

STRESZCZENIE ROZPRAWY DOKTORSKIEJ

Nowe plazmidy *Erwinia amylovora* – sprawcy zarazy ogniowej

Emadeldeen Alimaher Mohamed Ismail

Pracownia Fitopatologii Sadowniczej, Zakład Ochrony Roślin Sadowniczych,

Instytutu Ogrodnictwa, Skierniewice 2015

Promotor: dr hab. Joanna Puławska, profesor IO

Recenzenci: prof. dr hab. Wanda Małek (UMCS, Lublin)

dr hab. Krzysztof Waleron (GUMed, Gdańsk)

Wprowadzenie

Bakteria *Erwinia amylovora* jest patogenem ponad 130 gatunków roślin, zaliczanych do 40 rodzajów, głównie z rodziny *Rosaceae* (Van der Zwet and Keil 1979). W Polsce, poza gruszą (*Pyrus*), jabłonią (*Malus*) i pigwą (*Cydonia*) chorobę stwierdzono dotychczas na głogu (*Crataegus*), jarząbie (*Sorbus*), irdze (*Cotoneaster*), świdośliwie (*Amelanchier*) oraz ogniku (*Pyracantha*). Objawy zarazy ogniowej mogą być obserwowane na wszystkich nadziemnych organach roślin. Najważniejsze z nich to: więdnienie i zamieranie kwiatów, pędów, liści i owoców, nekrozy i zgorzele gałęzi i pnia, które mogą doprowadzić do zamierania całego drzewa. W okresie wegetacji, szczególnie w temperaturze powyżej 20°C i wysokiej wilgotności otoczenia, porażonym częściom roślin może towarzyszyć wyciek bakteryjny. W takich warunkach rozwój choroby następuje bardzo szybko.

Generalnie uważa się, że *E. amylovora* jest gatunkiem jednorodnym i nie wykazuje specjalizacji patogenicznej co oznacza, że potencjalnie każdy z izolatów tego patogena jest w

stanie zakazić każdą z dotychczas poznanych roślin-gospodarzy. Ostatnie doniesienia z zakresu genomiki porównawczej potwierdziły, że DNA chromosomalne tego patogena są wysoce konserwowane, a sekwencje białek zlokalizowanych na chromosomie genów wykazują ponad 99% podobieństwa sekwencji aminokwasowych. Jak większość gatunków bakteryjnych, *E. amylovora* oprócz DNA chromosomalnego posiada również plazmidy, czyli pozachromosomalne elementy DNA mające zdolność do autonomicznej replikacji. Natywny plazmid pEA29 występuje, z niewielkimi wyjątkami, powszechnie u szczepów tego gatunku. Rozmiar tego plazmidu waha się od 27.6 do 34.9 kpz a największe różnice w jego wielkości obserwowane są u szczepów infekujących rośliny z rodzaju *Rubus*. Zróżnicowanie pagenu *E. amylovora* jest związane głównie z posiadaniem lub brakiem różnych plazmidów.

Intensywne badania nad genomem *E. amylovora* wykazały obecność różnych innych plazmidów w różnych szczepach tego gatunku. Jak dotąd opisano ok 30 różnych plazmidów u *E. amylovora* o wielkości od 1.7 kpz (pEA1.7) do 78 kpz (pEA78).

Cel badań

1. Analiza DNA plazmidowego u szczepów *E. amylovora* pochodzących z różnych rejonów geograficznych.
2. Określenie sekwencji i adnotacja genów nowo odkrytych plazmidów.
3. Analiza wpływu nowych plazmidów na właściwości patogeniczne *E. amylovora*.

Badania własne

DNA plazmidowy był izolowany z 162 szczepów *E. amylovora* pochodzących z Polski i 160 z innych rejonów geograficznych. Izolowane plazmidy były elektroforetycznie rozdzielane w żelu agarozowym, wybarwiane w roztworze bromku etydyny i obserwowane w świetle UV w celu określenia ich rozmiaru. Wyizolowane plazmidy były poddawane cięciu enzymem restrykcyjnym *Bam*HI a produkty cięcia były oceniane elektroforetycznie. DNA plazmidowy izolatów, który po trawieniu enzymem *Bam*HI posiadał tylko jeden produkt cięcia o wielkości ok 30 kpz charakterystyczny dla plazmidu pEA29, był dodatkowo cięty enzymem *Hind*III, w celu potwierdzenia obecności innych plazmidów lub stwierdzenia różnic w sekwencji plazmidu pEA29. Na podstawie tych analiz, stwierdzono, że plazmidy w szczepach 692, 650a, 651a, 652a i 635a posiadają nietypowe profile restrykcyjne, z tym, że u szczepów 650a, 651a i 652a są one identyczne. Aby stwierdzić, czy plazmidy o nietypowych

wzorach restrykcyjnych są już poznane, kilka wybranych fragmentów restrykcyjnych zostało sklonowanych i zsekwencjonowanych. Na podstawie porównania z sekwencjami zdeponowanymi w bazie GenBank stwierdzono, że fragmenty wszystkich trzech plazmidów nie mają lub mają niewielką homologię do sekwencji zdeponowanych w GanBank, a co za tym idzie są to fragmenty nowych, dotąd nieopisanych plazmidów *E. amylovora*.

DNA plazmidowy szczepów 692, 651a i 635a był sekwencjonowany przy użyciu techniki NGS (ang. Next Generation Sequencing) przez firmę Genomed S.A. (Warszawa), a uzyskane odczyty były składane w całkowitą sekwencję plazmidu przy użyciu programu CLC Genomic Workbench. Następnie, z zastosowaniem różnych programów komputerowych, określano rodzaj genów i ich położenie na uzyskanych sekwencjach plazmidów. W wyniku tego stwierdzono, że:

i/ szczep 692 zawiera nowy plazmid, który został nazwany pEA68 i którego wielkość wynosi 68 761 pz, a zlokalizowanych jest na nim 79 otwartych ramek odczytu (ang. ORF);

ii/ szczep 651a zawiera nowy plazmid – pEA27, o wielkości 29 462 pz zawierający 38 otwartych ramek odczytu;

iii/ szczep 635a zawiera nowy plazmid – pEA30, o wielkości 29 585 pz i zlokalizowanych 35 otwartych ramkach odczytu.

Analiza 491 szczepów *E. amylovora* pochodzących z 17 krajów w tym 13 europejskich, pod kątem występowania nowo odkrytych plazmidów wykazała, obecność plazmidu pEA68 dodatkowo w dwóch szczepach pochodzących z Belgii, natomiast plazmidy pEA30 i pEA27 nie były wykryte w żadnym z innych szczepów oprócz tych, w których oryginalnie je odnaleziono. Dodatkowo na podstawie porównawczych analiz sekwencji, stwierdzono, że plazmid pEA68 wykazał podobieństwo do dwóch wcześniej opisanych plazmidów: pEA72 z USA i pEA78 z Meksyku. Analiza wykazała, 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.

Analiza stabilności plazmidów pEA68, pEA30 i pEA27 w ich macierzystych komórkach szczepów *E. amylovora* wykazała, że są bardzo stabilne i nie są eliminowane z komórki nawet po 20 dniach pasażowania w pożywce płynnej.

W celu analizy wpływu nowych plazmidów na syntezę amyloworanu (egzopolisacharydu kluczowego dla patogeniczności *E. amylovora*) i na wirulencję szczepów, plazmidy były

usuwane z macierzystych komórek wykorzystując cechę niezgodności plazmidów. W tym celu, za pomocą analiz bioinformatycznych, zlokalizowano sekwencję *ori* (ang. replication origin) na każdym z badanych plazmidów, zaprojektowano startery tak aby amplifikować rejon *ori* każdego z plazmidów i zamplifikowane fragmenty klonowano do wektora pGEM-T niosącego gen odporności na ampicylinę. Tak uzyskane konstrukty pGEM-T::*ori* były transformowane do chemicznie kompetentnych komórek bakteryjnych macierzystych szczepów *E. amylovora*, a następnie pasażowane kilkakrotnie na podłożu z ampicyliną w celu usunięcia badanych plazmidów. Po usunięciu badanych plazmidów z komórek bakteryjnych, pasażowano szczepy na podłożu bez antybiotyku tak aby usunąć konstrukty pGEM-T::*ori* z komórek. Tak przygotowane szczepy jak i szczepy dzikie posiadające nowe plazmidy były testowane pod kątem wirulencji na jednorocznych pędach drzewek jabłoni odm. Idared w warunkach szklarniowych, a poziom syntezy amyloworanu był analizowany przy zastosowaniu metody z chlorkiem cetylopirydyniowym. Tylko w wypadku szczepu 635a wykazano istotne statystycznie obniżenie wirulencji bakterii po usunięciu plazmidu pEA30 z komórek, w przypadkach pozostałych plazmidów nie obserwowano żadnego wpływu. Nie obserwowano również wpływu obecności plazmidów na syntezę amyloworanu.

Wnioski

1. Analiza DNA plazmidowego u szczepów *E. amylovora* z różnych rejonów geograficznych świata pozwoliła na odkrycie trzech nowych plazmidów: pEA68, pEA27 i pEA30.
2. Analiza porównawcza sekwencji nowego plazmidu pEA68 i dwóch wcześniej wykrytych plazmidów pEA72 i pEA78 pozwoliła na opisanie nowej rodziny plazmidów nazwanej „rodziną pEA68”.
3. Plazmid pEA68 nie ma wpływu na wirulencję ani syntezę amyloworanu przez bakterie *E. amylovora*, a analizy bioinformatyczne wykazały, że dwóch pozostałych członków „rodziny pEA68” również nie powinno mieć wpływu na właściwości patogeniczne bakterii.
4. Nowe plazmidy wykazują dużą stabilność w ich macierzystych komórkach szczepów *E. amylovora*.
5. Spośród plazmidów pEA27 i pEA30, tylko ten drugi wykazywał pozytywny wpływ na wirulencję bakterii, natomiast żaden z nich nie wykazywał wpływu na syntezę amyloworanu.

6. Nowe plazmidy nie są szeroko rozpowszechnione wśród szczepów *E. amylovora*: pEA68 znaleziono tylko w jednym szczepie z Polski i dwóch wyizolowanych w Belgii. Plazmidy pEA27 i pEA30 były znalezione tylko w szczepach izolowanych w Polsce – pEA27 w 3 szczepach a pEA30 w jednym.
7. Choć pEA68 nie został wykryty w wielu szczepach, razem z pEA72 z USA i pEA78 z Meksyku, członkowie nowej „rodziny pEA68” występują na dwóch kontynentach.
8. Dalsze intensywne poszukiwania mogą doprowadzić do odkrycia nowych plazmidów *E. amylovora*.
9. Wszystkie trzy nowe plazmidy zostały znalezione w szczepach *E. amylovora* wyizolowanych z chorych roślin pochodzących z importu – wskazuje to na możliwość zawleczenia ich z zagranicy.
10. Powiązanie informacji o różnych szczepach bakterii, plazmidach i podobieństwie między nimi może być skutecznym sposobem pozyskania informacji na temat przepływu plazmidów, ich etiologii i zasięgu geograficznego.

Emadeldeen Alimaker Mohamed

