakimova E.T., Mikiciński A., Węgrzynowicz-Lesiak E., Dyki B., 2016. Necrotrophic behaviour of *Erwinia amylovora* in apple and tobacco leaf tissues. *Plant Pathology*. Doi: 10.1111/ppa.12631; (2017) 66, 842–855.
- [7] Thomson S.V., 2000. Epidemiology of fire blight. In: Vanneste JL, ed. *Fire Blight. The Disease and Its Causative Agent Erwinia amylovora*. Wallingford, UK: CABI Publishing, 9–36.
- [8] Van der Zwet T., Orolaza-Halbrecht N., Zeller W., 2012. *Fire Blight: History, Biology and Management*. St Paul, MN, USA: APS Press.



# Projekt PATBIOCON – Mieszanina efektywnych bakterii antagonistycznych do kontroli mokrej zgnilizny ziemniaka w warunkach przechowywania i transportu

DOROTA M. KRZYŻANOWSKA<sup>1</sup>, TOMASZ MACIĄG<sup>1</sup>,  
JOANNA SIWIŃSKA<sup>2</sup>, MARTA KRYCHOWIAK<sup>3</sup>, SYLWIA JAFRA<sup>1</sup>,  
ROBERT CZAJKOWSKI<sup>3</sup>

<sup>1</sup>Pracownia Biologicznej Ochrony Roślin

<sup>2</sup>Zakład Ochrony i Biotechnologii Roślin

<sup>3</sup>Pracownia Badania Związków Biologicznie Czynnych,  
Międzyuczelniany Wydział Biotechnologii Uniwersytetu Gdańskiego  
i Gdańskiego Uniwersytetu Medycznego  
e-mail: Robert.Czajkowski@biotech.ug.edu.pl

Autorzy w równym stopniu przyczynili się do powstania tej pracy.

*Kompozycja antagonistycznych szczepów bakteryjnych do ochrony ziemniaka i roślin ozdobnych przeciwko bakteriom z rodzajów Pectobacterium spp. i Dickeya spp., powodującym czarną nóżkę i mokrą zgniliznę, jest przedmiotem zgłoszenia patentowego nr P.423806 złożonego przez Uniwersytet Gdański do Urzędu Patentowego RP z wynalazcami: Robertem Czajkowskim, Dorotą M. Krzyżanowską, Tomaszem Maciągiem, Joanną Sivińską i Sylwią Jafra.*

Ziemniak (*Solanum tuberosum* L.) jest jedną z najważniejszych roślin uprawnych zarówno ze względu na zajmowany obszar upraw jak i całkowitą produkcję bulw; czwartą rośliną uprawną pod względem ważności dla rolnictwa światowego po ryżu, kukurydzy i pszenicy (Leff et al., 2004). Ziemniak produkowany jest obecnie w 126 krajach, a obszar jego uprawy jest systematycznie powiększany, szczególnie w krajach rozwijających się, z uwagi na jego wysoką tolerancję na zmiany temperatury i jakość gleby, a także z powodu relatywnie dużych plonów (Food and Agriculture Organization – FAO, ONZ). W Europie ziemniaki konsumpcyjne i sadzeniaki produkowane są w Rosji, na Ukrainie, w Polsce, w Holandii, na Białorusi i w Niemczech. Polska jest drugim, po Niemczech, największym producentem ziemniaka w Europie (GUS, Polska, 2011, 2014).

Ziemniak atakowany jest przez około 160 różnych patogenów, z czego około dziesięć chorób ziemniaka powodowanych jest przez bakterie (Pérombelon, 2002). Choroby ziemniaka powodowane

przez bakterie pektynolityczne (bakterie z rodzajów *Pectobacterium* i *Dickeya*, wcześniej klasyfikowane jako bakterie z rodzaju *Erwinia*) (Charkowski, 2006) to czarna nóżka ziemniaka w okresie wzrostu roślin na polu i mokra zgnilizna bulw ziemniaka w trakcie przechowywania. Choroby te są jednymi z najważniejszych czynników powodujących straty w uprawie i produkcji ziemniaka w Europie i na świecie. Do chwili obecnej nie zostały opracowane metody kontroli zakażeń ziemniaków bakteriami pektynolitycznymi (Czajkowski et al., 2011).

Celem projektu PATBIOCON było opracowanie mieszaniny efektywnych bakterii antagonizujących do użycia przeciwko bakteriom pektynolitycznym na ziemniaku. Możliwości zwalczania bakterii pektynolitycznych na zainfekowanych bulwach ziemniaka badano w warunkach prowokacyjnych dla wystąpienia symptomów chorobowych. W tym celu wykorzystano kompozycje (mieszaniny) zawierające kompatybilne szczepy bakterii antagonizujących oraz specjalnie w tym celu opracowany protokół pozwalający na ocenę efektywności ochrony bulw. Efektywność antagonizującego działania dwudziestu dwóch szczepów bakterii antagonizujących została zbadana względem mieszaniny zawierającej pięć szczepów bakterii pektynolitycznych, najczęściej występujących na ziemniaku w Europie. Bakterie antagonizujące zostały przetestowane w postaci 15 kompozycji zawierających do 5 szczepów antagonizujących każda. Trzy mieszaniny (M2, M4 i M14) wykazały efektywność względem mieszaniny bakterii pektynolitycznych i dlatego zostały wybrane do dalszych prac. Pojedyncze szczepy bakteryjne, będące składnikami tych mieszanin, zostały następnie przetestowane na plastrach ziemniaka w obecności patogenów. Pięć szczepów antagonizujących wykazujących najlepszy efekt ochronny względem mieszaniny patogenów, to jest, szczepy: *Serratia plymuthica* A294, *Enterobacter amnigenus* A167, *Rahnella aquatilis* H145, *Serratia rubidaea* H440 i *Serratia rubidaea* H469 zostały wybrane do opracowania nowej mieszaniny (kompozycji) efektywnie chroniącej bulwy ziemniaka przed zakażeniem bakteriami pektynolitycznymi. Nową mieszaninę nazwano „The Great Five – Wielka piątka”. Kompozycja ta została przetestowana na ziemniakach-sadzeniakach w warunkach prowokacyjnych dla wystąpienia symptomów chorobowych (wysoka wilgotność, wysoka temperatura, ograniczony dostęp tlenu, wysokie inokulum patogenów). W tych warunkach aplikacja mieszaniny bakterii antagonizujących na zainfekowanych bakteriami pektynolitycznymi bulwach ziemniaka pozwoliła na obniżenie występowania symptomów chorobowych o 46% ( $p = 0.0016$ ). Otrzymane wyniki pozwalają założyć, że opracowana mieszanina bakterii antagonizujących będzie efektywnie zwalczać bakterie z rodzaju *Pectobacterium* spp. i *Dickeya* spp. powodujące choroby ziemniaka i innych roślin użytkowych i ozdobnych w warunkach przechowywania i transportu.

Projekt finansowany przez Narodowe Centrum Badań i Rozwoju (NCBiR), w ramach programu LIDER VI, grant nr LIDER/450/L-6/14/NCBR/2015 (Robert Czajkowski).

## LITERATURA:

- [1] Charkowski A.O., 2006. The Soft Rot Erwinia. *Plant-Associated Bacteria* part 3, 423–505.
- [2] Czajkowski R., Pérombelon M.C.M., Van Veen J.A., Van Der Wolf J.M., 2011. Control of blackleg and tuber soft rot of potato caused by *Pectobacterium* and *Dickeya* species: A review. *Plant Pathology* 60, 999–1013.
- [3] Leff B., Ramankutty N., Foley J.A., 2004. Geographic distribution of major crops across the world. *Global Biogeochem. Cycles* 18, GB1009.
- [4] Pérombelon M.C.M., 2002. Potato diseases caused by soft rot Erwinias: an overview of pathogenesis. *Plant Pathology* 51, 1–12.



# Antagonizm wybranych szczepów ryzosfery roślin użytkowych względem patogenów *Dickeya solani*, *Pectobacterium parmentieri* i *Rhizoctonia solani* – mechanizm działania

DOROTA KRZYŻANOWSKA<sup>1</sup>, ADAM OSSOWICKI<sup>1,2</sup>,  
MAGDALENA RAJEWSKA<sup>1</sup>, MAGDALENA JABŁOŃSKA<sup>1</sup>,  
TOMASZ MACIĄG<sup>1</sup>, PAOLINA GARBEVA<sup>2</sup>, SYLWIA JAFRA<sup>1</sup>

<sup>1</sup>Pracownia Biologicznej Ochrony Roślin, Międzyuczelniany Wydział Biotechnologii  
Uniwersytetu Gdańskiego i Gdańskiego Uniwersytetu Medycznego

<sup>2</sup>Department of Microbial Ecology, Netherlands Institute of Ecology (NIOO-KNAW)  
Wageningen, Holandia

e-mail: sylwia.jafra@biotech.ug.edu.pl

Ryzosfera, w przeciwieństwie do gleby poza strefą korzeniową, jest środowiskiem wysokiej aktywności mikroorganizmów, które konkurują o substancje odżywcze i niszę ekologiczną. Bakterie glebowe wykorzystują do wzrostu związki organiczne, takie jak cukry, kwasy organiczne i aminokwasy znajdujące się w wydzielinach korzeni roślin. Dostępność tych substancji w glebie jest różnicowana, z tego względu bakterie wykształciły różne mechanizmy zwiększające ich konkurencyjność w tym środowisku, m.in. produkują metabolity wtórne o charakterze przeciwdrobnoustrojowym. Substancje te mogą także korzystnie wpływać na roślinę, ale przede wszystkim pozwalają bakteriom przeżyć, a nawet uzyskać przewagę w warunkach wysokiego współzawodnictwa. Istotną rolę w interakcjach między mikroorganizmami odgrywają również produkowane przez nie związki lotne (Volatile Organic Compounds, VOCs). VOCs uczestniczą w międzygatunkowej komunikacji, działają przeciwdrobnoustrojowo, a także indukują reakcje obronne w roślinie.

Wiele szczepów bakterii ryzosfery zalicza się do tzw. bakterii promujących wzrost roślin (plant Growth Promoting Rhizobacteria, PGPR) [1]. Szczepy te wykorzystują takie mechanizmy jak: i) hamowanie wzrostu patogenów dzięki produkcji czynników przeciwdrobnoustrojowych, w tym VOCs, ii) dostarczanie składników mineralnych i synteza fitohormonów, iii) współzawodnictwo o substancje odżywcze i jony, iv) zakłócanie mechanizmu *quorum sensing*, v) indukcja odporności systemicznej oraz uruchamianie szlaków warunkujących nabytą odporność systemiczną. Ważną cechą szczepów PGPR jest również ich zdolność do kolonizacji i osiągnięcia stabilnej populacji w obrębie rośliny.

W ramach prowadzonych badań pozyskano z ryzosfery roślin uprawnych szereg izolatów bakteryjnych wykazujących antagonizm względem bakteryjnych fitopatogenów z gatunków *Dickeya* sp. i *Pectobacterium* sp. W prezentowanych badaniach skupiono się na dwóch szczepach: *Pseudomonas donghuensis* P482 i *Ochrobactrum* sp. A44, wykazujących zdolność do ochrony tkanki roślinnej

przed patogenami *D. solani* i *P. parmentieri*. Szczep P482 wykazuje również silną aktywność przeciw grzybowym patogenom roślin.

*P. donghuensis* P482 pochodzący z ryzosfery pomidora posiada cechy szczepu zdolnego do ochrony rośliny przed bakteryjnymi i grzybowymi patogenami roślin [2–4]. Jednak szczep ten nie produkuje, oprócz cyjanowodoru (HCN) i piowerdyny, innych dobrze opisanych dla pożytecznych *Pseudomonas* czynników przeciwdrobnoustrojowych [5]. Analiza bioinformatyczna genomu szczepu P482 potwierdziła obecność genów odpowiedzialnych za syntezę piowerdyny i HCN jako jedynych dotychczas opisanych czynników przeciwdrobnoustrojowych [3]. Mutageniza transpozonowa szczepu P482 oraz analiza bioinformatyczna oparta o platformę antiSMASH (Antibiotic and Secondary Metabolite Shell) pozwoliły na wyłonienie klastra genów istotnych dla syntezy czynników przeciwdrobnoustrojowych szczepu P482. Klaster ten znajduje się pośród 800 genów unikalnych dla tego szczepu. *P. donghuensis* P482 produkuje również substancje lotne o silnych właściwościach przeciwgrzybowych, ale nie przeciwbakteryjnych [4]. Synteza zarówno związków lotnych, jak i rozpuszczalnych, regulowana jest przez dwuskładnikowy system GacA/GacS [4] i zależy od dostępności substancji odżywczych i jonów żelaza.

Pochodzący z ryzosfery ziemniaka szczep *Ochrobactrum* sp. A44, zdolny jest do inaktywacji szerokiego spektrum cząsteczek sygnałowych z grupy laktonów *N*-acylohomoseryny (AHL) wykorzystywanych m.in. przez bakterie pektynolityczne z rodzajów *Dickeya* i *Pectobacterium* do regulacji ekspresji genów warunkujących patogeniczność tych bakterii. Szczep A44 wykazuje również zdolność do ochrony tkanki ziemniaka przed aktywnością *P. parmentieri*. Dzięki wykorzystaniu mutageny transpozonowej został zidentyfikowany gen kodujący enzym odpowiedzialny za inaktywację cząsteczek sygnałowych przez szczep A44. Enzym ten to acylaza AHL (AiiO), należąca do rodziny  $\alpha/\beta$  hydrolaz. W ramach prowadzonych badań sprawdzona została rola tego enzymu w ochronie tkanki bulw ziemniaka i liści cykorii przed *P. parmentieri* oraz w kolonizacji korzeni ziemniaka. Uzyskane wyniki potwierdziły istotność acylazy AiiO w ochronie tkanki roślin, natomiast inaktywacja genu kodującego ten enzym nie wpłynęła na zdolność do kolonizacji korzeni ziemniaka.

Oba badane szczepy są zdolne do ochrony tkanek roślinnych przed wybranymi patogenami oraz skutecznie kolonizują korzenie wybranych roślin użytkowych. Otrzymane wyniki wskazują na potencjał tych szczepów w biologicznej ochronie roślin.

Badania finansowane w ramach projektów Narodowego Centrum Nauki: OPUS4 2012/07/B/NZ9/01623 (*Pseudomonas donghuensis* P482) oraz OPUS7 2014/13/B/NZ9/02136 (*Ochrobactrum* sp. A44).

## LITERATURA

- [1] Kloepper J.W., 1980. Effects of rhizosphere colonization by plant growth-promoting rhizobacteria on potato plant development and yield. *Phytopathology*, 70:1078–1082.
- [2] Krzyzanowska D., Potrykus M., Golanowska M., Polonis K., Gwizdek-Wisniewska A., Lojkowska E., *et al.*, 2012. Rhizosphere bacteria as potential biocontrol agents against soft rot caused by various *Pectobacterium* and *Dickeya* spp. strains. *Journal of Plant Pathology*, 94: 367–378.
- [3] Krzyzanowska D.M., Ossowicki A., Rajewska M., Maciag T., Jablonska M., Obuchowski M., *et al.*, 2016. When genome-based approach meets the „old but good”: revealing genes involved in the antibacterial activity of *Pseudomonas* sp. P482 against soft rot pathogens. *Frontiers in Microbiology* 7: 782.
- [4] Ossowicki A., Jafra S., Garbeva P., 2017. The antimicrobial volatile power of the rhizospheric isolate *Pseudomonas donghuensis* P482. *PLOS ONE*, 12:e0174362.
- [5] Haas D., Defago G., 2005. Biological control of soil-borne pathogens by fluorescent pseudomonads. *Nature Review Microbiology*, 3:307–319.

# Gatunki bakterii o po raz pierwszy wykrytej zdolności do ochrony roślin przed zarazą ogniową, projekt BioSafeFood

ARTUR MIKICIŃSKI, PIOTR SOBICZEWSKI, JOANNA PUŁAWSKA

Instytut Ogrodnictwa, Skierniewice

e-mail: piotr.sobiczewski@inhort.pl

Ochrona roślin przed zarazą ogniową (*Erwinia amylovora*) obejmuje stosowanie różnych zabiegów ukierunkowanych na zapobieganie infekcji, zmniejszenie podatności roślin oraz eliminację potencjalnych źródeł infekcji (Sobiczewski, 2011). Wprowadzenie od 2014 roku obowiązku stosowania integrowanego systemu ochrony roślin, wiąże się z koniecznością traktowania metod niechemicznych jako priorytetowych. W tej sytuacji coraz większego znaczenia nabiera metoda biologiczna, w której stosuje się m.in. preparaty na bazie antagonistycznych wobec sprawców chorób roślin bakterii, grzybów i wirusów, wyizolowanych najczęściej z roślin i/lub gleb użytkowanych rolniczo. W wielu krajach prowadzone są obecnie intensywne badania nad opracowaniem skutecznych strategii walki z zarazą ogniową, które zaowocowały opracowaniem biopreparatów zawierających wyselekcjonowane szczepy takich gatunków bakterii jak: *Pantoea agglomerans* (Blossom Bless™, Bloomtime, PomaVita™), *Pantoea vagans* (BlightBan® C9-1), *Pseudomonas fluorescens* (BlightBan® A506), czy *Bacillus subtilis* (Serenade®, Biopro). Są one stosowane głównie w okresie kwitnienia jabłoni i gruszy, a także w programach integrowanych ze środkami chemicznymi (Mikiciński, 2017; Mikiciński i Sobiczewski, 2018).

Przedmiotem naszych badań było pozyskanie ze środowiska uprawy jabłoni (fylosfera, gleba) oraz z innych źródeł, bakterii wykazujących zdolności ochronne przed zarazą ogniową. Spośród około 500 izolatów przetestowanych wstępnie na zawiązkach owoców gruszy, wyselekcjonowano 13, które okazały się najbardziej perspektywiczne. Poddano je następnie badaniom na drzewkach jabłoni rosnących w pojemnikach w szklarni. Najwyższą skuteczność (81,4–93,4%) w ochronie kwiatów jabłoni wykazały izolaty L16, 35M, 48M, 56M 59M i 141M, a w ochronie pędów (86,2–100%) – izolaty 35M, 43M i 48M. W warunkach wysokiego zagrożenia chorobowego izolaty te okazały się nawet bardziej skuteczne niż środki miedziowe, polecane w praktyce przeciwko zarazie ogniowej. Określono także potencjalne mechanizmy determinujące antagonizm i zdolności ochronne badanych bakterii (relacje biotyczne z *E. amylovora* na sześciu pożywkach agarowych, wytwarzanie laktonów homoseryny – AHL i sideroforów, tworzenie biofilmu oraz obecność genów

kodujących antybiotyki – *phtB*, *phlD* i *phlC*, *phzA*, *prnD* oraz *gacA*). Uzyskane wyniki wskazują na brak jednoznacznej zależności między tymi parametrami. Jednak najczęściej z wymienionych mechanizmów posiadały izolaty 35M i 3M, co może mieć związek z ich wyróżniającą się skutecznością w ochronie kwiatów i pędów jabłoni.

Badania nad identyfikacją najbardziej skutecznych izolatów, obejmujące opracowanie ich charakterystyki fenotypowej oraz analizę sekwencji genu 16S rDNA wykazały, że 10 z nich należy do gatunków o dotychczas nie wykrytej zdolności do ochrony roślin przed zarazą ogniową. Są to izolaty: 3M (*Pseudomonas chlororaphis*), 49M (*Pseudomonas graminis*), 55M (*Pseudomonas mosseli*), 43M (*Enterobacter ludwigii*), L16 (*Pseudomonas vancouverensis*), 35M (*Pseudomonas congelans*), 59M (*Pseudomonas protegens*), 56M i 19CK (*Pseudomonas helmenticensis*) oraz 91M (*Pseudomonas koreensis*) (Mikiciński, 2017).

Dane literaturowe wskazują, że bakterie gatunku *Pseudomonas chlororaphis* (wcześniej *P. aureofaciens*) wyizolowano pierwszy raz z gleby, na której przez ponad 20 lat uprawiano pszenicę (Weller i Cook, 1983), a gatunku *Pseudomonas mosseli* ze środowiska klinicznego, jednak nie jest znana ich dokładna rola w tym środowisku (Dabboussi i in., 2002). Natomiast bakterie gatunku *Pseudomonas graminis* wyizolowano po raz pierwszy z fylosfery traw (Behrendt i in., 1999) Szczip referencyjny *Enterobacter ludwigii* wyizolowano również w warunkach klinicznych (Hoffmann i in., 2005). Jednak są doniesienia na temat szczepu BNM 0357 tego gatunku, pozyskanego z rizosfery życicy trwałej (*Lolium perenne*) i wykazującego zdolność stymulacji wzrostu i plonowanie różnych roślin (PGPR), (Shoebitz i in., 2009). Pierwszy opisany szczep *Pseudomonas vancouverensis* pozyskano z gleby leśnej w Kanadzie (Mohn i in., 1999). W późniejszych latach szczep tego gatunku wyosobniono z ryzosfery czosnku (Mishra i in., 2008). Bakterie gatunku *Pseudomonas congelans* obejmują grupę fluoryzujących pseudomonadów oryginalnie wyizolowanych z fylosfery traw (Behrendt i in., 2003). Wykazano ich bliskie pokrewieństwo z *P. syringae*. Ogólnie brak jest jednak informacji o potencjalnej patogeniczności tych bakterii wobec roślin. Z kolei bakterie *Pseudomonas protegens* wyizolowano z tytoniu, bawełny i pszenicy na różnych kontynentach. Autorzy badań zwrócili uwagę na fakt, że podstawą do wydzielenia nowego gatunku jest obecność genów *phl* i *plt* odpowiadających za biosyntezę odpowiednio 2,4-diacetylfluoroglucynolu i pioluteoryny, których to cech nie posiadały bardzo blisko spokrewnione z nim: *P. syringae*, *P. fluorescens* i *P. chlororaphis* (Ramette i in., 2011). Bakterie gatunku *Pseudomonas helmanticensis* pochodziły ze środowiska ściółki leśnej (Ramirez-Bahena i in., 2014). Również opisany po raz pierwszy szczep *P. koreensis* został wyizolowany ze środowiska glebowego (Kwon i in., 2003). W literaturze można spotkać przykład badań nad określeniem cech obu gatunków tych bakterii pod kątem przydatności w biologicznej ochronie przeciwko zgniliznie korzenia żeńszennia (Fan i in., 2016).

Izolat 48M posłużył do badań nad opracowaniem biopreparatu. Spośród czterech nośników, na których utrzymywano bakterie, najlepiej przeżywały one w talku z dodatkiem karboksymetylocelulozy lub alginianu sodu. Przyszłościowy preparat byłby przeznaczony przede wszystkim do sadów ekologicznych, a w przypadku sadów prowadzonych systemem integrowanym, można by go stosować przy niskim lub średnim zagrożeniu oraz w programie ze środkami miedziowymi.

Aktualnie w Instytucie Ogrodnictwa w Skierniewicach realizowany jest projekt o akronimie BioSafeFood pt. „Opracowanie technologii produkcji wysokiej jakości, bezpiecznych dla konsumenta owoców i warzyw z zastosowaniem nowych biopreparatów w ochronie upraw przed chorobami”. Głównym celem projektu jest opracowanie bezpiecznych biopreparatów do ochrony upraw sadowniczych i warzywnych przed najważniejszymi chorobami infekcyjnymi, które będą stanowiły ważny składnik nowych technologii uwzględniających możliwości integracji metod

proekologicznych z metodą chemiczną. W ramach projektu są prowadzone badania rozwojowe i przemysłowe, a ich efektem będą m.in. biopreparaty przeznaczone do ochrony sadów przed szarą pleśnią, zarazą ogniową jabłoni i gruszy i parchem jabłoni oraz owoców przed chorobami w okresie pozbiorczym.

## LITERATURA

- [1] Behrendt U., Ulrich A., Schumann P., Erler W., Burghardt J., Seyfarth W., 1999. A taxonomic study of bacteria isolated from grasses: a proposed new species *Pseudomonas graminis* sp. nov. *International Journal of Systematic Bacteriology* 49:297–308.
- [2] Behrendt U., Ulrich A., Schumann P., 2003. Fluorescent pseudomonads associated with the phyllosphere of grasses; *Pseudomonas trivialis* sp. nov., *Pseudomonas poae* sp. nov. and *Pseudomonas congelans* sp. nov. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology* 53:1461–1469.
- [3] Dabboussi F., Hamze M., Singer E., Geoffroy V., Meyer J.-M., Izard D., 2002. *Pseudomonas mosselii* sp. nov., a novel species isolated from clinical specimens. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology* 52:363–376.
- [4] Fan Z.-Y., Miao C.-P., Qiao X.-G., Zheng Y.-K., Chen H.-H., Chen Y.-W., Xu L.-H., Zhao L.-X., Guan H.-L., 2016. Diversity, distribution, and antagonistic activities of rhizobacteria of *Panax notoginseng*. *Journal of Ginseng Research* 40:97–104.
- [5] Hoffmann H., Stindl S., Stumpf A., Mehlen A., Monget D., Heesemann J., Schleifer K.H., Roggenkamp A., 2005. Description of *Enterobacter ludwigii* sp. nov., a novel *Enterobacter* species of clinical relevance. *Systematic and Applied Microbiology* 28:206–212.
- [6] Kwon S.W., Kim J.S., Park I.C., Yoon S.H., Park D.H., Lim C.K., Go S.J., 2003. *Pseudomonas koreensis* sp. nov., *Pseudomonas umsongensis* sp. nov. and *Pseudomonas jinjuensis* sp. nov., novel species from farm soils in Korea. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology* 53:21–27.
- [7] Mikiciński A., 2017. Bakterie i induktory odporności w ochronie jabłoni przed zaraza ogniową (*Erwinia amylovora*). Praca doktorska wykonana w Instytucie Ogrodnictwa w Skierniewicach, s. 218.
- [8] Mikiciński A., Sobiczewski P., 2018. Perspektywy zastosowania bakterii w ochronie jabłoni i gruszy przed zarazą ogniową (*Erwinia amylovora*) *Progress in Plant Protection*, DOI: 10.14199/ppp-2018-0xx
- [9] Mishra P.K., Mishra S., Selvakumar G., Bisht S.C., Bisht J.K., Kundu S., Gupta H.S., 2008. Characterisation of a psychrotolerant plant growth promoting *Pseudomonas* sp. strain PGERs17 (MTCC 9000) isolated from North Western Indian Himalayas. *Annals of Microbiology* 58:561–568.
- [10] Mohn W.W., Wilson A.E., Bicho P., Moore E.R.B., 1999. Physiological and phylogenetic diversity of bacteria growing on resin acids. *Systematic and Applied Microbiology* 22:68–78.
- [11] Ramette A., Frapolli M., Fischer-Le Saux M., Gruffaz C., Meyer J.M., Défago G., Sutra L., Moëgne-Loccoz Y., 2011. *Pseudomonas protegens* sp. nov., widespread plant-protecting bacteria producing the biocontrol compounds 2,4-diacetylphloroglucinol and pyoluteorin. *Systematic and Applied Microbiology* 34:180–188.
- [12] Ramírez-Bahena M.-H., Cuesta M.J., Flores-Félix J.D., Mulas R., Rivas R., Castro-Pinto J., Brañas J., Mulas D., González-Andrés F., Velázquez E., Peix Á., 2014. *Pseudomonas helmanticensis* sp. nov., isolated from forest soil. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology* 64:2338–2345.
- [13] Shoebitz M., Ribaud C.M., Pardo M.A., Cantore M.L., Ciampi L., Curá J.A., 2009. Plant growth promoting properties of a strain of *Enterobacter ludwigii* isolated from *Lolium perenne* rhizosphere. *Soil Biology and Biochemistry* 41:1768–1774.
- [14] Sobiczewski P., 2011. Integrated management of fire blight (*Erwinia amylovora*) on apple and pear. *Rasteniievüdni nauki (Plant science), Bulgaria*. 48, 6–13.
- [15] Weller D.M., Cook R.J., 1983. Suppression of take-all of wheat by seed treatments with fluorescent pseudomonads. *Phytopathology* 73:463–469.



# Eradykacja bakteryjnych patogenów roślin przy zastosowaniu wyładowań jarzeniowych generowanych pod ciśnieniem atmosferycznym

AGATA MOTYKA-POMAGRUK<sup>1</sup>, ANNA DZIMITROWICZ<sup>2</sup>,  
PIOTR JAMRÓZ<sup>2</sup>, EWA ŁOJKOWSKA<sup>1</sup>, PAWEŁ POHL<sup>2</sup>,  
WOJCIECH ŚLEDŹ<sup>1</sup>

<sup>1</sup> Katedra Biotechnologii, Międzyuczelniany Wydział Biotechnologii  
Uniwersytetu Gdańskiego i Gdańskiego Uniwersytetu Medycznego

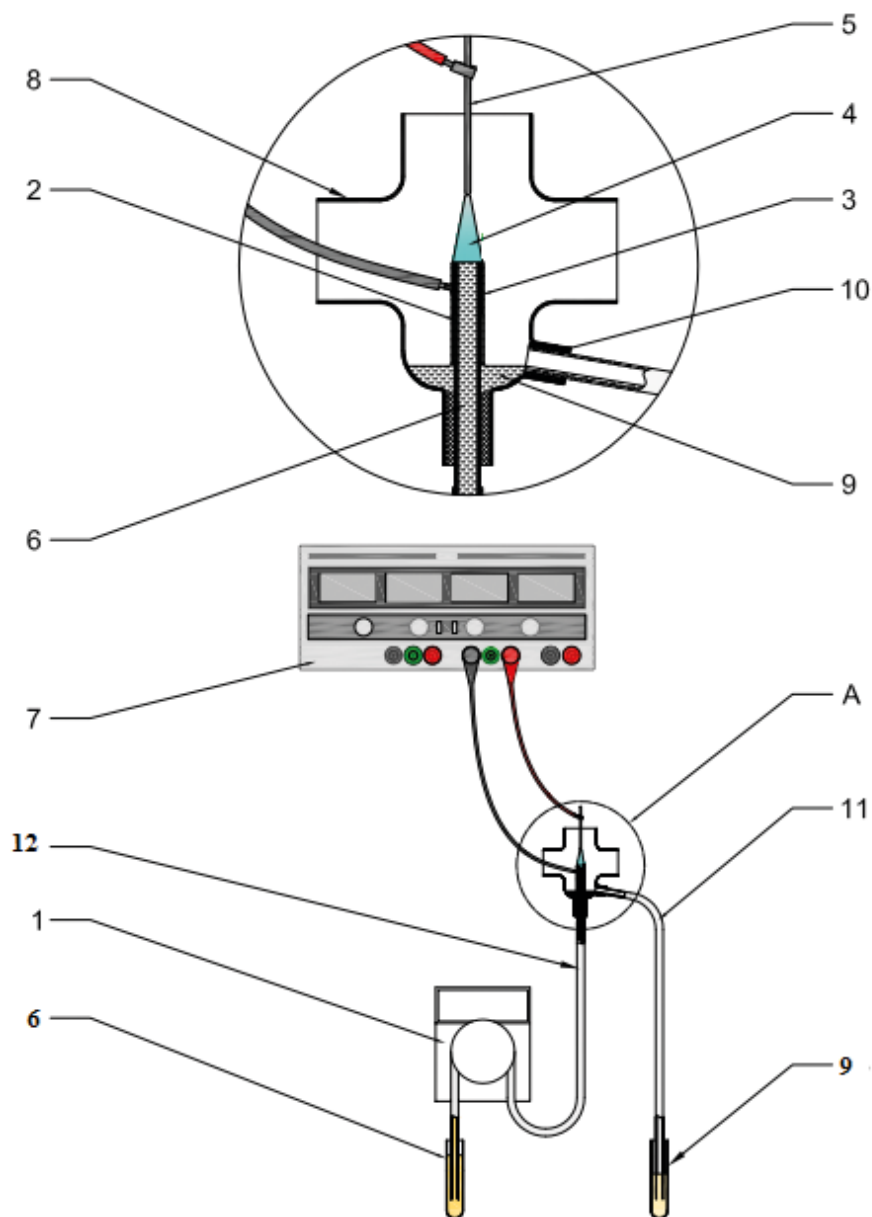
<sup>2</sup> Wydział Chemiczny, Politechnika Wrocławska

e-mail: wojciech.sledz@biotech.ug.edu.pl

Ochrona roślin przed patogenami oraz kontrola rozprzestrzeniania drobnoustrojów chorobotwórczych są jednymi z najważniejszych problemów rolnictwa. Z powodu chorób bakteryjnych, grzybowych i wirusowych traconych jest około 50% plonów (Ellis i Boehm, 2008). Straty ziemniaka w samej Holandii sięgają ok. 30 milionów euro rocznie (Prins i Breukers, 2008). Obecnie wdrożone działania zapobiegawcze opierają się głównie na kontroli rozmnażanego i wolnego od patogenów materiału roślinnego w oparciu o badania opisujące ścieżki rozprzestrzeniania drobnoustrojów patogennych. Należy podkreślić, że wyżej wspomniane rozprzestrzenianie jest często wynikiem m.in. działalności człowieka. Jedną z propozycji jest zastosowanie do nawożenia pól odpadów przemysłu ziemniaczanego zawierających sole mineralne pozyskiwane podczas płukania ziemniaków (Wiater i Skowrońska, 1998). Jednak ze względu na możliwość występowania fitopatogenów wykorzystanie takich odpadów wydaje się być ryzykowne. Zastosowanie płynnych odpadów pochodzących z przemysłu przetwórczego jest racjonalne tylko wtedy gdy są wolne od patogenów, a szczególnie uzasadnione jest w regionach rolniczych, w których występuje deficyt wody.

W ostatnich latach podjęliśmy się opracowania szybkiej, taniej i efektywnej metody eradykacji bakteryjnych fitopatogenów opartej o stałoprądowe wyładowanie jarzeniowe generowane pod ciśnieniem atmosferycznym (z ang. Direct Current Atmospheric Pressure Glow Discharge, dc-APGD)

- |                                                                 |                                 |
|-----------------------------------------------------------------|---------------------------------|
| 1 – pompa perystaltyczna;                                       | 7 – źródło wysokiego napięcia;  |
| 2 – rurka kwarcowa;                                             | 8 – komora wyładowcza;          |
| 3 – rurka grafitowa;                                            | 9 – układ reakcyjno-wyładowczy; |
| 4 – stabilne wyładowanie jarzeniowe typu dc-APGD;               | 10 – otwór odprowadzający;      |
| 5 – anoda, czyli elektroda wolframowa;                          | 11 – przewód wyprowadzający;    |
| 6 – ciepla katoda, czyli zawieszina bakteryjnych fitopatogenów; | 12 – wężyk doprowadzający.      |



Rys. 1. Schemat układu reakcyjno-wyładowczego do generowania wyładowania typu dc-APGD (A – powiększenie szczegółów układu).



w kontakcie z ciekłą katodą. Opracowano nowatorski układ reakcyjno-wyładowczy (Rys.1), w którym plazma niskotemperaturowa (tzw. zimna plazma – zjonizowany gaz zawierający jony, elektrony i cząstki obojętne), wytwarzana jest w przestrzeni pomiędzy dwiema elektrodami tj. stałą elektrodą metaliczną oraz tzw. przepływającą ciekłą katodą (z ang. *flowing liquid cathode*), którą stanowi zawiesina bakteryjnych fitopatogenów przeznaczonych do eradykacji.

Efektywność działania opracowanego układu wykazano na zawiesinach bakteryjnych o  $OD_{600} \approx 0,1$  *Dickeya solani* IFB0099 (Dsol), *Xanthomonas campestris* pv. *campestris* IFB9022 (Xcc), *Pectobacterium atrosepticum* IFB5103 (Pba), *Pectobacterium carotovorum* subsp. *carotovorum* IFB5118 (Pcc) oraz *Clavibacter sepedonicus* IFB9034 (Cms) w 0,85% NaCl. Stosując dc-APGD generowane w kontakcie z ciekłą katodą, którą stanowi zawiesina bakterii, uzyskano redukcję populacji bakterii wynoszącą od 99,96 do 100%.

Wyjaśnienie mechanizmu antybakteryjnego działania zainicjowanego wyładowania typu dc-APGD zaproponowano w oparciu o wyznaczone parametry spektroskopowe oraz analityczne, określone z zastosowaniem optycznej spektrometrii emisyjnej oraz pomiarów spektrofotometrycznych. Wyznaczono temperaturę rotacyjną związaną z temperaturą kinetyczną gazu plazmotwórczego ( $T_{rot}$  wynoszącej  $2300 \pm 100$  K) temperaturę wibracyjną ( $T_{wib}(N_2)$  rzędu  $4000 \pm 300$  K), temperaturę wzbudzenia ( $T_{wzb}(H)$  rzędu  $6050 \pm 400$  K), oraz gęstość elektronową ( $n_e$  wynoszącą  $1,1 \times 10^{15} \text{ cm}^{-3}$ ). Na podstawie zarejestrowanego widma emisyjnego potwierdzono generowanie przez dc-APGD wszystkich typów promieniowania UV tj. UVA, UVB oraz UVC. Ponadto odnotowano zmiany temperatury roztworu poddanego unieczynnieniu (z  $24,2^\circ\text{C}$  na  $40,2^\circ\text{C}$ ) oraz pH tej cieczy (z 6,0 na 10,80) przed i po kontakcie z plazmą atmosferyczną. Antybakteryjne działanie opracowanego układu wynika także z powstawania reaktywnych form tlenu (ROS) i azotu (RNS) generowanych przez dc-APGD, takich jak:  $H_2O_2$ ,  $NO_x$ ,  $NH$ ,  $N_2$ ,  $O$  and  $OH$ .

Potencjalne zastosowanie skonstruowanego urządzenia obejmuje jałowienie płynnych odpadów poprodukcyjnych z sektora rolniczego, przemysłu przetwórczego oraz z laboratoriów diagnostycznych bądź naukowych.

Prezentowany sposób eradykacji stanowi przedmiot zgłoszenia patentowego nr. P.419246.

## LITERATURA:

- [1] Ellis S.D., Boehm M.J., 2008. OSU Extension Factsheet – Introduction to Plant Disease. Series PP401.01 Plants Get Sick Too! An Introduction to Plant Diseases (Dostępne także: <http://ohioline.osu.edu/hyg-fact/3000/index.html>).
- [2] Prins H., Breukers A., 2008. Erwinia berokkent pootgoedsector vele miljoenen schade. Agri-monitor.
- [3] Wiater J., Skowrońska M., 1998. Odpad z przemysłu ziemniaczanego i jego przydatność do nawożenia (Waste material from potato industry and its suitability for soil fertilising). Prace Naukowe Politechniki Szczecińskiej. Instytut Technologii Nieorganicznej, Wydawnictwo Uczelniane Politechniki Szczecińskiej nr 547, 264–269.



# Białka różnicowe w bulwach odmian ziemniaka o różnym poziomie odporności na bakterie *Dickeya solani*

RENATA LEBECKA<sup>1</sup>, ZOFIA MURAWSKA<sup>1</sup>, KATARZYNA SZAJKO<sup>1</sup>,  
JANUSZ DĘBSKI<sup>2</sup>, MICHAŁ KISTOWSKI<sup>2</sup>, WALDEMAR MARCZEWSKI<sup>1</sup>

<sup>1</sup>Instytut Hodowli i Aklimatyzacji Roślin – Państwowy Instytut Badawczy

<sup>2</sup>Instytut Biochemii i Biofizyki Polskiej Akademii Nauk

email: r.lebecka@ihar.edu.pl

Mokra zgnilizna bulw ziemniaka to choroba powodowana przez szereg gatunków bakterii pektynolitycznych należących do dwóch rodzajów: *Pectobacterium* i *Dickeya*. W czasie wegetacji bakterie mogą też wywołać chorobę zwaną czarną nóżką ziemniaka. Bakterie pektynolityczne są zdolne porażać wiele innych gatunków roślin. Bakteria gatunku *Dickeya solani* została po raz pierwszy wyizolowana z ziemniaka w Polsce w 2005 r. (Sławiak i in., 2009), w latach 2009–2013 wykryto tę bakterię w uprawach ziemniaka w 11 województwach (Potrykus i in., 2016). Bakterie *Dickeya* spp. są bardziej agresywne od innych bakterii pektynolitycznych (Czajkowski i in., 2013). Straty ekonomiczne powodowane przez bakterie pektynolityczne to: obniżenie wielkości plonu bulw, utrata części plonu w czasie przechowywania lub wystąpienie czarnej nóżki w czasie sezonu wegetacyjnego. Do tego należy wspomnieć o znacznych kosztach związanych z degradacją plantacji nasienych. Nie stosuje się ochrony chemicznej do zwalczania bakterii wywołujących choroby ziemniaka. Dlatego celem hodowców jest otrzymanie nowych odmian ziemniaka o podniesionej odporności bulw na bakterie pektynolityczne. Pierwsze badania molekularne dziedziczenia odporności bulw na bakterie *Pectobacterium atrosepticum* w populacji mapującej wykazały występowanie 10 istotnych loci cech ilościowych na 10 różnych chromosomach ziemniaka, które zmapowano przy użyciu 496 markerów RLFP i ALFP (Zimnoch-Guzowska i in., 2000). Wyniki te wskazują na złożony charakter cechy, warunkowanej wieloma czynnikami genetycznymi i środowiskowymi. Nie znaleziono skrajnej odporności w ziemniaku uprawnym i dzikich gatunkach *Solanum*. Odmiany ziemniaka różnią się między sobą pod względem liczby porażonych bulw i nasilenia objawów porażenia. Rozwojowi symptomów choroby sprzyja wysoka temperatura i niski poziom tlenu. Wraz z rozwojem technik identyfikacji białek, za pomocą czułych metod, oraz systematycznym poszerzaniem dostępnych baz danych białek *Solanum tuberosum* i roślin blisko spokrewnionych, w IHAR-PIB w oddziale w Młochowie podjęto badania nad odpornością ziemniaka na bakterie pektynolityczne na pozio-

mie proteomu. Pierwsze badania proteomiczne bulw pochodzących z dwóch odmian ziemniaka, różniących się poziomem odporności na bakterię *Pectobacterium atrosepticum* przeprowadzono we Francji. Wykazały one obecność 13 białek różnicowych zidentyfikowanych 48 h po inokulacji wyłącznie w odmianie o wyższej odporności (Barzic i in., 2012). Do naszych badań wybrano odmianę ziemniaka o skrajnie różnej reakcji na porażenie przez wysokoagresywny izolat bakterii *D. solani* w warunkach sprzyjających rozwojowi choroby. Celem pracy było znalezienie różnic w ekspresji białek w odmianach ziemniaka o podwyższonej odporności na bakterię *Dickeya solani* w porównaniu z odmianami podatnymi, 8 i 48 godzin po inokulacji.

Analiza proteomiczna składa się z wielu etapów: przygotowania próbek do analizy, analizy próbek, identyfikacji białek i analizy statystycznej.

- 1) Przygotowanie próbek do analizy. Opracowano protokół izolacji białka z bulwy ziemniaka (Murawska i in., 2017). W trakcie izolacji całkowitą zawartość białka w próbce mierzono dwukrotnie metodą BCA (Smith i in., 1985), w oparciu o dwie krzywe wzorcowe, w celu otrzymania próbek o zawartości 50 µg białka. Białka trawiono za pomocą endoproteinazy Lys-C a następnie trypsyny.
- 2) Analiza próbek metodą wysokosprawnej chromatografii cieczowej sprzężonej z tandemowym spektrometrem mas (LC-MS/MS). Mieszanina peptydów uzyskana z każdej próbki jest mierzona przy pomocy spektrometru mas sprzężonego z chromatografem cieczowym. Wynikiem takiego pomiaru są widma przedstawiające masę mierzonych peptydów oraz ich intensywność. Dla najbardziej intensywnych peptydów wykonywany jest dodatkowy pomiar, polegający na fragmentacji peptydów, uzyskując w ten sposób dodatkowo widma fragmentacyjne. Widma fragmentacyjne pozwalają na ustalenie sekwencji aminokwasowej peptydu, a tym samym na identyfikację białka, z którego ten peptyd pochodzi.
- 3) Identyfikacja białek. Kolejny etap obejmuje analizę bioinformatyczną wyników uzyskanych ze spektrometru. Przy pomocy zestawu programów, na podstawie widm fragmentacyjnych, ustalana jest lista peptydów/białek obecnych w badanej próbce z *Solanum tuberosum* oraz ich względna intensywność. Następnie, listy peptydów są grupowane zgodnie z układem eksperymentu. Program Diffprot (Malinowska i in., 2012) porównuje grupy eksperymentalne pomiędzy sobą, obliczając zależności statystyczne i typując białka, których poziom ekspresji pomiędzy badanymi grupami zmienił się w sposób istotny statystycznie.

Na podstawie trzyletniej oceny porażenia bulw w testach laboratoryjnych (Lebecka, 2017) wybrano dwie odmiany o wyższej odporności (Bea i Humalda) i trzy odmiany o niższej odporności (Kathdin, Ulster Supreme i Irys). Doświadczenie prowadzono w dwóch terminach w odstępie jednego miesiąca, w marcu i w kwietniu, w dwóch latach badań. W pierwszym roku badań próbki pobierano 48, a w drugim roku 8 godzin po inokulacji. Bulwy inokulowano w świeżo zranioną tkankę, bulwy kontrolne były ranione i traktowane wodą. Bulwy po inokulacji zraszano wodą, umieszczano w zamkniętych pudełkach i przechowywano w temperaturze 26°C. W czasie pobierania próbek bulwy krojono wzdłuż miejsca inokulacji, fragmenty tkanki pobierano za pomocą korkoboru wzdłuż miejsca inokulacji i mrożono w ciekłym azocie (Murawska i in., 2017). Pobierano od dwóch do czterech fragmentów każdej kombinacji doświadczenia.

Porównanie białek z bulw inokulowanych bakteriami *D. solani* z białkami bulw zranionych i traktowanych wodą. Przeprowadzono cztery porównania, dla każdej z grup odmian osobno, po 8 i 48 godzinach po inokulacji. Wyróżniono wyłącznie jedno białko różnicowe, peroksydazę, w grupie odmian odpornych, 48 godzin po inokulacji.

Porównanie białek z bulw odmian odpornych z podatnymi. We wczesnej fazie infekcji, 8 godzin po inokulacji, wyróżniono 4 białka (patatyny, inhibitory proteinaz i inhibitor chymotrypsyny), których ekspresja była istotnie wyższa w odmianach odpornych, w próbkach pobranych zarówno z bulw inokulowanych bakterią jak i traktowanych wodą. Wyższą ekspresją w odmianach odpornych, tylko po inokulacji, charakteryzowały się dwa białka, inhibitor proteinazy PTI i syntetaza tiaminowa. W późniejszej fazie infekcji w odmianach odpornych w obu rodzajach bulw, inokulowanych i traktowanych wodą, było istotnie więcej inhibitorów proteinaz, patatyny (tak samo jak po 8h) i inhibitorów proteazy serynowej. Wyróżniono białka o wyższej ekspresji w odmianach odpornych wyłącznie po inokulacji bakteriami, inhibitory proteazy aspartylowej, oksydazy polifenolowe i endoplazminy.

Wykazano różnice w białkach pomiędzy odpornymi i podatnymi odmianami na mokrą zgniliznę bulw, w początkowej i późniejszej fazie infekcji. Większość białek różnicowych występuje w bulwach zranionych i inokulowanych bakteriami w zranienia. W celu sprawdzenia czy różnice w białkach są powodowane przez uszkodzenia mechaniczne bulwy czy występują także w bulwach niezranionych pobrano próby z bulw nietraktowanych z doświadczenia 8 godzin po inokulacji. Analizy próbek są w trakcie realizacji.

## LITERATURA

- [1] Barzic M.R., Com E., 2012. Proteins involved in the interaction of potato tubers with *Pectobacterium atrosepticum*: a proteomic approach to understanding partial resistance. *J Phytopathol* 160:561–575.
- [2] Czajkowski R., De Boer W.J., Van der Zouwen P.S., Kastelein P., Jafra S., de Haan E.G., Van den Bovenkamp G.W., Van der Wolf J.M., 2013. Virulence of „*Dickeya solani*” and *Dickeya dianthicola* biovar-1 and -7 strains on potato (*Solanum tuberosum*). *Plant Pathol* 62:597–610.
- [3] Lebecka R., 2017. Screening for potato resistance to blackleg and soft rot. *Plant Breeding and Seed Science* 75: DOI: 10.1515/plass-2017-00013.
- [4] Malinowska A., Kistowski M., Bakun M., Rubel T., Tkaczyk M., Mierzejewska J., Dadlez M., 2012. Diffprot – software for non-parametric statistical analysis of differential proteomics data. *J Proteomics* 75 (13): 4062–73.
- [5] Murawska Z., Dębski J., Szajko K., Lebecka R., 2017. Isolation of proteins from potato tubers. *Plant Breeding and Seed Science* 75: DOI: 10.1515/plass-2017-0005.
- [6] Potrykus M., Golanowska M., Śledź W., Zoledowska S., Motyka A., Kolodziejska A., Butrymowicz J., Lojkowska E., 2016. Biodiversity of *Dickeya* spp. isolated from potato plants and water sources in temperate climate. *Plant Dis* 100:408–417.
- [7] Sławiak M., Lojkowska E., Van der Wolf J.M., 2009. First report of bacterial soft rot on potato caused by *Dickeya* sp. (syn. *Erwinia chrysanthemi*) in Poland. *Plant Pathol.* 58:794.
- [8] Zimnoch-Guzowska E., Marczewski W., Lebecka R., Flis B., Schäfer-Pregl R., Salamini F., Gebhardt C., 2000. QTL analysis of new sources of resistance to *Erwinia carotovora* ssp. *atroseptica* in potato done by AFLP, RLFP, and resistance-gene-like markers. *Crop Science* 40: 1156–1167.



# Aktualne kierunki badań nad bakteriozami roślin rolniczych w Instytucie Ochrony Roślin – Państwowym Instytucie Badawczym

JOANNA KAMASA, KRZYSZTOF KRAWCZYK, AGNIESZKA ZWOLIŃSKA  
Instytut Ochrony Roślin – Państwowy Instytut Badawczy, Poznań  
e-mail: jkamasa@iorpib.poznan.pl

W Zakładzie Wirusologii i Bakteriologii prowadzone są badania nad bakteriozami roślin obejmujące różne aspekty etiologii, epidemiologii i zwalczania tych chorób. Rośliny uprawne, szczególnie te wykazujące nietypowe objawy chorobowe, badane są pod kątem obecności patogenów bakteryjnych. W przypadku wykrycia, ich rola jako czynnika sprawczego choroby jest badana doświadczalnie. Obecnie trwają prace nad charakterystyką nowych, nieopisanych dotąd, patogenów bakteryjnych pszenicy, soi i morwy. Dotychczas wykryto następujące patogeny: *Pantoea ananatis* (pszenica), *Kosakonia cowanii* (soja) i *Pseudomonas syringae* (morwa).



Fot. 1. Objawy chorobowe na liściach pszenicy spowodowane przez *Pantoea ananatis*



Fot. 2. Objawy chorobowe na liściach soi odm. Sułtan spowodowane przez *Kosakonia cowanii*

Po raz pierwszy wykryto również bakterię *Pseudomonas syringae* na roślinach morwy (*Morus alba* L.)



Fot. 3. Objawy chorobowe powodowane przez *Pseudomonas syringae* na liściach morwy (*Morus alba* L.)



Większość identyfikowanych patogenów pochodzi z materiału badanego w Klinice Chorób Roślin, która została powołana w marcu 2011 roku, jako jeden ze wskaźników projektu finansowanego z funduszy Unii Europejskiej „Modernizacja laboratoriów dla wzmocnienia innowacyjności badań w zakresie ochrony roślin i działań na rzecz gospodarki”.

Głównym zadaniem Kliniki jest identyfikacja sprawców chorób wirusowych, bakteryjnych i grzybowych, a także fitoplazm, na roślinach warzywnych i rolniczych. Do identyfikacji chorób bakteryjnych stosowany jest system BIOLOG GENIII, który działa w oparciu o charakterystykę cech biochemiczno-fizjologicznych badanych izolatów i porównanie wyników z bazą danych. W niektórych przypadkach identyfikacja zostaje potwierdzona na podstawie sekwencji genu 16S rDNA. Najczęściej diagnozowane w klinice rośliny to pomidory, ogórki, ziemniaki, buraki, cebula, oraz szereg roślin ozdobnych. Większość wykrywanych patogenów należy do rodzajów *Pseudomonas*, *Enterobacter*, *Burkholderia*, *Xanthomonas*, *Curtobacterium*. Kilkakrotnie stwierdzano obecność bakterii stanowiących mikroflorę ludzką takich jak: *Staphylococcus epidermis*, *Klebsiella oxytoca*, *Klebsiella pneumoniae*, *Proteus mirabilis*. Zjawisko to jest określane w literaturze jako HPOPs (ang. Human Pathogens On Plants).

W roku 2007 rozpoczęto badania nad chorobami fitoplazmatycznymi roślin rolniczych. Fitoplazmy są to pasożytnicze bakterie, zasiedlające łyko roślin oraz hemolimfę i niektóre organy piewików (Auchenorrhyncha) – drobnych owadów, które przenoszą patogen w środowisku. Fitoplazmy zmniejszają plonowanie roślin, przez wywoływanie niekorzystnych zmian morfologicznych, na które składają się m.in. karłowaty pokrój roślin, skręcanie pędów, przebarwienia, krzewienie, czy deformacje kwiatów. Te złożone objawy chorobowe są efektem działania fitoplazmatycznych genów wirulencyjnych (tzw. efektorów). Na przestrzeni 10 lat, na terenie zachodniej Polski, opisano infekcje fitoplazmatyczne na ważnych gospodarczo roślinach uprawnych, m.in. rzepaku i buraku cukrowym. Pojedyncze ogniska chorób fitoplazmatycznych wykrywano również na innych roślinach rolniczych, tj. marchew, kalafior, gorczyca, kukurydza, groch, czy łubin. Na wszystkich badanych uprawach wykrywano fitoplazmy należące do podgrupy rybosomalnej 16SrI-B lub podgrup blisko spokrewnionych (16SrI-L, 16SrI-(B/L) L). Podjęto również badania zmierzające do określenia, gatunku owada będącego wektorem tych chorób, a także poznania naturalnych źródeł infekcji w postaci roślin dzikich zasiedlających okolice pól uprawnych. Obecnie jedynym potwierdzonym wektorem fitoplazm spokrewnionych z podgrupą 16SrI-B na terenie Polski jest skoczek sześciorek (*Macrostelus laevis*, Cicadomorpha). Owad ten przenosi fitoplazmę na rzepak, jęczmień oraz rośliny dzikie np. stulisz lekarski (*S. officinale*), stulichę psią (*D. sophia*), rzodkiewnik pospolity (*A. thaliana*). Wyniki testowania roślin dzikich zasiedlających okolice pól uprawnych pokazały, że byliny takie jak trawa życica trwała (*L. perenne*), jak również rośliny jednoroczne, zdolne do przetrzymywania takie jak stulisz lekarski, fiołek polny, chwastnica jednostronna, czy maruna bezwonna (*S. officinale*, *V. arvensis*, *E. crus-galli*, *M. perforata*), które wcześniej nie były opisywane jako gospodarze fitoplazm, mogą być ważnym inokulum patogenu, odgrywając ważną rolę w epidemiologii chorób fitoplazmatycznych.

Stałe odłowy piewików w latach 2015–2018, w lokalizacjach na północy i południu Polski oraz monitoring zakażeń fitoplazmami, ujawniły obecność nowych szczepów fitoplazmatycznych na terenie kraju. W owadach różnych gatunków wykryto m.in. fitoplazmę należącą do podgrupy rybosomalnej 16SrI-F, która wcześniej opisywana była na moreli na terenie Hiszpanii powodując chlorotyczne zwijanie się liści moreli (ang. Apricot Chlorotic Leaf Roll, ACLR-AY), (Lee i wsp., 1998) oraz na ziemniaku w Ekwadorze, gdzie wywoływała purpurowe szczyty ziemniaka (ang. *potato purple top*), (Castillo-Carrillo i wsp., 2018).

Obecnie trwają prace nad charakterystyką wybranych szczepów fitoplazm pod kątem zakresu roślin żywicielskich oraz patogeniczności wynikającej z ich zasobu efektorów.

Obok badań na bakteriozami, prowadzone są również doświadczenia mające na celu wyselekcjonowanie ze środowiska naturalnego dwóch grup izolatów bakteryjnych o następujących właściwościach: (i) hamujących rozwój i powstawanie zgnilizn warzyw w przechowalniach oraz (ii) chroniących rośliny uprawne przed infekcjami powodowanymi przez grzyby. Wyselekcjonowano izolaty ograniczające powstawanie i rozwój niespecyficznych zgnilizn na warzywach w przechowalniach, powodowanych przez m.in. przez *Pectobacterium carotovorum*. Skład opracowanego konsorcjum obejmuje następujące gatunki bakterii: *Stenotrophomonas rhizophila*, *Serratia marcescens* i *Serratia liquefaciens*. Wykazano dobrą efektywność tego konsorcjum w ograniczaniu nasilenia niespecyficznych zgnilizn na warzywach, w przechowalniach. Wytypowano także izolaty o najwyższej skuteczności w ograniczaniu objawów chorobowych powodowanych przez grzyby *Alternaria solani* i *Fusarium oxysporum* na pomidorze w warunkach szklarniowych. Najbardziej obiecujący okazał się szczep *Pseudomonas synxantha* SP 56, natomiast najmniej skuteczne było konsorcjum składające się z trzech szczepów: *Klebsiella oxotoca* SP50, *P. synxantha* SP56 i *Pantoea agglomerans* Ri18. Uzyskane wyniki wskazują na ich duży potencjał aplikacyjny. Konieczne są jednak dalsze badania nad optymalizacją traktowania roślin zarówno w zakresie stężenia bakterii w zawieszynie, jak i sposobu i terminu wykonania zabiegu bakterii na rośliny.

## LITERATURA:

- [1] Castillo Carrillo C., Paltrinieri S., Bustamante J.B., Bertaccini A., 2018. Detection and molecular characterization of a 16SrI-F phytoplasma in potato showing purple top disease in Ecuador. *Australasian Plant Pathology*, 1–5.
- [2] Lee I.M., Gundersen-Rindal D.E., Davis R.E., Bartoszyk I.M., 1998. Revised classification scheme of phytoplasmas based on RFLP analyses of 16S rRNA and ribosomal protein gene sequences. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*, 48 (4), 1153–1169.

## Wykaz uczestników

Dr hab. Robert Czajkowski, MWB UG i GUMed, Gdańsk  
Dr hab. Sylwia Jafra, prof. nadzw., MWB UG i GUMed, Gdańsk  
Mgr Marta Jurga, UP Wrocław  
Dr Monika Kałużna, IO, Skierniewice  
Dr Joanna Kamasa, IOR Poznań  
Dr hab. Ewa Król, prof. nadzw., UP Lublin  
Dr hab. Renata Lebecka, prof. nadzw., IHAR, Oddz. Młochów  
Prof. dr hab. Jan Łabętowicz, SGGW, KNA PAN  
Prof. dr hab. Ewa Łojkowska, MWB UG i GUMed, Gdańsk  
Mgr inż. Marcelina Machura, UR im. Hugona Kołłątaja, Kraków  
Prof. dr hab. Małgorzata Mańka, UP Poznań, PAN  
Prof. dr hab. Stanisław Mazur, UR im. Hugona Kołłątaja, Kraków  
Mgr Joanna Micek, UR im. Hugona Kołłątaja, Kraków  
Dr Artur Mikiciński, IO, Skierniewice  
Mgr Agata Motyka, MWB UG i GUMed, Gdańsk  
Dr hab. inż. Jacek Nawrocki, UR im. Hugona Kołłątaja, Kraków  
Mgr inż. Anna Pogodzińska, UR im. Hugona Kołłątaja, Kraków  
Prof. dr hab. Katarzyna Niemirowicz, SGGW, Warszawa  
Dr Helena Olczak-Woltman, SGGW, Warszawa  
Dr Sebastian Przemieniecki, UWM, Olsztyn  
Dr Włodzimierz Przewodowski, IHAR, Oddz. Bonin  
Dr Agnieszka Przewodowska, IHAR, Oddz. Bonin  
Dr hab. Joanna Puławska, prof. nadzw., IO, Skierniewice  
Mgr inż. Katarzyna Salamońska, IHAR, Oddz. Bonin  
Mgr inż. Dorota Sarek, IHAR, Oddz. Bonin  
Dr hab. Małgorzata Schollenberger, prof. nadzw., SGGW, Warszawa  
Mgr Renata Słomnicka, SGGW, Warszawa  
Prof. dr hab. Piotr Sobiczewski, IO, Skierniewice  
Dr Wojciech Śledź, MWB UG i GUMed, Gdańsk  
Dr hab. Urszula Wachowska, UWM, Olsztyn  
Dr hab. Krzysztof Waleron, GUMed, Gdańsk  
Dr hab. Małgorzata Waleron, MWB UG i GUMed, Gdańsk  
Dr hab. Ewa Zalewska, prof. nadzw., UP, Lublin  
Prof. dr hab. Ewa Zimnoch Guzowska, IHAR, Oddz. Młochów  
Dr hab. Beata Zimowska, UP, Lublin  
Mgr Agnieszka Zwolińska, IOR, Poznań

