

Ocena zróżnicowania genetycznego szczepów *Pseudomonas syringae* powodujących kanciastą plamistość ogórka (*Cucumis sativus* L.)

Renata Słomnicka¹, Helena Olczak-Woltman¹, Magdalena Przerwa¹,
Angelo Mazzaglia², Grzegorz Bartoszewski¹

¹ Szkoła Główna Gospodarstwa Wielkiego w Warszawie, Katedra Genetyki Hodowli i Biotechnologii Roślin,
ul. Nowoursynowska 159, 02-776 Warszawa

² University of Tuscia (DAFNE), Department of Agriculture and Forest Sciences, Via San Camillo de Lellis snc,
Viterbo, Italy



**SZKOŁA GŁÓWNA
GOSPODARSTWA
WIEJSKIEGO**



Wprowadzenie i cel badań

Bakteryjna kanciasta plamistość to jedna z groźniejszych chorób w uprawie polowej ogórka, a jej sprawcą są bakterie należące do gatunku *Pseudomonas syringae*. W Polsce choroba ta powoduje głównie uszkodzenia liści, co sprzyja wtórnemu porażeniu roślin przez mączniaka rzekomego, prowadząc do strat plonów. Źródłem pierwotnych infekcji są resztki porażonych roślin i nasiona, a nasileniu choroby sprzyja duża wilgotność powietrza.

Celem badań było ocena kolekcji szczepów *Pseudomonas syringae* patogenicznych dla ogórka pod względem stopnia wirulencji i różnicowania genetycznego.

Badania realizowano w ramach działania naukowego MINIATURA 3 numer 2019/03/X/NZ9/00890.



Fig. 1. Objawy kanciastej plamistości na roślinach odpornej linii Gy14 (z lewej) i podatnej linii B10 (z prawej).

Kolekcja 30 szczepów *P. syringae*

- szczepy wyizolowane z liści roślin ogórka gruntowego rosnącego w Polsce (4 szczepy)
- szczepy pozyskane z europejskich banków patogenów (26 szczepów)

Testy patogeniczności na roślinach ogórka

- inokulum $OD_{600} = 0,05$
- oprysk na roślinach w fazie 2-3 liści
- wykonano dwa niezależne testy w warunkach fitotronowych
- podczas każdego testu oceniano po 24 rośliny dla każdego szczepu (4 powt. – po 6 roślin na powtórzenie)
- 9-stopniowa ocena objawów i DSI (disease severity index) po 7 dniach od inokulacji

Wyniki

Pod względem stopnia nasilenia objawów testowane szczepy podzielono na dwie grupy, charakteryzujące się średnim (DSI 4.5-6.0) i wysokim stopniem wirulencji (DSI < 4.5) (Fig. 2).



CCM2858
DSI – 2.5



W385
DSI-3.3



814/98
DSI-3.7



CCM2857
DSI-3.9



W391
DSI-4.0



W384
DSI-4.6



B121/11
DSI-4.7



B37/09
DSI-5.6



B108/11
DSI-5.3

Fig. 2. Objawy kanciastej plamistości na roślinach podatnej linii B10 po 7 dniach od inokulacji spowodowane przez wybrane szczepy *P. syringae*.

Analiza loci MLST

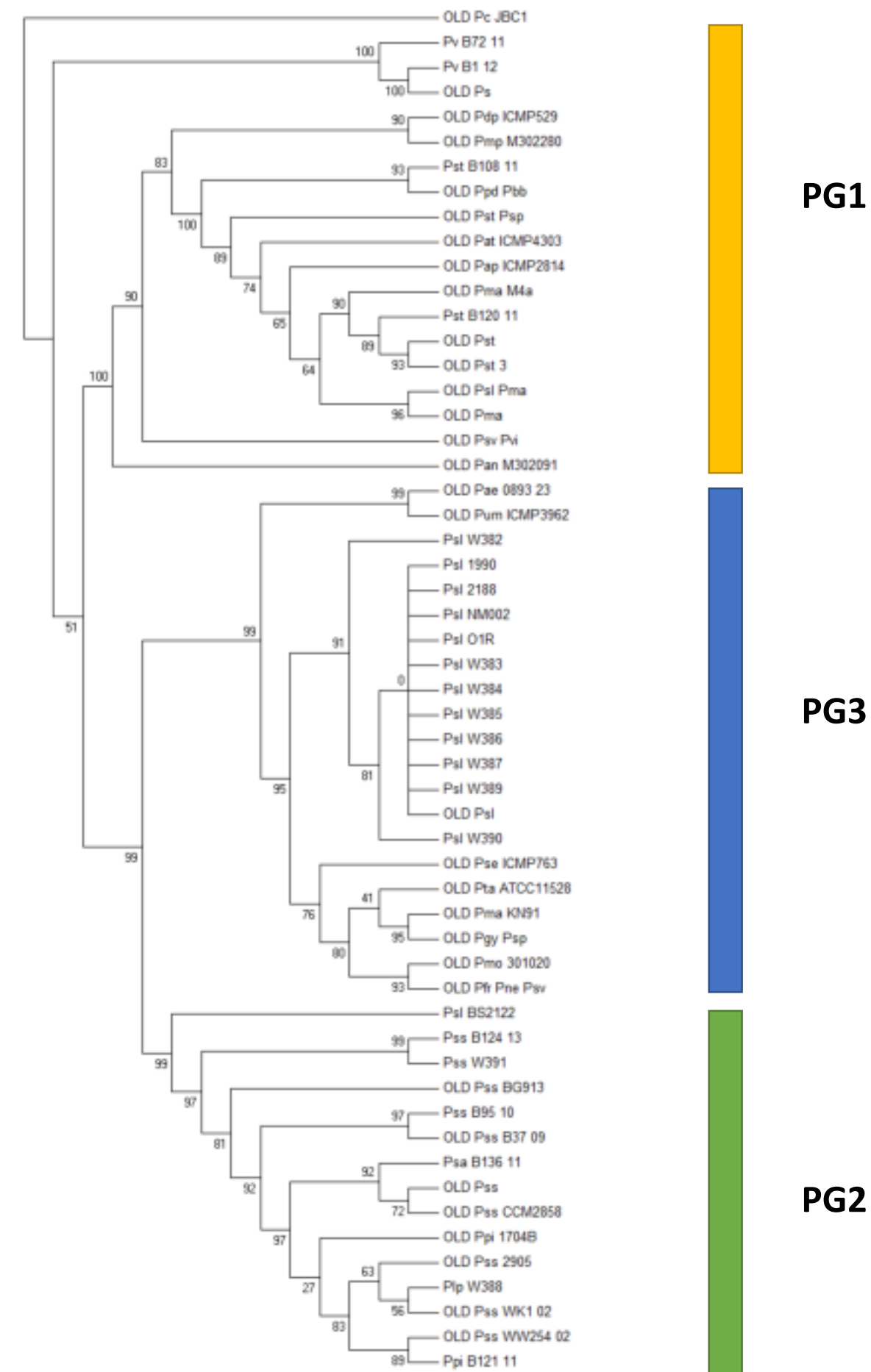
- 7 loci: *acn*, *cts*, *gapA*, *gyrB*, *pgi*, *pfk*, *rpoD*
- przyrównanie sekwencji MLST do genomów *P. syringae* dostępnych w bazach NCBI, JGI, Pseudomonas DB i ustalenie przynależności gatunkowej i patowarowej szczepów
- filogenetyka bayesowska

Wyniki

Przyrównując sekwencje MLST do genomów *P. syringae* dostępnych w bazach stwierdzono, że 15 szczepów wykazuje podobieństwo do *pv. lachrymans* (grupa filogenetyczna 3), 12 do *pv. syringae* (grupa filogenetyczna 2), a trzy szczepy do innych patowarów należących do grupy filogenetycznej 1. Wszystkie szczepy wyizolowane z liści ogórka gruntowego rosnącego w Polsce wykazały największe podobieństwo do szczepów *pv. syringae* (Fot. 3).

Sekwencjonowanie *de novo* wybranych genomów

- wybrano 10 reprezentatywnych genomów (8 szczepów należących do *pv. lachrymans*, 2 szczepy należące do *pv. syringae*)
- sekwencjonowanie hybrydowe genomów
- składanie *de novo* odczytów pochodzących z Oxford NanoPore MiniON
- złożone sekwencje skorygowano odczytami Illumina Miseq (Unicycler 0.4.7, Canu 1.7)
- charakterystyka wybranych rejonów różnicujących badane szczepy (analiza bioinformatyczna – CLC Genomics, weryfikacja rejonów – PCR)



Fot.3. Zróżnicowanie genetyczne kolekcji szczepów *P. syringae* – analiza bayesowska. W analizie uwzględniono również sekwencje innych szczepów własnych i sekwencje genomów dostępnych w publicznych bazach danych.

Tab. 1. Podstawowe parametry złożenia 10 zsekwencjonowanych genomów szczepów *P. syringae*.

Lp	Szczep	Wielkość kontigu chromosom. (pz)	Status kontigu chromosom.	N50	%GC	L. kontigów plazmidowych (w tym kompletnych)	L. zidentyfikowanych genów
1	Psl W382	5 870 873	kompletny	5 870 873	58,31	5 (5)	5651
2	Psl W383	6 146 370	kompletny	6 146 370	58,17	4 (3)	5973
3	Psl W384	5 921 208	kompletny	5 921 208	58,27	2 (2)	5752
4	Psl W386	6 091 058	kompletny	6 091 058	58,15	8 (7)	6020
5	Psl W387	5 588 704	kompletny	5 588 704	58,25	7 (4)	6012
6	Psl W389	5 839 035	kompletny	5 839 035	58,33	6 (6)	5648
7	Psl W390	6 073 701	kompletny	6 073 701	58,20	4 (4)	5948
8	Psl BG283	6 417 749	niekompletny	712 363	58,61	12 (10)	6986
9	Pss CCM2858	5 879 091	kompletny	5 879 091	59,12	3 (1)	5253
10	Pss WK1/02	6 087 143	kompletny	6 087 143	58,94	0 (0)	5302

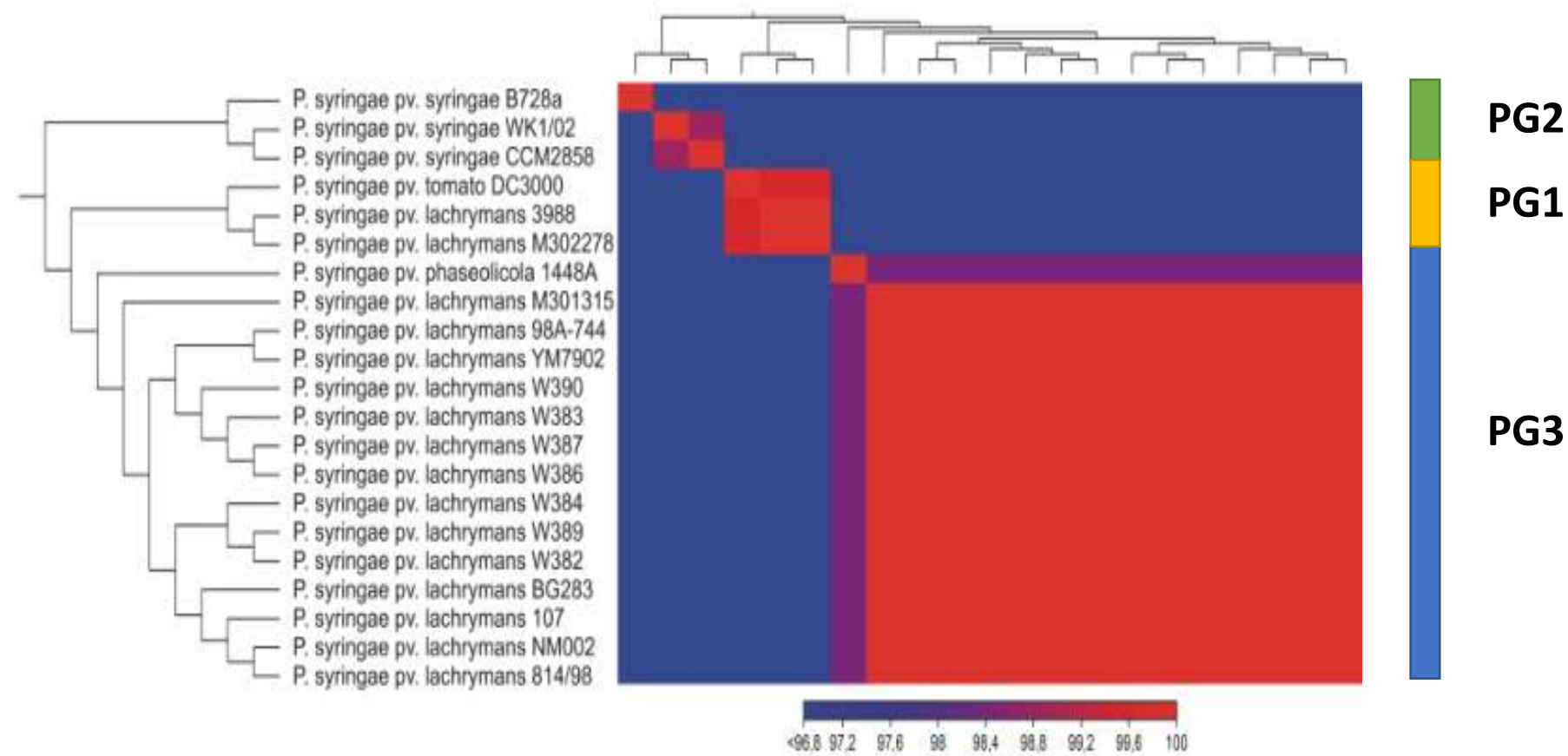
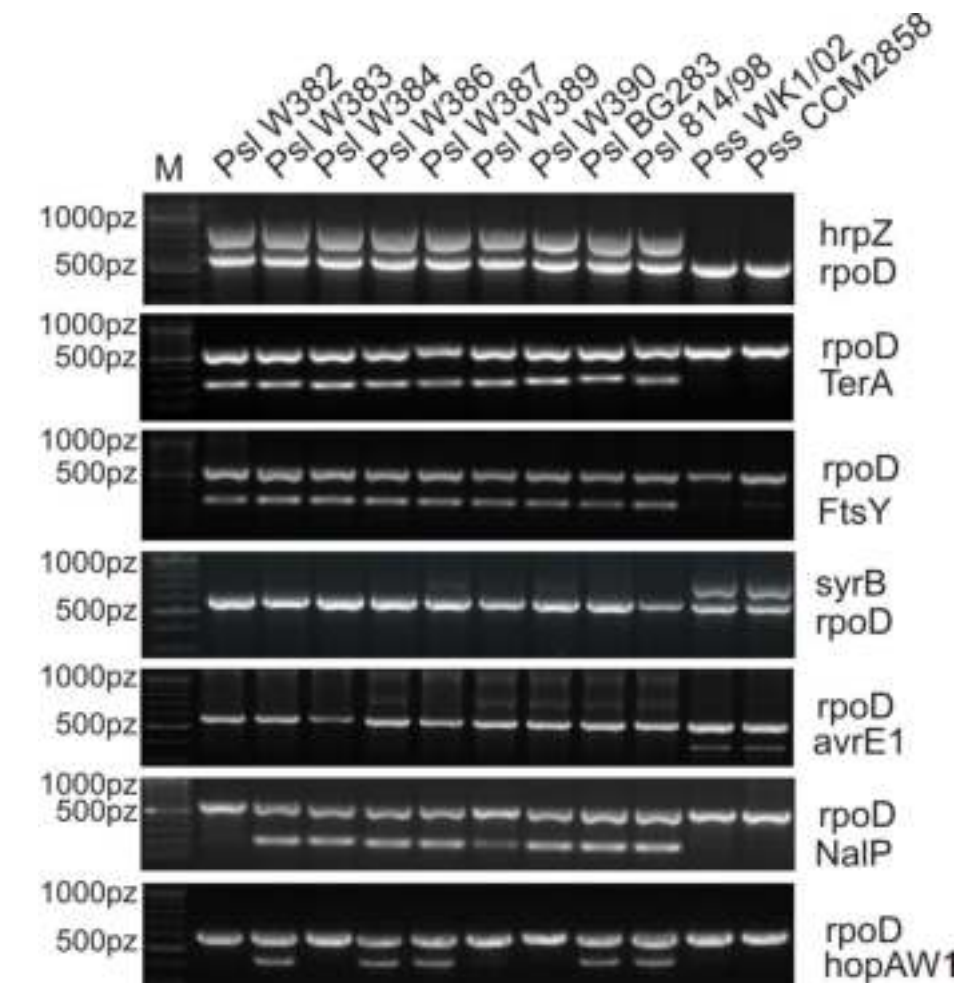


Fig. 4. Heatmapa podobieństwa genetycznego szczepów *P. syringae* utworzona w oparciu o analizę ANI całych genomów. W analizie uwzględniono również genomy dostępne w publicznych bazach danych.

Fig. 5. Rozdział elektroforetyczny produktów PCR z wybranymi parami starterów specyficznymi do *hrpZ*, *TerA*, *FtsY*, *syrB*, *avrE1*, *NalP*, *hopAW1* oraz *rpoD* (kontrola wewnętrzna reakcji).



Wyniki

- 1) Kompletnie złożenie chromosomu bakteryjnego otrzymano dla 9 szczepów, a dla kilku szczepów stwierdzono obecność plazmidów i dokonano ich złożenia (Tab. 1).
- 2) Analizy porównawcze genomów pokazują zróżnicowanie szczepów *P. syringae* powodujących objawy kanciastej plamistości na ogórku, natomiast szczepy *pv. lachrymans* z PG3, które powodują typowe objawy kanciastej plamistości na ogórku są dość jednolite genetycznie (Fig. 4).
- 3) Zidentyfikowano różnice między patowarami *lachrymans* i *syringae*, a wyniki zweryfikowano laboratoryjnie, dzięki czemu wytypowano kilka loci, które mogą być przydatne w diagnostyce *P. syringae* (Fig. 5).