



## ZIEMNIAK – BAKTERIE PEKTYNOLITYCZNE, CO NOWEGO? Sprawozdanie z 3. spotkania ERA-NET EUPHRESKO

mgr Zofia Wójcik, dr hab. Renata Lebecka, prof. nadzw.  
IHAR-PIB, Oddział w Młochowie, ul. Platanowa 19, 05-831 Młochów  
e-mail: z.wojcik@ihar.edu.pl

### Streszczenie

W dniach 22-24 listopada 2015 r. odbyło się w Gdańsku spotkanie Euphresco III. Konferencja poświęcona była tematyce bakteryjnych patogenów roślin, głównie pektynolitycznych bakterii ziemniaka. Prezentacje dotyczyły interakcji roślina-patogen, epidemiologii, kontroli, diagnostyki oraz monitoringu bakterii pektynolitycznych. Swoje badania przedstawiło 23 uczestników z 9 krajów, nie tylko z Europy. Najwięcej wykładów wygłoszono w części dotyczącej epidemiologii i kontroli patogenów.

**Słowa kluczowe:** mokra zgnilizna ziemniaka, czarna nóżka ziemniaka, *Pectobacterium*, *Dickeya*

**B**akterie pektynolityczne powodują dwie choroby ziemniaka: czarną nóżkę i mokrą zgniliznę. Ochrona przed nimi polega głównie na używaniu do sadzenia zdrowych sadzeniaków, najważniejszym źródłem zakażenia są bowiem sadzeniaki porażone latentnie. W Holandii, która jest głównym eksporterem sadzeniaków ziemniaka, prowadzi się diagnostykę występowania porażenia latentnego bulw bakteriami pektynolitycznymi. Działanie to doprowadziło do zmniejszenia strat materialnych związanych z degradacją plantacji nasiennych ziemniaka czy odrzuceniem partii sadzeniaków. Do grupy bakterii najczęściej występujących w produkcji ziemniaków w Europie Zachodniej można zaliczyć: *Pectobacterium*

*atrosepticum* (Pba), *P. carotovorum* subsp. *carotovorum* (Pcc), *P. c.* subsp. *brasiliense* (Pcb), *P. wasabiae* (Pwa), *Dickeya dianthicola* (Ddth) i *D. solani* (Dsol). Ostatnio większego znaczenia w Holandii i Szwajcarii nabrała bakteria Pcb, która jest najczęściej izolowana z roślin ziemniaka z objawami porażenia. Coraz bardziej zaawansowane metody genetyczne stosowane w taksonomii bakterii wskazują na niedoskonałość używanych obecnie metod diagnostycznych.

I właśnie tym zagadnieniom było poświęcone 3. spotkanie europejskiej sieci ERA-NET EUPHRESKO (EUropean PHytosanitary REsearch COordination) Phytosanitary ERA-Net – *Dickeya* & *Pectobacterium*, sieci instytucji naukowych prowadzących badania nad pektynolitycznymi patogenami roślin z

rodzajów *Dickeya* i *Pectobacterium*, które odbyło się w dniach 22-24 listopada 2015 r. na Międzyuczelnianym Wydziale Biotechnologii Uniwersytetu Gdańskiego i Gdańskiego Uniwersytetu Medycznego (MWB UG i GU-Med). Organizatorami spotkania byli: prof. Ewa Łojkowska, dr Robert Czajkowski, dr Marta Potrykus, dr Wojciech Śledź, dr Małgorzata Waleron, Agata Motyka i Sabina Żołędowska.

Wykłady obejmowały cztery zagadnienia: interakcji między rośliną a patogenem, epidemiologii i ochrony, diagnostyki oraz innych badań. Katarzyna Macur z Zespołu Laboratoriów Specjalistycznych MWB UG i GUMed omówiła zastosowanie spektrometrii mas w badaniu drobnoustrojów, w badaniach taksonomicznych, proteomicznych i identyfikacji oddziaływań mikrobiologicznych.

Nicole Hugouvieux-Cotte-Pattat z INSA w Lyon we Francji przedstawiła metaboliczne fazy rozwoju bakterii *Dickeya dadantii* 3937 w liściach cykorii, przy wykorzystaniu spektroskopii  $^{13}\text{C}$ -NMR. Faza bezobjawowa trwała od 1 do 8 godzin i charakteryzowała się przyswajaniem przez bakterie niektórych łatwo rozpuszczalnych cukrów roślinnych oraz hamowaniem czynników wirulencji bakterii. Na etapie przejściowym obserwowano silne zmiany metaboliczne, w tym zapoczątkowanie produkcji liazy pektynowej, która degradowała polisacharydy ścian komórkowych, udostępniając bakteriom składniki odżywcze. Wtedy bakterie namnażają się i mamy do czynienia z fazą objawową, która następuje 12 do 24 godzin po infekcji.

Iris Yedidia z Instytutu Rolniczego w Volcani w Izraelu mówiła o wpływie roślinnych kwasów fenolowych na obniżenie czynników wirulencji, ruchliwości i tworzenia biofilmu, bakterii Pcc, Pcb, Pba i *P. aroidearum*. W celu zbadania mechanizmów leżących u podstawy tych procesów zbadano działanie kwasu cynamonowego oraz salicylowego w *P. aroidearum* i Pcb. Wyniki wykazały hamowanie ekspresji genów kodujących białka biorące udział w mechanizmie sygnalizatora zagęszczenia (ang. quorum-sensing, QS) istotnego w inicjowaniu interakcji roślina-patogen.

Frederique van Gijsegem z INRA-UPMC we Francji w swoim wystąpieniu porównała pełne sekwencje genomów *D. solani* i *D.*

*dianthicola* wyizolowanych z roślin ziemniaka pochodzących z Francji. Wykazała bardzo duże podobieństwo obu genomów, z wyjątkiem kilkuset genów występujących tylko w jednym z dwóch gatunków. Geny typowe dla gatunku Ddth skupione były w obszarze genomu z licznymi ruchomymi elementami. Większość z tych regionów genomowych zawiera geny kodujące białka biorące udział w metabolizmie/transporcie oraz geny kodujące czynniki regulatorowe.

Z porównania profili ekspresji genów po infekcji bulw wynika, że ekspresja kilku specyficznych dla gatunku genów jest modulowana in planta, a nie występuje w kulturach in vitro bakterii, co wskazuje na potrzebę badań ekspresji genów bakterii w interakcji z rośliną gospodarzem. Analiza 20 genomów bakterii Dsol wyizolowanych w różnych latach, z różnych gatunków roślin pochodzących z różnych rejonów geograficznych, pokazała zmienność pomiędzy izolatami (polimorfizm pojedynczych nukleotydów i poziomy transfer genów) i pozwoliła na wyróżnienie dwóch podgrup w obrębie gatunku Dsol, które różnią się między sobą.

Badania Minny Pirhonen z Uniwersytetu w Helsinkach wykazały, że nicienie mogą odgrywać rolę w przenoszeniu bakterii pektynolitycznych na niewielkie odległości w glebie, a muchówki ziemie z rodziny Trichocera biorą udział w rozprzestrzenianiu się bakterii w pomieszczeniach przechowalniczych, w których znajdują się bulwy z objawami mokrej zgnilizny.

Miia Pasanen, również z Uniwersytetu w Helsinkach, przedstawiła charakterystykę fenotypową i molekularną fińskiego izolatu Pcc pochodzącego z łodyg ziemniaka, na których występowały objawy czarnej nóżki.

Jacque van der Waals z Uniwersytetu w Pretorii w Afryce Południowej omówiła badania nad wpływem temperatury oraz wilgotności gleby na przeżywalność Pcb, jednego z najważniejszych patogenów w produkcji ziemniaków w Afryce Południowej. Potwierdziły one brak zdolności tych bakterii do przeżywania w glebie przez dłuższy czas w przypadku braku roślin gospodarzy. Stwierdzono także, że Pcb ma większą zdolność przetrwania w glebie mokrej przy wyższych temperaturach niż w glebach suchych lub w niższych temperaturach, na przykład 10°C.

Emma Campbell z Instytutu James Hutton w Szkocji zaprezentowała wyniki badań nad przenoszeniem się znakowanych bakterii Pba z roślin porażonych nimi na rośliny rosnące w pobliżu na polu doświadczalnym. Znakowane bakterie były wykrywane w roślinach rosnących w sąsiedztwie źródeł infekcji, a jednocześnie wykrywano w nich inne, nieznakowane bakterie pektynolityczne.

Brice Dupuis z Agroscope w Szwajcarii przedstawił badania nad wpływem porażenia sadzeniaków w warunkach laboratoryjnych przez bakterie z rodzaju *Dickeya* na wywoływanie objawów porażenia roślin ziemniaka w warunkach polowych oraz na porażenie bulw potomnych. Dwuletnie wyniki były bardziej zgodne dla oceny agresywności izolatów bakterii niż dla oceny wrażliwości odmian ziemniaka na te bakterie.

Robert Czajkowski z MWB UG i GUMed w Gdańsku omówił wyniki badań i perspektywy wykorzystania w walce biologicznej bakteriofagów z rodziny Myoviridae, wykazujących właściwości lityczne w stosunku do trzech gatunków bakterii: Pcc, Pwa i Dsol.

Valerie Helias z INRA we Francji przekazała wyniki badania odporności 24 mieszańców *Solanum*, z genetycznych zasobów ziemniaka INRA, na porażenie przez reprezentatywny zestaw izolatów bakterii pektynolitycznych. Spośród badanych materiałów 10 mieszańców charakteryzowało się niską wrażliwością na 2 do 5 gatunków/podgatunków tych bakterii.

Kees Kristelijm z HZPC, holenderskiej hodowli ziemniaka i producenta sadzeniaków, pokazał, że w partiach zdegradowanych sadzeniaków bakterie są przyczyną obniżenia stopnia kwalifikacji w 78% sadzeniaków, podczas gdy wirusy tylko w 7. Od 2005 do 2013 r. prowadzono w Holandii badania dotyczące bakteryjnych chorób ziemniaka. W 2009 r. zaczęto wykorzystywać wyniki uzyskane w trakcie badań, w formie porad dla hodowców i producentów sadzeniaków i testowania materiałów bazowych, co doprowadziło w ostatnich latach do zmniejszenia liczby zdegradowanych plantacji sadzeniaków czy odrzuconych partii sadzeniaków.

Sylwia Jafra z MWB UG i GUMed zaprezentowała prace nad szczepem bakterii z rodzaju *Pseudomonas* antagonistycznym w

stosunku do różnych gatunków bakterii rodzaju *Pectobacterium* i *Dickeya*. Mają one na celu znalezienie genów warunkujących biosyntezę czynników warunkujących działanie antagonistyczne.

Jan van der Wolf z Plant Research International w Holandii przedstawił wyniki dwuletnich badań polowych wirulencji różnych izolatów bakterii pektynolitycznych z gatunków Pba, Pcb, Pwa, Dsol po zakażeniu sadzeniaków. Najwyższy wskaźnik objawów zakażenia uzyskano po inokulacji ziemniaków bakteriami Pba i Pcb (odpowiednio 75 i 95% roślin). Po zakażeniu izolatami Dsol i Pwa otrzymano 5 i 25% roślin z objawami chorobowymi. W infekcjach mieszanych, Pcb + Ds, otrzymano tyle samo zakażeń co w przypadku użycia pojedynczego izolatu Pcb. Natomiast w przypadku zakażenia sadzeniaków mieszaniną Pcb + Pwa odnotowano niższy wskaźnik porażenia niż po zakażeniu sadzeniaków pojedynczym izolatem Pcb.

Sonia Humphris z Instytutu James Hutton w Szkocji przedstawiła nową metodę klasyfikacji taksonomicznej bakterii pektynolitycznych, polegającą na porównaniu całych genomów i określeniu ich podobieństwa – „Average Nucleotide Identity”. Tą metodą w rodzaju *Pectobacterium* wyróżniono 11 gatunków, w rodzaju *Dickeya* – 8. Zwrócono uwagę na niespójność pomiędzy wynikami otrzymanymi po stosowaniu dotychczasowych metod diagnostycznych i metody opartej na porównaniu sekwencji całych genomów.

Andreas Keiser z Uniwersytetu Bern w Szwajcarii omówił badania nad latentnymi infekcjami sadzeniaków i poszukiwaniem związku pomiędzy porażeniem sadzeniaków a wystąpieniem objawów choroby roślin w polu. Testowano sadzeniaki pod względem występowania bakterii o największym znaczeniu w produkcji ziemniaków w Szwajcarii: Pba, Pwa, Pcb i *Dickeya* spp. Od roku 2012 obserwuje się malejącą tendencję do porażenia przez Dsol i Pba. Bakterie te nie zostały wykryte w 2015 r. w sadzeniakach, natomiast od 2013 r. znaczenia nabrały bakterie Pcb. Podkreślono problem z wykrywaniem i identyfikacją Pcb, tj. występowaniem fałszywych pozytywnych wyników.

Lea Tsror z Gilat Research Center w Izraelu przedstawiła sytuację nasiennictwa

ziemniaka w swoim kraju. W Izraelu ziemniaki uprawia się dwa razy w roku. Sadzeniaki są importowane z Europy na wiosnę każdego roku, a w sezonie jesienno-zimowym plantatorzy używają własnego materiału. Porażenie latentne, głównie ciepłolubnymi bakteriami Dsol, Pcc, Pcb i Pwa, prowadzi do przedwczesnego gnicia bulw, czarnej nóżki i więdnienia roślin. Importowane sadzeniaki są badane pod kątem porażenia latentnego przez *Dickeya* spp. i *Pectobacterium* spp.

Ivette Acuña z INIA w Chile przedstawiła produkcję ziemniaków w swoim kraju. W Chile ziemniaki są uprawiane na powierzchni ok. 52 tys. ha przez ok. 60 tys. rolników, 50% upraw jest zlokalizowanych na południu kraju. Głównym problemem w uprawie jest *Phytophthora infestans*, powodująca zarazę ziemniaka, wirus Y oraz choroby bakteryjne. Głównym sprawcą chorób bakteryjnych są bakterie Pcc (64,8%) oraz Pba (13,5%).

Miriam Kooman z NAK w Holandii omówiła różne metody badania agresywności izolatów bakterii Pcb, Pba i Dsol w badaniach polowych. Sprawcami chorób powodowanych przez bakterie pektynolityczne w ostatnim sezonie były: Pcb – 66,7%, *Dickeya* spp. – 21,2% (z tego Dsol. 94%), Pwa – 6,4%, Pba – 5,8%.

Gerry Sadler z SASA w Szkocji, omawiając choroby bakteryjne ziemniaka występujące w swoim kraju, podkreślił wzrost występowania czarnej nóżki – w 2011 r. aż 10% plantacji nasiennych zostało zdegradowanych (zwykle degradacja dotyczyła 1-2%). Z roślin z objawami choroby najczęściej izolowano bakterie Pba (90%), pozostałe 5% to Pcc. W celu znalezienia przyczyn wzrostu występowania chorób bakteryjnych przeprowadzono ankietę wśród producentów sadzeniaków, której wyniki pomogą w opracowaniu sposobu ochrony przed tymi chorobami.

Yeshitila Degefu z LUKE w Finlandii przedstawił sytuację dotyczącą występowania bakterii pektynolitycznych w produkcji ziemniaków w Finlandii. Z roślin z objawami choroby często izolowane są bakterie Pba, Pcb, Pcc, Pwa i Dsol.

Renata Lebecka z oddziału IHAR-PIB w Młochowie przekazała wybrane wyniki z realizowanego wspólnie z MWB UG i GUMed oraz NIBIO w Norwegii polsko-norweskiego projektu POTPAT, dotyczące m.in. populacji

bakterii pektynolitycznych w Polsce i Norwegii w 2013 r. W Polsce przeważały Pwa, Pba, następnie Pcc oraz sporadycznie Dsol, w Norwegii – Pcc i Pba. Bakterie były badane pod względem agresywności w bulwach ziemniaka, produkcji celulaz, pektynaz, proteaz, sideroforów oraz ruchliwości i wzrostu w obecności soli w wysokim stężeniu. Zaobserwowano różnice w agresywności bakterii wyizolowanych w Polsce i Norwegii. Średnio bakterie z Norwegii były bardziej agresywne. Czasami pojedyncze izolaty pochodzące z Polski charakteryzowały się również wysoką agresywnością. Polskie i norweskie szczepy bakterii nie różniły się istotnie pod względem pozostałych cech fenotypowych analizowanych w doświadczeniu. Zauważono różnicę w produkcji proteaz, a szczególnie sideroforów, oraz ruchliwości pomiędzy badanymi szczepami bakterii. Tylko trzy z przebadanych szczepów *Pectobacterium* produkowały proteazy.

Marta Potrykus z MWB UG i GUMed przedstawiła wyniki badań dotyczących różnorodności gatunków *Dickeya* izolowanych z roślin ziemniaka i wody (ze zbiorników w pobliżu pól ziemniaczanych, miejsc przetwórstwa ziemniaków i ścieków) w Polsce. Z roślin ziemniaka wyizolowano bakterie z gatunków Ddth i Dsol, relatywnie homogeną grupę bakterii, natomiast z wody bakterie z gatunków *D. zea* i *D. chrysanthemi*, znacznie bardziej zróżnicowane genetycznie.

W Polsce w uprawach ziemniaka najczęściej występują Pcc, Pba, Pwa i sporadycznie Dsol. Bakterie te mogą powodować duże straty w czasie przechowywania bulw w podwyższonej temperaturze, przy dużej wilgotności i słabej wentylacji. Czarna nóżka i więdnienie roślin występuje po posadzeniu porażonych latentnie sadzeniaków przy pogodzie sprzyjającej namnażaniu bakterii, tj. wysokiej wilgotności gleby.

Badania w ramach sieci EUPHRESKO przyczyniają się do lepszego zrozumienia znaczenia różnych gatunków bakterii pektynolitycznych, ich wykrywania i identyfikacji, wirulencji i agresywności w stosunku do ziemniaka. Wyniki zostaną wykorzystane w produkcji ziemniaków, głównie sadzeniaków.