

LABORATORYJNA OCENA AGRESYWNOŚCI BAKTERII PEKTYNOLITYCZNYCH IZOLOWANYCH Z ŁODYG I BULW ZIEMNIAKA WYKAZUJĄCYCH OBJAWY CHOROBY

LABORATORY ASSESSMENT OF AGGRESSIVENESS OF PECTINOLYTIC BACTERIA ISOLATED FROM STEMS AND POTATO TUBERS SHOWING DISEASE SYMPTOMS

dr hab. Renata Lebecka, prof. IHAR-PIB, mgr Krystyna Michalak
IHAR-PIB Oddział w Młochowie, e-mail: r.lebecka@ihar.edu.pl

Streszczenie

W oddziale IHAR-PIB w Młochowie prowadzona jest kolekcja bakterii pektynolitycznych wywołujących dwie choroby ziemniaka: czarną nóżkę i mokrą zgniliznę bulw. Izolaty bakterii o najwyższej agresywności wykorzystywane są w celach edukacyjnych, w naukowych badaniach genetycznych i pracach hodowlanych do oceny poziomu odporności na bakterie rodów hodowlanych i odmian ziemniaka. W latach 2013-2020 z różnych odmian ziemniaka wyizolowano i zidentyfikowano 24 izolaty należące do 4 różnych gatunków bakterii: 10 izolatów reprezentowało *Pectobacterium carotovorum*, 8 – *P. brasiliense* sp. nov., 3 – *P. atrosepticum* i 3 – *P. parmentieri*. Najwyższą agresywnością w temperaturze 30°C charakteryzowały się izolaty *P. brasiliense* i wzorcowy szczep *Dickeya solani*.

Słowa kluczowe: agresywność bakterii, mokra zgnilizna bulw ziemniaka

Abstract

A collection of pectinolytic bacteria causing two potato diseases, blackleg and tuber soft rot is carried at the Plant Breeding and Acclimatization Institute – National Research Institute (IHAR-PIB) in Młochów. Bacterial isolates with the highest aggressiveness are used for educational purposes, in scientific genetic research and breeding work to assess the level of resistance to bacteria in breeding lines and potato varieties. In the years 2013-2020, 24 isolates belonging to 4 different species were identified: 10 isolates of *Pectobacterium carotovorum*, 8 – *P. brasiliense* sp. nov., 3 – *P. atrosepticum* i 3 – *P. parmentieri*. The isolates of *P. brasiliense* and the model strain of *D. solani* were characterized by the highest aggressiveness at 30°C.

Keywords: aggressiveness of bacteria, soft rot of potato tubers

W ramach wieloletniego programu „Tworzenie naukowych podstaw postępu biologicznego i ochrona roślinnych zasobów genowych źródłem in-

nowacji i wsparcia zrównoważonego rolnictwa i bezpieczeństwa żywnościowego kraju”, prowadzonego w latach 2015-2020 a finansowanego przez Ministerstwo Rolnictwa i

Rozwoju Wsi, realizowano zadanie pt. „Analiza zmian w populacjach ważniejszych patogenów ziemniaka dla potrzeb prowadzenia hodowli odpornościowej oraz produkcji”.

Bakterie pektynolityczne, należące do różnych gatunków, charakteryzują się zdolnością do wytwarzania wielu enzymów, które prowadzą do uszkodzenia ścian komórkowych i maceracji tkanki łądyg i bulw ziemniaka. Bakterie tej grupy powodują dwie choroby ziemniaka: czarną nóżkę i mokrą zgniliznę bulw. Gatunki bakterii pektynolitycznych występujących w Polsce, ich szkodliwość oraz rozwój wywoływanych przez nie chorób opisali Lebecka i Michalak (2017) oraz Lebecka i Czarniak (2019). W ostatnim czasie nastąpiły zmiany w systematyce bakterii. Portier i inni (2019) zaproponowali wyniesienie podgatunku *P. carotovorum* subsp. *brasiliense* do rangi gatunku *P. brasiliense* sp. nov. Zmiany w populacji bakterii pektynolitycznych są dynamiczne, w Europie Zachodniej w uprawie ziemniaka rozprzestrze-

niał się początkowo gatunek bakterii *Dickeya solani*, a obecnie *P. brasiliense* (van der Wolf i in. 2014, 2017). W Polsce bakterie *D. solani* są wykrywane od 2005 r., a *P. brasiliense*, zidentyfikowane przez Waleron i innych (2015), występowały co najmniej od 1996 r., z tym że wówczas oznaczano je jako *P. carotovorum*.

Głównym celem prac prowadzonych w ramach realizowanego zadania był zbiór, identyfikacja, przechowywanie izolatów bakterii pektynolitycznych, ocena agresywności izolatów do testowania odporności ziemniaka, materiałów hodowlanych i odmian uprawianych w Polsce oraz nieodpłatne udostępnianie bakterii do badań i w celach dydaktycznych.

Materiały i metody

Izolaty bakterii zebrane w latach 2013-2020 w Polsce i trzy szczepy wzorcowe użyte w badaniach przedstawiono w tabeli 1.

Tabela 1

Izolaty użyte w badaniach agresywności, ich pochodzenie i metody identyfikacji

Gatunek	Izolat/ szczep	Rok izolacji	Pochodzenie bakterii, nazwa odmiany/genotypu ziemniaka	Metoda identyfikacji
<i>Pectobacterium atrosepticum</i>	Pba1M14	2014	Gandawa	<i>MDH2, icdA, dnaX*</i>
	Pba2M14	2014	Oberon	PCR de Boer i in. 2012
	Pba3M14	2014	Bard	PCR de Boer i in. 2012
<i>Pectobacterium brasiliense</i> sp. nov.	Pcb1M16	2016	Denar	<i>icdA, dnaX</i>
	Pcb2M16	2016	Bellarosa	<i>icdA, dnaX</i>
	Pcb3M16	2016	Syrena	<i>MDH2, icdA, dnaX</i>
	Pcb4M16	2016	Tacoma	<i>MDH2, icdA, dnaX</i>
	Pcb5M16	2016	Tacoma	<i>icdA, dnaX</i>
	Pcb6M17	2017	Caprice	<i>icdA, dnaX</i>
	Pcb7M17	2017	Bellarosa	<i>MDH2, icdA, dnaX</i>
	Pcb8M17	2017	Gwiazda	<i>icdA, dnaX</i>
<i>Pectobacterium carotovorum</i>	Pcc1M13	2013	Ewelina	<i>MDH2, icdA, dnaX*</i>
	Pcc2M15	2015	Lady Claire	PCR Kang i in. 2003
	Pcc3M15	2015	Lady Claire	PCR Kang i in. 2003
	Pcc4M16	2016	2x 12-3/37A	PCR Kang i in. 2003
	Pcc5M16	2016	2x 12-3/37B	PCR Kang i in. 2003
	Pcc6M17	2017	Estrella	<i>icdA, dnaX</i>
	Pcc7M17	2017	Damaris	<i>MDH2, icdA, dnaX</i>
	Pcc8M20	2020	Ismena	<i>MDH2, icdA, dnaX</i>
	Pcc10M20	2020	Tacja	<i>MDH2, icdA, dnaX</i>
	Pcc11M20	2020	Longina	<i>MDH2, icdA, dnaX</i>
NCPPB 3427	Narodowa Kolekcja Bakterii Patogenicznych Roślin (ang. The National Collection of Plant Pathogenic Bacteria), Wielka Brytania			

<i>Pectobacterium parmentieri</i>	Ppa1M13	2013	Denar	<i>MDH2, icdA, dnaX*</i>
	Ppa3M15	2015	Bellarosa	PCR Kang i in. 2003, Kim i in. 2012
	Ppa3M18	2018	Catania	<i>MDH2, icdA, dnaX</i>
<i>Dickeya solani</i>	NCPBP 4479	Narodowa Kolekcja Bakterii Patogenicznych Roślin (ang. The National Collection of Plant Pathogenic Bacteria), Wielka Brytania		
	IFB0099 syn. IPO2276	Kolekcja Międzyuczelnianego Wydziału Biotechnologii UG i GUMed, Gdańsk (Golanowska i in. 2015)		

*izolaty identyfikowane w projekcie POTPAT (Dees i in. 2017)

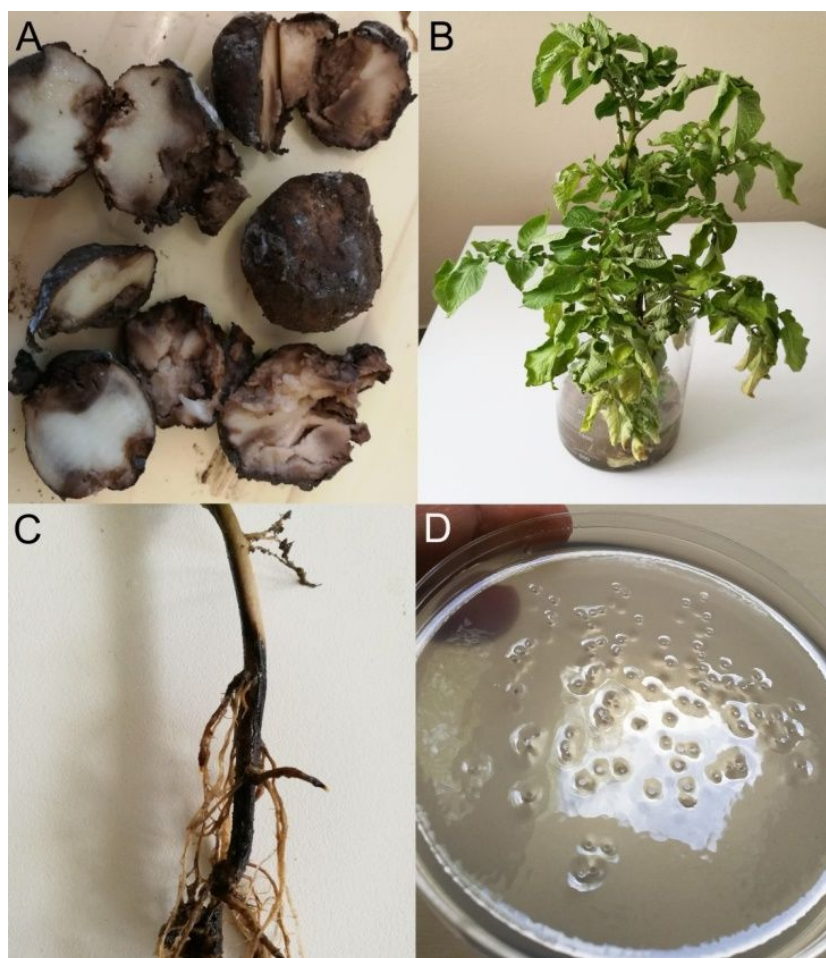
Metody

Izolacja i identyfikacja bakterii

Bakterie izolowano z łodyg ziemniaka z objawami czarnej nóżki lub z bulw z objawami gnicia i hodowano na pożywce selektywnej MBCVP zawierającej w swoim składzie pektyny (Lebecka 2017) – fot. 1. Bakterie wytwarzają enzymy rozkładające pektyny i tworzą w pożywce charakterystyczne dołki. Pozyskane bakterie z dołków rozcieńczano i wysiewano na płytkach z pożywką LB, po czym bakterie z pojedynczych kolonii przenoszono ponownie na pożywkę MBCVP, w celu potwierdzenia ich aktywności pektynolitycznej.

Bakterie identyfikowano metodami molekularnymi. Stosowano testy wykorzystujące reakcję łańcuchową polimerazy (PCR, ang. polymerase chain reaction) PCR lub/i sekwencjonowanie genów metabolizmu podstawowego. W metodzie PCR zastosowano różne startery namnażające fragmenty DNA o odpowiedniej wielkości specyficznie dla danego gatunku lub grupy gatunków

(Lebecka 2017) – tabela 1. Do sekwencjonowania wykorzystano co najmniej dwa z trzech genów: dehydrogenazy jabłczanowej (*MDH2*), dehydrogenazy izocytrynianowej (*icdA*) i podjednostki tau polimerazy III (*dnaX*) (Dees i in. 2017). Przynależność do danego gatunku opierano na porównaniach z sekwencjami szczepów referencyjnych znajdujących się w bazie NCBI (ang. National Center for Biotechnology Information).



Fot. 1. Roślina ziemniaka z objawami porażenia przez bakterie pektynolityczne

A – gnicie bulw, B – więdnienie części nadziemnych, C – czarna nóżka u podstawy łodygi, D – charakterystyczne dołki na pożywce selektywnej z pektynami utworzone przez bakterie wyizolowane z łodyg ziemniaka z objawami porażenia (fot. R. Lebecka)

Ocena agresywności bakterii

Agresywność 27 izolatów oceniono według metody punktowej inokulacji bulw (Lebecka, Michalak 2017). Do testów wykorzystano bulwy podatnej na bakterie odmiany Irys. W punkcie zranienia bulwy wprowadzono osobno zawiesinę każdego z testowanych izolatów bakterii o określonej koncentracji (10^8 jednostek tworzących kolonie w 1 ml), po czym otwór zamykano wazeliną. Następnie bulwy umieszczone w pojemnikach spryskiwano wodą, a pojemniki zamykano i przechowywano w stałej temperaturze 26 i 30°C przez 3 dni.

W każdej temperaturze testowano od 6 do 22 bulw traktowanych jednym z 27 izolatów, z których każdy był oceniany co najmniej w dwóch latach badań. Po trzech dniach inkubacji bulwy krojono wzdłuż miejsca zranienia, ważono przed usunięciem i po usunięciu zgniłej tkanki (fot. 2). Miarą agresywności testowanych izolatów była średnia masa zgniłej tkanki z badanych bulw.

W celu opracowania i interpretacji wyników przeprowadzono dwuczynnikową analizę wariacji z wykorzystaniem programu Statistica (wersja 13.3; Tibco Inc. 2017).

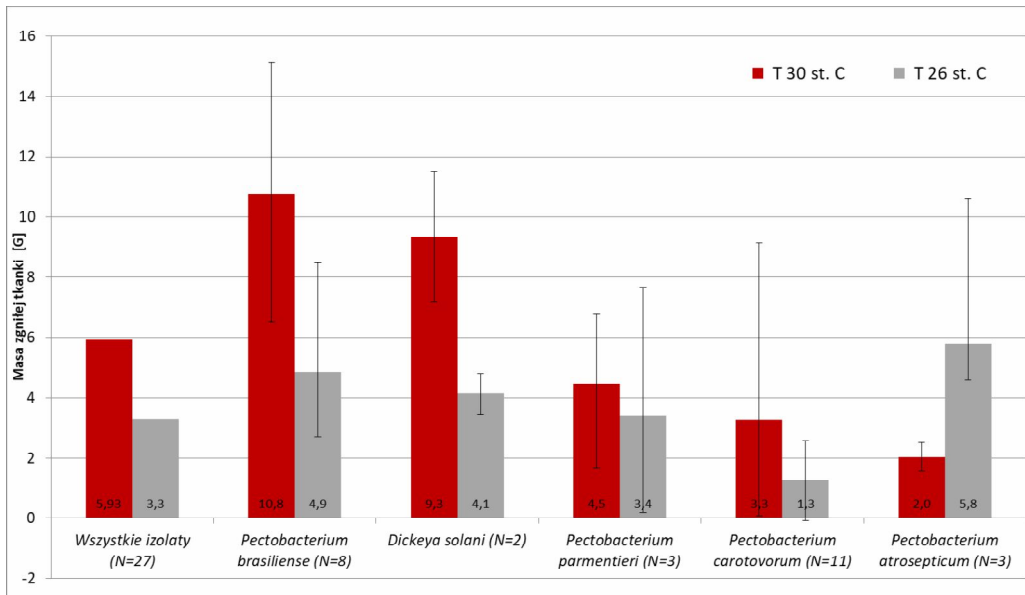
Wyniki

Analiza wariacji wykazała istotny wpływ gatunku bakterii ($P < 0,001$), temperatury ($P < 0,001$) i ich interakcji ($P < 0,001$) na badaną cechę. Średnio agresywność izolatów w temperaturze 30°C, mierzona masą zgniłej tkanki bulw, wynosiła 5,9 g i była istotnie wyższa od średniego porażenia bulw w temperaturze 26°C równego 3,3 g ($P < 0,001$). Średnio zdolność do maceracji tkanki bulw była większa dla izolatów *P. brasiliense* i *D. solani* niż izolatów *P. parmentieri*, *P. carotovorum* i *P. atrosepticum* w temperaturze 30°C, natomiast w temperaturze 26°C średnia izolatów *P. carotovorum* różniła się istotnie ($P < 0,001$) od średnich dla pozostałych gatunków (rys. 1).

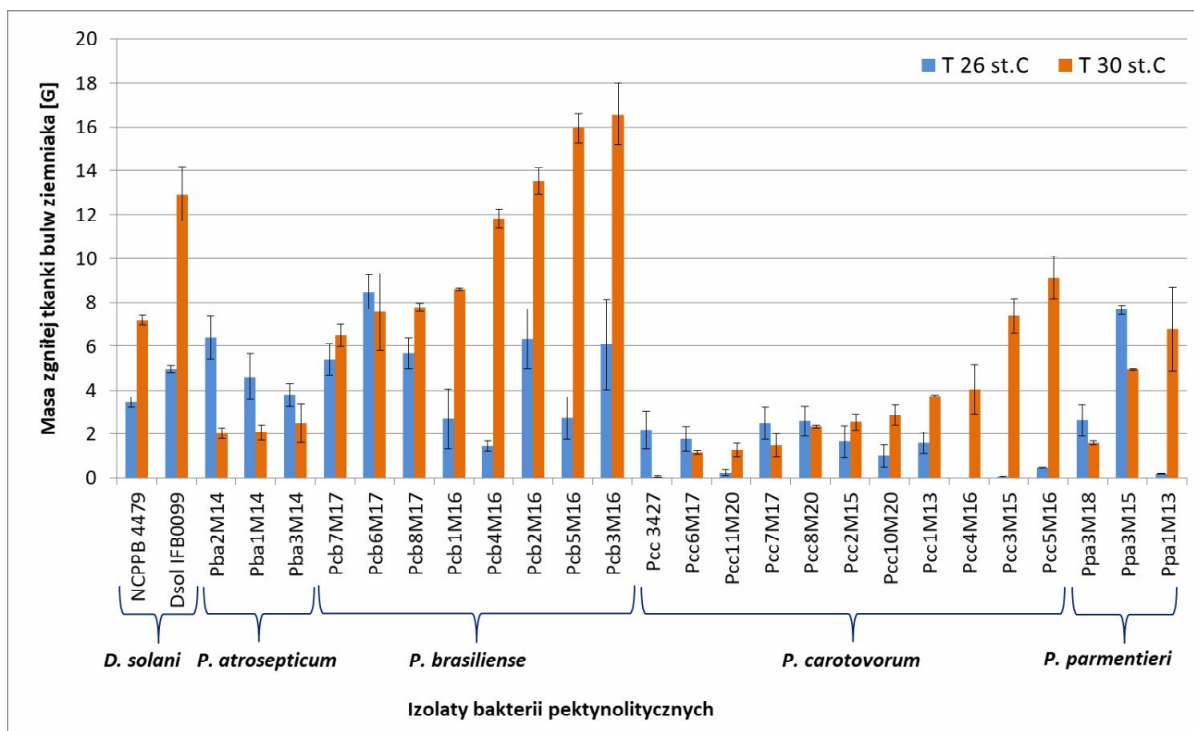
Ze względu na istotne zróżnicowanie agresywności izolatów bakterii wewnątrz gatunku przeprowadzono analizę wariacji, która wykazała istotny wpływ izolatu ($P < 0,001$), temperatury ($P < 0,001$) i ich interakcji ($P < 0,001$) na wielkość badanej cechy. Zmienność pomiędzy izolatami wyjaśniała 43% zmienności całkowitej, interakcja izolatu i temperatury 29,7%, a temperatura – 9,7%. Wyniki dla poszczególnych izolatów przedstawiono na rysunku 2. Dwa izolaty należące do *P. carotovorum* (Pcc3M15 i Pcc4M16) nie spowodowały gnicia bulw w temperaturze 26°C. Zakres średnich porażenia bulw przez izolaty w niższej temperaturze wynosił od 0,2 do 8,5 g, w wyższej temperaturze od 0,1 do 16,6 g.



Fot. 2. Efekt agresywności szczepu Pcb4M16 na bulwach ziemniaka odmiany Irys po usunięciu zgniłej tkanki po 3 dniach inkubacji w temperaturze 26°C (trzy bulwy przecięte na pół u góry) i 30°C (trzy bulwy przecięte na pół na dole) (fot. R. Lebecka)



Rys. 1. Średnia agresywność bakterii pektynolitycznych wobec bulw ziemniaka podatnej odmiany Irys. W nawiasach podano liczbę testowanych izolatów bakterii, wąsy pokazują zakres średnich dla izolatów wewnątrz gatunku



Rys. 2. Średnia agresywność izolatów bakterii pektynolitycznych wobec bulw ziemniaka podatnej odmiany Irys oceniana w temperaturach 26 i 30°C. Wąsy pokazują błąd standardowy dla danego izolatu

Dyskusja

Bakterie pektynolityczne patogeniczne dla ziemniaka to różne gatunki dominujące zależnie od czasu i obszaru, na którym występują. W Polsce czołowym zespołem prowadzącym monitorowanie i charakterystykę bakterii pektynolitycznych jest zespół naukowców z Międzyuczelnianego Wydziału

Biotechnologii UG i GUMed w Gdańsku. Natomiast w Zakładzie Genetyki i Materiałów Wyjściowych Ziemniaka IHAR-PIB w Młochowie od 25 lat utrzymywana jest doświadczalna kolekcja bakterii pektynolitycznych izolowanych w sposób ciągły. Najbardziej agresywne izolaty bakterii są używane do selekcji materiałów hodowlanych ziemniaka,

do oceny poziomu odporności uprawianych odmian oraz do badań genetycznych nad źródłami wysokiej odporności na te bakterie.

Z biegiem czasu udoskonalono metody identyfikacji bakterii. Dzięki rozwojowi techniki sekwencjonowania można z dużą pewnością wyodrębnić/określić gatunek bakterii. W związku z tym zmieniła się systematyka wielu gatunków i podgatunków omawianych bakterii. Najbardziej agresywnymi izolatami w tym badaniu były bakterie należące do gatunku *P. brasiliense* sp. nov. Występowały one w Polsce co najmniej od 1996 r., ale wcześniej były identyfikowane jako *P. carotovorum* subsp. *carotovorum*, następnie *P. carotovorum* subsp. *brasiliense* (Waleron i in. 2015).

Kolejnym nowo oznaczonym gatunkiem jest *P. parmentieri*, o wcześniejszej nazwie *Erwinia carotovora* subsp. *carotovora*, potem *P. carotovorum*, a następnie *P. wasabiae* (Zoledowska i in. 2018). W latach 2013 i 2014 gatunek ten stanowił odpowiednio 16 i 13% analizowanych prób, pochodzących z plantacji nasiennych ziemniaka (Zoledowska i in. 2018). W badaniach Zoledowskiej i innych (2018) bakterie *P. parmentieri* charakteryzowały się niższą agresywnością od szczepu *D. solani* IFB0099 (inkubowane w 28°C), co potwierdziły badania własne. Bakterie *D. solani* (uprzednio *Erwinia chrysanthemi*) wyizolowano po raz pierwszy w Polsce w 2005 r. (Sławiak i in. 2009). Stanowią one grupę izolatów o wysokiej genetycznej jednorodności. Charakteryzują się wysoką agresywnością, opisywaną w wielu pracach (za Dees i in. 2017). Właściwości te potwierdziły też przeprowadzone badania własne.

Obserwowano wewnątrzgatunkową zmienność izolatów, w grupach licznie reprezentowanych, *P. brasiliense* i *P. carotovorum*, pod względem agresywności, co potwierdzają wcześniejsze prace (za Dees i in. 2017).

Średnio agresywność badanych izolatów idzie w parze z optymalną temperaturą wzrostu bakterii. Dla *P. atrosepticum* i *P. carotovorum* optymalna temperatura wynosi odpowiednio 24-27 i 28-30°C, a dla bakterii z rodzaju *Dickeya* – 34-37°C (Pérombelon, Kelman 1980). Optymalna temperatura wzrostu bakterii *D. solani* szczepu IFB0099 na pożywce pełnej płynnej LB wynosi 33-35°C (Lebecka i in. 2020). Generalnie

większość gatunków, z wyjątkiem *P. atrosepticum*, rozmnaża się szybciej i powoduje silniejsze objawy chorobowe w wyższych temperaturach niż w niższych.

Podsumowanie i wnioski

W wyniku realizacji tematu w ramach Programu Wieloletniego w latach 2015-2020:

1. do kolekcji bakterii patogenicznych ziemniaka włączono 24 izolaty należące do czterech różnych gatunków: *Pectobacterium carotovorum*, *P. brasiliense* sp. nov., *P. atrosepticum* i *P. parmentieri*;

2. wyróżniono dwa izolaty *P. brasiliense* – Pcb3M16, Pcb2M16 – i jeden izolat *D. solani* (IFB0099) o najwyższej agresywności w stosunku do bulw ziemniaka w obu temperaturach (26 i 30°C);

3. w obrębie gatunku *P. atrosepticum* wyróżniono jeden izolat Pba2M14 o najwyższej agresywności w temperaturze 26°C;

4. udostępniono nieodpłatnie 30 izolatów bakterii pektynolitycznych z kolekcji oddziału IHAR-PIB w Młochowie, w celach dydaktycznych i do badań naukowych, do uczelni wyższych i instytutów naukowych (SGGW w Warszawie, ZUT w Szczecinie, ISRiL-PAN w Poznaniu, czterem oddziałom IHAR-PIB).

Literatura

- Boer de S. H., Li X., Ward L. J. 2012. *Pectobacterium* spp. Associated with bacterial stem rot syndrome of potato in Canada. – *Phytopathol.* 102: 937-947;
2. 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. – *Eur. J. Plant Pathol.* 148: 839-851;
3. Golanowska M., Galardini M., Bazzicalupo M., Hugouvieux-Cotte-Pattat N., Mengoni A., Potrykus M., Sławiak M., Lojkowska E. 2015. Draft genome sequence of a highly virulent strain of the plant pathogen *Dickeya solani*, IFB0099. – *Genome Announc.* 3(2):e00109-15. doi:10.1128/genomeA.00109-15;
4. Kang H. W., Kwon S.W., Go S. J. 2003. PCR-based specific and sensitive detection of *Pectobacterium carotovorum* ssp. *carotovorum* by primers generated from a URP-PCR fingerprinting-derived polymorphic band. – *Plant Pathol.* 52: 127-133;
5. Kim M. H., Cho M. S., Kim B. K., Choi H. J., Hahn J. H., Kim C., Kang M. J., Kim S. H., Park D. S. 2012. Quantitative real-time polymerase chain reaction assay for detection of *Pectobacte-*

rium wasabiae using YD repeat protein gene-based primers. – Plant Dis. 96: 253-257; **6. Lebecka R. 2017.** Isolation, identification and preservation of pectinolytic bacteria pathogenic to potato. – Plant Breed. Seed Sci. 75: 87-96; **7. Lebecka R., Czarniak Z. 2019.** Laboratorijna ocena porażenia bulw odmian ziemniaka przez wysoko agresywne szczepy bakterii *Dickeya solani* i *Pectobacterium carotovorum* subsp. *brasiliense*. – Ziemn. Pol. 1: 22-27; **8. Lebecka R., Michalak K. 2017.** Reakcja bulw wybranych odmian ziemniaka na porażenie przez wysokowirulentny szczep bakterii *Dickeya solani*. – Ziemn. Pol. 3: 18-23; **9. Lebecka R., Wasilewicz-Flis I., Mańkowski D. 2020.** Diploid potato germplasm with resistance to *Dickeya solani* – Potato Res. (accepted); **10. Pérombelon M. C. M., Kelman A. 1980.** Ecology of the soft rot erwinias. – Ann. Rev. Phytopathol. 18: 361-387; **11. Portier P., Pédrón J., Taghouti G., Fischer-Le Saux M., Caullireau E., Bertrand C. i in. 2019.** Elevation of *Pectobacterium carotovorum* subsp. *odoriferum* to species level as *Pectobacterium odoriferum* sp. nov., proposal of *Pectobacterium brasiliense* sp. nov. and *Pectobacterium actinidiae* sp. nov., emended description of *Pectobacterium carotovorum* and description of *Pectobacterium versatile* sp. nov., isolated from streams and symptoms on diverse plants. – Int. J. Syst. Evol. Microbiol. 69: 3207-3216; **12. Sławiak M., Lojkowska E., Wolf J. M. van der 2009.** First report of bacterial soft rot on potato caused by *Dickeya* sp. (syn. *Erwinia chrysanthemi*) in Poland. – Plant Pathol. 58: 794; **13. 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: 1271; **14. Wolf J. M. van der, Nijhuis E. H., Kowalewska M. J., Saddler G. S., Parkinson N., Elphinstone J. G., Pritchard L., Toth I.K., Lojkowska E., Potrykus M., Waleron M., Vos P. de, Cleenwerck I., Pirhonen M., Garland L., Hélias V., Pothier J. F., Pflüger V., Duffy B., Tsror L., Manulis S. 2014.** *Dickeya solani* sp. nov., a pectinolytic plant-pathogenic bacterium isolated from potato (*Solanum tuberosum*) – Int. J. Syst. Evol. Microbiol. 64: 768-774; **15. Wolf J. M. van der, Haan E. G. de, Kastelein P., Krijger M., Haas B. H. de, Velvis H., Mendes O., Kooman-Gersmann M., Zouwen P. S. van der 2017.** Virulence of *Pectobacterium carotovorum* subsp. *brasiliense* on potato compared with that of other *Pectobacterium* and *Dickeya* species under climatic conditions prevailing in the Netherlands. – Plant Pathol. 66: 571-583; **16. Zoledowska S., Motyka A., Zukowska D., Sledz W., Lojkowska E. 2018.** Population Structure and Biodiversity of *Pectobacterium parmentieri* Isolated from Potato Fields in Temperate Climate. – Plant Dis. 1: 154-164



Praca finansowana przez Ministerstwo Rolnictwa i Rozwoju Wsi w ramach Programu Wieloletniego (2015-2020) Zadanie 3.1.