

Ekologiczna rola tailocyn (cząstek przypominających ogonki fagowe) u bakterii pektynolitycznych z rodziny *Pectobacteriaceae*

mgr Marcin Borowicz

Bakterie zasiedlające powierzchnie i tkanki roślin stale rywalizują o przestrzeń i składniki odżywcze, wykorzystując w tym celu szeroki wachlarz mechanizmów konkurencji. Wśród bakterii związanych z roślinami, patogeny z grupy Soft Rot *Pectobacteriaceae* (SRP) są szczególnie narażone na presję konkurencyjną. Gatunki należące do rodzajów *Pectobacterium*, *Dickeya* i *Musicola* powodują mokrą zgniliznę i inne choroby roślin uprawnych o dużym znaczeniu gospodarczym, a jednocześnie występują w szerokim zakresie siedlisk, od wód powierzchniowych i gleb rolniczych po tkanki infekowanych roślin, gdzie napotykać zarówno blisko spokrewnione szczepy SRP, jak i odległe filogenetycznie mikroorganizmy. Genomy tych bakterii zawierają liczne elementy pochodzenia profagowego, a ewolucyjne „udomowienie” genów kodujących ogonki profagów jest uważane za źródło pochodzenia tailocyn – bakteriobójczych cząstek, które zabijają wrażliwe komórki przez mechaniczne przebicie ich ściany i błon komórkowych. Tym, co wyróżnia tailocyny spośród innych mechanizmów konkurencji międzybakteryjnej, jest fakt, że ich produkcja wymaga śmierci komórki produkującej: cząstki są składane w cytoplazmie i mogą zostać uwolnione wyłącznie w wyniku lizy. Pomimo tego kosztu klastry genów tailocyn występują u wielu różnych taksonów bakteryjnych, co wskazuje na istnienie przewagi selekcyjnej, która rekompensuje koszt ich produkcji. W SRP charakter tej przewagi pozostawał niezbadany, a jedyną szczegółowo opisaną tailocyną typu R była *carotovorcyna* Er z *Pectobacterium carotovorum*.

Niniejsza rozprawa doktorska, składająca się z czterech opublikowanych prac eksperymentalnych, charakteryzuje oddziaływania międzybakteryjne pośredniczone przez tailocyny w obrębie SRP – od właściwości molekularnych pojedynczych cząstek po ich potencjalną rolę ekologiczną w środowiskach związanych z roślinami. W celu opracowania systemu modelowego scharakteryzowałem pierwszą tailocyną typu R u *Dickeya dadantii* szczep 3937, nazwaną *dickeyocyną* P2D1. Jej klastry genowy wykazuje homologię z genami ogonka *Peduwirusa* P2 – linią filogenetycznie odrębną od *carotovorcyny* Er. Wskazuje to, że oba rodzaje SRP nabyły swoje tailocyny niezależnie od różnych dawców fagowych. W celu określenia warunków i dynamiki produkcji tailocyn zbadano kinetykę uwalniania P2D1, wykazując, że produkcja tych cząstek przebiega w sposób ściśle skoordynowany i może być indukowana przez strukturalnie różne czynniki uszkodzające DNA, w tym mitomycynę C, nadtlenek wodoru, ciprofloksacynę i norfloksacynę. Stwierdzenie, że H_2O_2 indukuje uwalnianie tailocyn, ma szczególne znaczenie ekologiczne, ponieważ bakterie SRP narażone są na reaktywne formy tlenu produkowane przez roślinę podczas infekcji.

W celu określenia, jak powszechna jest produkcja tailocyn wśród środowiskowych szczepów SRP, przebadłem 27 szczepów wyizolowanych z rzeki Durance we Francji: 24 z nich produkowało tailocyny, a analiza genomowa 190 kompletnych genomów SRP potwierdziła obecność klastrów tailocyn u 83% szczepów *Pectobacterium* i 69% szczepów *Dickeya*. Wszystkie klastry u *Dickeya* są homologiczne do locus P2D1, a wszystkie klastry u *Pectobacterium* do locus *carotovorcyny* Er, przy czym żaden z przebadanych genomów nie zawierał obu typów klastrów jednocześnie, co potwierdza niezależne nabycie genów tailocyn już po dywersyfikacji rodzajowej. Niektóre tailocyny *Dickeya* były aktywne wobec szczepów *Pectobacterium*, natomiast żadne tailocyny *Pectobacterium* nie wykazywały aktywności wobec szczepów *Dickeya*. Cząstki tailocyn wykryto również w eksperymentalnie zainfekowanej tkance ziemniaka, co wskazuje na ich obecność podczas infekcji roślin.

W celu sprawdzenia, czy ekologiczny zasięg działania tailocyn wykracza poza SRP, przebadłem 480 izolatów glebowych i ryzosferowych pod kątem wrażliwości na P2D1: dziewięć szczepów *Pseudomonas* należących do różnych kładów filogenetycznych okazało się wrażliwych, a delecja genów kodujących strukturalne elementy tailocyny P2D1 u *D. dadantii* potwierdziła, że obserwowana aktywność zależy od cząstek tailocyn. Sześć z dziewięciu wrażliwych szczepów *Pseudomonas* nie wywoływało objawów chorobowych na ziemniaku i hamowało mokrą zgniliznę wywoływaną przez *D. dadantii*, podczas gdy trzy pozostałe same wywoływały objawy mokrej zgnilizny. Oznacza to, że P2D1 może eliminować bakterie o odmiennych rolach ekologicznych, w tym względem swojego producenta.

Uzyskane w tej pracy wyniki wskazują, że tailocyny są powszechnym i funkcjonalnym elementem arsenału konkurencyjnego SRP. Utrzymanie klastrów wywodzących się z odrębnych linii fagowych w obu rodzajach, wykrycie cząstek w zainfekowanej tkance roślinnej oraz wykazanie, że H_2O_2 indukuje ich produkcję, wskazują na przewagę selekcyjną, która utrzymała tailocyny pomimo kosztu związanego z lizą komórki produkującej. Chociaż bezpośredni dowód na udział tailocyn w rywalizacji międzybakteryjnej w warunkach naturalnych nie został dotychczas uzyskany, niniejsza rozprawa tworzy molekularne, genomowe i ekologiczne podstawy, na których takie badania mogą być prowadzone.