

Joanna Puławska

Analiza różnicowania bakterii kompleksu *Agrobacterium/Rhizobium*
– *Rhizobium skierniewicense* sp. nov.
i *Rhizobium nepotum* sp. nov. [(Puławska et al., 2012) Frank 1889] –
nowe gatunki bakterii wywołujących guzowatość korzeni

AUTOREFERAT

Instytut Ogrodnictwa
Zakład Ochrony Roślin Sadowniczych
Pracownia Fitopatologii Sadowniczej

Skierniewice, 02.05.2012

1. Dane personalne

Imię i nazwisko **Joanna Puławska**
Miejsce pracy Instytut Ogrodnictwa
 ul. Konstytucji 3 Maja 3/1
 96-100 Skierniewice

2. Posiadane dyplomy, stopnie naukowe– z podaniem nazwy, miejsca i roku ich uzyskania oraz tytułu rozprawy doktorskiej

- 13.06.1995 Politechnika Gdańska, Wydział Chemii, specjalność biotechnologia,
stopień magistra inżyniera – z *wyróżnieniem*
praca magisterska pt. „Badanie wpływu białka IHF *Escherichia coli* na
transkrypcję RNAII *ori p15A*”
promotor: prof. dr hab. Józef Kur
- 19.10.2001 Instytut Sadownictwa i Kwiaciarnictwa w Skierniewicach, stopień doktora
nauk przyrodniczych – z *wyróżnieniem*
praca doktorska pt. „Molekularne podstawy wykrywania i identyfikacji
Agrobacterium spp.”
promotor: prof. dr hab. Piotr Sobiczewski

3. Informacje o dotychczasowym zatrudnieniu w jednostkach naukowych

- 23.10.1995 – 19.10.2001 asystent w Pracowni Fitopatologii, Zakładu Ochrony Roślin,
Instytutu Sadownictwa i Kwiaciarnictwa w Skierniewicach
- od 19.10.2001 adiunkt w Pracowni Fitopatologii, Zakładu Ochrony Roślin,
Instytutu Sadownictwa i Kwiaciarnictwa (od 01.01.2011
przekształconego w Instytut Ogrodnictwa) w Skierniewicach

4. Wskazanie osiągnięcia stanowiącego podstawę postępowania habilitacyjnego

Osiągnięciem naukowym wynikającym z art. 16 ust. 2 ustawy z dnia 14 marca 2003 roku o stopniach naukowych i tytule naukowym oraz o stopniach i tytule w zakresie sztuki (Dz. U. nr 65, poz. 595 ze zm.) jest jednotematyczny cykl publikacji naukowych pt. „Analiza zróżnicowania bakterii kompleksu *Agrobacterium/Rhizobium* – *Rhizobium skierniewicense* sp. nov. i *Rhizobium nepotum* sp. nov. [(Puławska et al., 2012) Frank 1889] – nowe gatunki bakterii wywołujących guzowatość korzeni”

Publikacje wchodzące w skład rozprawy habilitacyjnej:

H1. **Puławska J.**, Z. Piotrowska-Seget. (2003). Characterization of *Agrobacterium* isolates from chrysanthemum on the basis of biochemical tests, FAME analysis and RAPD. *Phytopathol. Pol.* 30: 9-17 (IF=0; MNiSW=6)

Indywidualny wkład: autor korespondencyjny, pomysłodawca, wiodący udział w planowaniu doświadczeń, przeprowadzanie testów biochemicznych, wykonywanie testów RAPD, analiza bioinformatyczna uzyskanych wyników RAPD i FAME, sformułowanie wniosków, przygotowanie manuskryptu (80%)

H2. **Puławska J.** (2010). Crown gall of stone fruits and nuts - economic significance and diversity of its causal agent - tumorigenic *Agrobacterium* spp. *Journal of Plant Pathology* 92 (1), S87-S98. (IF=1,054; MNiSW=20)

Indywidualny wkład: autor korespondencyjny, całokształt prac związanych z przygotowaniem manuskryptu (100%)

H3. **Puławska J.**, Kałużna M. Phylogenetic relationship and genetic diversity of *Agrobacterium* spp. isolated in Poland based on *gyrB* gene sequence analysis and RAPD. *European Journal of Plant Pathology* DOI 10.1007/s10658-011-9911-2 (w druku) (IF=1,834¹; MNiSW=32)

*Indywidualny wkład: autor korespondencyjny, pomysłodawca, planowanie doświadczeń, analiza RAPD, sekwencjonowanie genów 16S rRNA dla wszystkich i *gyrB* dla części analizowanych szczepów, analiza filogenetyczna, sformułowanie wniosków, przygotowanie manuskryptu (80%)*

H4. **Puławska J.**, Willems A., Sobiczewski P. (2012) *Rhizobium skierniewicense* sp. nov. isolated from tumors on chrysanthemum and cherry plum. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology* 62, 895-899 (IF=2,265¹; MNiSW=27)

*Indywidualny wkład: autor korespondencyjny, pomysłodawca, wiodący udział w planowaniu doświadczeń, sekwencjonowanie genów 16SrRNA, *gyrB*, *glnA*, *rpoB* dla części badanych szczepów, analiza filogenetyczna uzyskanych sekwencji, analiza cech biochemicznych wszystkich badanych szczepów, testy patogeniczności, sformułowanie wniosków, przygotowanie manuskryptu (80%)*

¹ IF za lata 2011 i 2012 nie został jeszcze obliczony, w związku z tym podany jest 5-o letni IF dla czasopisma

H5. **Puławska J.**, Willems A., De Meyer S.E., Süle S. *Rhizobium nepotum* sp nov. isolated from tumors on different plant species Systematic and Applied Microbiology doi: 10.1016/j.syapm.2012.03.001 (w druku) (IF=2,935¹; MNiSW=27)

Indywidualny wkład: autor korespondencyjny, pomysłodawca, wiodący udział w planowaniu doświadczeń, sekwencjonowanie genów 16SrRNA, atpD, gyrB, glnA, recA i rpoB dla badanych szczepów, analiza filogenetyczna uzyskanych sekwencji, analiza cech biochemicznych wszystkich badanych szczepów, testy patogeniczności, sformułowanie wniosków, przygotowanie manuskryptu (80%)

SYNTETYCZNE OMÓWIENIE PUBLIKACJI WCHODZĄCYCH W SKŁAD ROZPRAWY

Bakterie z rodzaju *Agrobacterium* są tlenowymi, ruchliwymi, gramujemnymi pałeczkami z 1-6 rzęskami rozmieszczonymi perytrychalnie, nie mającymi zdolności tworzenia przetrwalników. W obrębie tego rodzaju występują patogeny roślin, bakterie niepatogeniczne (saprotroficzne) oraz oportunistyczne patogeny ludzkie. *Agrobacterium* pozbawione onkogenów są wykorzystywane w inżynierii genetycznej roślin.

Wśród fitopatogenicznych agrobakterii wyróżnia się takie, które wywołują guzowatość pędów i korzeni (bakterie tumorogenne) lub włosowatość korzeni. Z ekonomicznego punktu widzenia, guzowatość powoduje większe straty w produkcji roślinnej. Infekcja roślin przez *Agrobacterium* ma genetyczny charakter i polega, w przypadku bakterii tumorogennych, na przeniesieniu fragmentu zwanego T-DNA z plazmidu Ti do komórki roślinnej i jego wbudowaniu do genomu roślinnego. Ekspresja genów zlokalizowanych na T-DNA, kodujących m.in. syntezę auksyn i cytokinin powoduje hipertrofię i hiperplazję komórek zaatakowanej rośliny prowadzących w efekcie do powstania guzowatych narośli.

Przez wiele lat klasyfikacja gatunków w obrębie rodzaju *Agrobacterium* bazowała na zdolnościach chorobotwórczych bakterii. I tak bakterie powodujące guzowatość były klasyfikowane do gatunku *A. tumefaciens*, bakterie powodujące włosowatość do *A. rhizogenes*, a bakterie niepatogeniczne do gatunku *A. radiobacter* (Conn, 1942). Nazwy gatunkowe bakterii odnosiły się wyłącznie do ich patogeniczności, która jest warunkowana głównie genami zlokalizowanymi na koniugacyjnych plazmidach Ti i Ri (Kerr i in., 1977). Nabycie lub utrata takiego plazmidu przez *Agrobacterium* powodowała zmianę jej statusu taksonomicznego. Taki podział na gatunki pozostawał w sprzeczności z przyjętymi zasadami taksonomii bakterii, które opierają się na stałych, zarówno fenotypowych jak i genetycznych cechach, zakodowanych na chromosomie. Niezależnie od przyjętego podziału, bazując na cechach morfologicznych i biochemicznych, bakterie z rodzaju *Agrobacterium* podzielono na 3 biowary (Moore i in., 1988; Holmes, 1988; Holt i in., 1994). Późniejsze badania wykorzystujące analizę DNA, w tym badania własne dotyczące analizy sekwencji genu 23S rRNA (Puławska i in., 2000), wykazały, że podział ten jest zgodny z regułami taksonomii i, jak wcześniej zauważono, biowary powinny być podniesione do statusu gatunku (Sawada et al., 1993). Dodatkowo, izolaty pochodzące z winorośli zaklasyfikowane jako biowar 3 (Kerr and

Panagopoulos, 1977; Süle, 1978) zostały później opisane jako gatunek *Agrobacterium vitis* (Ophel and Kerr, 1990). Zgodnie z regułami taksonomii opisano również dwa inne gatunki: *A. rubi* (Holmes and Roberts, 1981) i *A. larrymoorei* (Bouzar and Jones, 2001) wyraźnie odróżniane na podstawie cech biochemicznych i genetycznych.

Z przeprowadzonych badań opartych m.in. na analizie sekwencji genu kodującego 23S rRNA (Puławska i in., 2000) wynikało również, że bakterie z rodzaju *Agrobacterium* nie tworzą jednego zwartego monofiletycznego klasteru, lecz są filogenetycznie „poprzeplatane” z bakteriami z rodzaju *Rhizobium*. Fakt ten skłonił Younga i współpracowników (2001) do wysunięcia propozycji, aby wszystkie bakterie z dotychczasowego rodzaju *Agrobacterium* włączyć do rodzaju *Rhizobium* tym samym likwidując rodzaj *Agrobacterium* i klasyfikując tumorogenne bakterie do gatunków: *Rhizobium radiobacter*, *Rhizobium rhizogenes*, *Rhizobium rubi*, *Rhizobium vitis* i *Rhizobium larrymoorei*. Propozycja ta jednak spotkała się z dużym sprzeciwem środowiska naukowego (Farrand i in. 2003). Zgodnie z regułami Międzynarodowego Kodu Nomenklatury Bakterii (Lapage i in., 1992) wszystkie opisane i zatwierdzone nazwy gatunków bakteryjnych mogą być używane i w związku z tym, mimo propozycji Young’a i in. (2001), nazwa rodzajowa *Agrobacterium* jest w dalszym ciągu używana.

Znaczenie gospodarcze guzowatości korzeni i charakterystyka zróżnicowania fenotypowego i genetycznego sprawców tej choroby została szczegółowo opisana w pracy **Puławska (2010)** (publikacja H2 w wykazie publikacji wchodzących w skład rozprawy habilitacyjnej). Guzowatość korzeni jest jednym z najważniejszych czynników ograniczającym produkcję szkółkarską drzew owocowych i krzewów róży w Polsce. Szkodliwość guzów rozwijających się na różnych częściach systemu korzeniowego, a niekiedy na nadziemnej części roślin, polega m.in. na ograniczaniu fizjologicznych funkcji korzeni, co może doprowadzić do przedwczesnego zamierania roślin. Szacuje się, że z powodu tej choroby niszczone jest corocznie około miliona roślin. Straty w niektórych gospodarstwach, na przykład w uprawie gruszy, nierzadko wynoszą ponad 80%. Obowiązujące przepisy zabraniają dopuszczania do obrotu handlowego drzewek z guzami na szyjce korzeniowej i korzeniu głównym. Praktycznie w prawie wszystkich szkółkach drzew owocowych część roślin ulega corocznie dyskwalifikacji z powodu guzowatości korzeni.

Tumorogenne agrobakterie są polifagami o największym spośród wszystkich bakterii fitopatogenicznych zakresie roślin gospodarzy. De Cleene i De Ley (1976) stwierdzili, że 643 gatunki roślin należące do 331 rodzajów i 93 rodzin są porażane przez agrobakterie wywołujące guzowatość. Żadna z roślin jednoliściennych, oprócz kilku roślin należących do rzędu Liliales i Arales, nie jest podatna na infekcje przez te bakterie. Tumorogenne agrobakterie mogą się różnić zarówno cechami kodowanymi przez chromosomalny DNA jak i DNA plazmidowy. Oprócz gatunku *A. vitis* nie zaobserwowano korelacji między DNA chromosomalnym a plazmidowym. Zróżnicowanie wśród populacji agrobakterii zostało stwierdzone nie tylko wśród izolatów pochodzących z odległych od siebie obszarów jak

kontynenty lub kraje, ale także z mniejszych środowisk jak szkółki drzew owocowych, a nawet jeden guz lub w 1cm³ gleby. Największe zróżnicowanie obserwowane jest wśród bakterii należących do biowaru 1 zwanego również kompleksem *Agrobacterium tumefaciens*. Na podstawie hybrydyzacji DND-DNA, analizy AFLP i sekwencji genu *recA* rozróżniono 9 genomów oznaczonych G1-G9 (Popoff i in., 1984, Portier i in., 2006, Costechareyre i in., 2010). Dodatkowo opisano w literaturze szczepy, których nie można zaklasyfikować do żadnego znanego gatunku (**Puławska, 2010, H2**). Takie szczepy znalazłam podczas badań nad opracowaniem metody identyfikacji agrobakterii prowadzonych w ramach pracy doktorskiej. Metoda ta wykorzystuje technikę multipleks PCR z jednoczesnym użyciem 5 starterów komplementarnych do genu 23S rRNA – jednego uniwersalnego i pozostałych specyficznych dla czterech taksonów w obrębie rodzaju *Agrobacterium*: biowaru 1, biowaru 2, *A. vitis* i *A. rubi* (Puławska i in., 2006). Spośród testowanych bakterii dwie grupy szczepów dawały nietypowe wyniki analizy. Dwa z testowanych szczepów, Ch-11 i Ch-12 nie reagowały z żadnym z opracowanych starterów, natomiast trzy inne (0, 7/1, 39/7) pochodzące z Węgier dawały w wyniku amplifikacji produkty zarówno ze starterem specyficznym dla biowaru 1, jak i 2. Zróżnicowanie genetyczne tumorogennych agrobakterii i dokładna charakterystyka mająca na celu określenie pozycji taksonomicznej tych dwóch grup szczepów jest wiodącym tematem moich badań opisanych w publikacjach wchodzących w skład rozprawy habilitacyjnej.

Charakterystyka dwóch szczepów *Agrobacterium* (Ch11 i Ch12) wyosobnionych z guzów na *Chrysanthemum* pochodzących z uprawy szklarniowej w południowej Polsce została opisana w publikacji **Puławska i Piotrowska-Seget (2003)** (publikacja **H1**). Na podstawie analizy cech biochemicznych (utlenianie laktozy do 3 – ketolaktozy, zdolność wykorzystania cytrynianu i L - tyrozyny, wzrost bakterii i wytwarzanie czerwono-brunatnego kożuszka na powierzchni pożywki zawierającej cytrynian żelazowo – amonowy, produkcja kwasu z erytritolu, obecność oksydazy c i tolerancja chlorku sodu) stwierdzono, że oba szczepy mają cechy najbardziej podobne do gatunku *A. rubi*. Także analiza zawartości estrów metylowych kwasów tłuszczowych w komórkach badanych bakterii wykazała, że chociaż szczepy Ch11 i Ch12 różnią się między sobą, to jednak największe podobieństwo wykazują do bakterii z gatunku *Agrobacterium rubi*. Użyte w badaniach dla celów porównawczych inne szczepy tego gatunku również wykazały zróżnicowanie w zawartości kwasów tłuszczowych. Profile RAPD powstałe w wyniku amplifikacji DNA Ch11 i Ch12 w odrębnych reakcjach z 5 różnymi starterami były identyczne, ale różniły się od profili amplifikacji DNA trzech szczepów *A. rubi*. Wyniki przeprowadzonych analiz sugerowały, iż szczepy Ch11 i Ch12 mogą należeć do gatunku *A. rubi*. Bakterie należące do tego gatunku są powszechnie uważane za sprawców guzowatości na roślinach z rodzaju *Rubus* i jak wiadomo, dotąd nie były opisane jako sprawcy guzowatości na roślinach z rodzaju *Chrysanthemum*.

Dalsze badania nad zróżnicowaniem tumorogennych *Agrobacterium* wyizolowanych z guzów kilku gatunków roślin pochodzących z różnych regionów geograficznych Polski i świata z zastosowaniem analizy RFLP fragmentów genów *gyrB* i *parE*, sekwencji genów 16S rRNA i

gyrB oraz techniki RAPD zostały opisane w publikacji **Puławska i Kałużna (w druku)** (publikacja **H3**). Analiza 47 szczepów *Agrobacterium* wykazała, że zdecydowana ich większość należy do biowaru 2 (czyli *Agrobacterium rhizogenes* = *Rhizobium rhizogenes*). Jednakże wśród testowanych szczepów znaleziono takie, których nie można było zaklasyfikować do żadnego znanego gatunku. Były to wcześniej wspomniane szczepy Ch11 i Ch12 oraz szczep 81K. Największe zróżnicowanie obserwowano wśród szczepów należących do biowaru 1, podczas gdy szczepy biowaru 2 tworzyły bardziej homogeną grupę. Drzewo filogenetyczne skonstruowane na podstawie sekwencji genu *gyrB* miało podobną strukturę jak drzewa utworzone na podstawie genów 16S rRNA i 23S rRNA (Puławska i in., 2000). Sekwencje genu *gyrB* wykazywały jednak większe zróżnicowanie międzygatunkowe. Co za tym idzie, stwierdzono, że gen *gyrB* jest dobrym markerem filogenetycznym i może posłużyć do identyfikacji poszczególnych taksonów w obrębie kompleksu *Agrobacterium/Rhizobium*. Dodatkowo - jak zauważyli recenzenci tej publikacji - dużą wartością tej pracy jest fakt, że dzięki zastosowanej technice klonowania odseparowano gen *gyrB* od jego paralogu *parE* i analizę filogenetyczną przeprowadzono tylko na podstawie sekwencji genu *gyrB*. Taka procedura nie była stosowana w innych badaniach, co prowadziło do powstania niespójnych dendrogramów filogenetycznych konstruowanych na mieszaninie sekwencji tych dwóch genów.

Analiza RAPD wykazała bardzo duże zróżnicowanie wszystkich testowanych szczepów. Uzyskane profile RAPD różniły się na tyle, że można było znaleźć unikalne wzory amplifikacji niemalże dla każdego testowanego szczepu. Pozwala to na sformułowanie wniosku, że technika RAPD może być użyteczna do typowania szczepów *Agrobacterium* w badaniach epidemiologicznych.

Wyniki badań nad szczepami Ch11 i Ch12 opisane w publikacjach **H1** i **H3** sugerowały, że nie należą one do żadnego ze znanych gatunków bakterii. Dodatkowo w toku badań prowadzonych w ramach projektu COST Action 873 „Bacterial diseases of stone fruits and nuts”, z guza na korzeniach *Prunus cerasifera* var. *divaricata* pozyskano izolat AL. 9.3, którego wstępna charakterystyka wskazywała na duże podobieństwo do szczepów Ch11 i Ch12. Wszystkie trzy szczepy są patogeniczne i wywołują guzy na różnych gatunkach roślin np. słoneczniku, chryzantemie, *Cerasus* sp., *Rosa* sp. W celu określenia ich pozycji taksonomicznej podjęto szczegółowe badania z zastosowaniem metod klasycznych i molekularnych. Badania te opisano w publikacji **Puławska i in., (2012)** (publikacja **H4**). Określono sekwencje genu 16S rRNA tych szczepów i na podstawie analizy filogenetycznej stwierdzono, że są one najbliższymi spokrewnionymi z gatunkami *Rhizobium rubi* (podobieństwo sekwencji 99.6%), *Rhizobium radiobacter* (98.7%) and *Rhizobium larrymoorei* (98.1%). Analiza filogenetyczna oparta na sekwencjach genów metabolizmu podstawowego (ang. housekeeping genes): *glnA*, *gyrB* and *rpoB* potwierdziła odmienność badanych szczepów i ich najbliższe pokrewieństwo z *R. rubi*. Hybrydyzacja DNA-DNA szczepu Ch11 i szczepu typowego gatunku *R. rubi* LMG 156^T wykazała stopień homologii na poziomie 48%. W celu opracowania charakterystyki fenotypowej z ukierunkowaniem na cechy fenotypowe wyróżniające badane

szczyepy od innych, blisko spokrewnionych gatunków badano ponad 170 cech z zastosowaniem zestawu API 50CH (bioMérieux), GN2 MicroPlates (BIOLOG) i dodatkowych testów biochemicznych. Wyodrębniono 12 cech fenotypowych odróżniających szczepy Ch11, Ch12 i AL9.3. Najbardziej charakterystyczne to: zdolność do utylizacji kwasu β -hydroksymastłowego i brak zdolności do utylizacji L-fukozy. Dla nowego gatunku zaproponowano nazwę *Rhizobium skierniewicense* w związku z tym, że wszystkie znane jak dotąd szczepy tego gatunku zostały wyizolowane w Skierniewicach, w Instytucie Sadownictwa i Kwiaciarstwa. Szczep Ch11^T został wybrany jako szczep typowy gatunku i zdeponowany w dwóch międzynarodowych kolekcjach mikroorganizmów: LMG w Gandawie (Belgia) pod numerem LMG 26191^T i CFBP w Angers (Francja) pod numerem CFBP 7420^T.

Charakterystyka drugiej grupy szczepów określonych we wcześniejszych badaniach jako odmiennych od znanych gatunków została opisana w publikacji **Puławska i in. (w druku) (publikacja H5)**. Grupa ta obejmowała szczepy 0, 7/1 i 39/7 pochodzące z Węgier i wyizolowane w latach 70-tych ubiegłego wieku z guzów odpowiednio na winorośli, malinie i *Prunus cerasifera* oraz szczepy C3.4.1 and CP17.2.2 wyizolowane 4 lata temu w Polsce z guzów odpowiednio na podkładce Colt i czereśni ptasiej. Tylko szczep 0 posiada zdolność wywoływania guzów. Na podstawie analizy filogenetycznej opartej na sekwencji genu 16S rRNA stwierdzono, że wszystkie 5 izolatów tworzy jeden monofiletyczny klastery i wykazuje największe podobieństwo badanej sekwencji do gatunku *Rhizobium radiobacter* (99,1%). Analiza 5 genów metabolizmu podstawowego - *atpD*, *glnA*, *gyrB*, *recA* i *rpoB* potwierdziła odmienność badanych szczepów i ich najbliższe pokrewieństwo z *R. radiobacter*. Natomiast, analiza filogenetyczna w oparciu o sekwencję genu *recA* z uwzględnieniem dostępnych sekwencji szczepów należących do 9 gatunków genomowych w obrębie biowaru 1 (Portier i in., 2006, Costechareyre i in., 2010) wykazała, że badane szczepy należą do biowaru 1. Tworzą one jednak odrębny, nowy klastery. Jednocześnie stwierdzono, na podstawie analizy filogenetycznej opartej o sekwencje genów *recA* i *gyrB*, że niedawno opisany w Indiach gatunek *Rhizobium pusense* (Panday i in., 2011) należy do genomowaru G2, w związku z czym można uznać, że *R. pusense* jest kolejnym gatunkiem obejmującym bakterie patogeniczne dla roślin. Hybrydyzacja DNA-DNA szczepu 39/7 i szczepu typowego gatunku *R. radiobacter* LMG 140^T wykazała stopień homologii na poziomie 45%. Analiza kwasów tłuszczowych wykazała, że głównymi komponentami są 18:1 w7c, 16:0 i 16:0 3OH. Spośród ponad 170 analizowanych cech fenotypowych wybrano 12 odróżniających badane szczepy. Najbardziej charakterystyczne to: zdolność do utleniania laktozy do 3-ketolaktozy oraz brak zdolności do wzrostu i wytwarzania czerwono-brunatnego kożuszka na powierzchni pożywki zawierającej cytrynian żelazowo-amonowy. Analiza RAPD wykazała duże zróżnicowanie wśród 5 badanych szczepów. Dla każdego ze szczepów uzyskano unikalne wzory amplifikacji z 4 różnymi starterami.

Dla nowego gatunku zaproponowano nazwę *Rhizobium nepotum* nawiązując do pochodzenia geograficznego opisanych szczepów (Węgry i Polska) i wspólnej polsko – węgierskiej historii opisanej w znanym w obu krajach powiedzeniu „Polak, Węgier dwa

bratanki...” (bratanki – łac. *nepotes*). Szczep 39/7^T został wybrany jako szczep typowy gatunku i zdeponowany w dwóch międzynarodowych kolekcjach mikroorganizmów: LMG w Gandawie (Belgia) pod numerem LMG 26435^T i CFBP w Angers (Francja) pod numerem CFBP 7436^T.

Podsumowując, cykl 5 publikacji stanowiący moją rozprawę habilitacyjną obejmuje wyniki badań nad charakterystyką i zróżnicowaniem bakterii wywołujących guzowatość korzeni roślin. Stwierdzono, że są to głównie bakterie należące do biowaru 2 (czyli *Rhizobium rhizogenes*), jednak ich zróżnicowanie genetyczne, chociaż ocenione jako wysokie, nie jest związane z rośliną gospodarzem lub rejonem geograficznym, skąd pochodziły. Jednocześnie przeprowadzone badania pozwoliły na stwierdzenie występowania szczepów, których nie można było zaklasyfikować do żadnego ze znanych taksonów. Zaowocowało to opisaniem dwóch nowych gatunków zawierających bakterie wywołujące guzowatość korzeni: *Rhizobium skierniewicense* sp. nov i *Rhizobium nepotum* sp. nov.

Cytowana literatura

- Bouzar H., Jones J.B., 2001. *Agrobacterium larrymoorei* sp. nov., a pathogen isolated from aerial tumours of *Ficus benjamina*. International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology **51**: 1023-1026.
- Conn H.J., 1942. Validity of the genus *Alcaligenes*. Journal of Bacteriology **44**: 353-360
- Costechareyre, D., Rhouma, A., Lavire, C., Portier, P., Chapulliot, D., Bertolla, F., Boubaker, A., Dessaux, Y. and Nesme, X. (2010). Rapid and efficient identification of *Agrobacterium* species by *recA* allele analysis. Microbial Ecology **60(4)**: 862-872.
- De Cleene M., De Ley J., 1976. The host range of crown gall. The Botanical Review **42**: 390-466.
- Farrand S.K., van Berkum P.B., Oger P., 2003. *Agrobacterium* is a definable genus of the family *Rhizobiaceae*. International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology **53**: 1681-1687.
- Holmes B., 1988. Taxonomy of *Agrobacterium*. Acta Horticulturae **225**: 47-52.
- Holmes B., Roberts P., 1981. The classification, identification and nomenclature of agrobacteria. Journal of Applied Bacteriology **50**: 443-467.
- Holt J.G., Krieg N.R., Sneath P.H.A., Staley J.T., Williams S.T., Bergey's Manual of Determinative Bacteriology, ninth ed., Williams & Wilkins Comp., Baltimore, MD, USA, 1994.
- Kerr A., Manigault P., Tempé J., 1977. Transfer of virulence *in vivo* and *in vitro* in *Agrobacterium*. Nature **265**: 560-561.
- Kerr A., Panagopoulos C.G., 1977. Biotypes of *Agrobacterium radiobacter* var. *tumefaciens* and their biological control. Phytopathologische Zeitschrift **90**: 172-179.
- Lapage S.P., Sneath P.H.A., Lessel E.F., Skerman V.B.D., Seeliger H.P.R., Clark W.A.: International Code of Nomenclature of Bacteria (1990 Revision). American Society for Microbiology, Washington, D.C., 1992.
- Moore L.W., Kado C.I., Bouzar H., 1988. II Gram-negative bacteria A, *Agrobacterium*. In: Schaad N.W. (ed.) Laboratory Guide for Identification of Plant Pathogenic Bacteria, pp. 16-36. APS Press, St. Paul, MN, USA.
- Ophel K., Kerr A., 1990. *Agrobacterium vitis* sp. nov. for strains of *Agrobacterium* biovar 3 from grapevines. International Journal of Systematic Bacteriology **40**: 236-241.
- Panday, D., Schumann, P. and Das, S.K. 2011. *Rhizobium pusense* sp. nov., isolated from rhizosphere of chickpea (*Cicer arietinum* L). International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology **61**: 2632-2639
- Popoff M Y, Kersters K, Kiredjian M, Miras I and Coynault C 1984 Position taxonomique de souches de *Agrobacterium* d'origine hospitaliale re. Ann. Microbiol. (Inst. Pasteur) **135A**, 427-442

- Portier P., Fischer-Le Saux M., Mougel C., Lerondelle C., Chapulliot D., Thioulouse J., Nesme X., 2006. Identification of genomic species in *Agrobacterium* biovar 1 by AFLP genomic markers. *Applied and Environmental Microbiology* **72**: 7123-7131.
- Puławska J., Maes M., Willems A., Sobiczewski P., 2000. Phylogenetic analysis of 23S rRNA gene sequences of *Agrobacterium*, *Rhizobium* and *Sinorhizobium* strains. *Systematic and Applied Microbiology* **23**: 238-244.
- Puławska J., Willems A., Sobiczewski P., 2006. Rapid and specific identification of four *Agrobacterium* species and biovars using multiplex PCR. *Systematic and Applied Microbiology* **29**: 470-479.
- Sawada H., Ieki H., Oyaizu H., Matsumoto S., 1993. Proposal for rejection of *Agrobacterium tumefaciens* and revised description for the genus *Agrobacterium* and for *Agrobacterium radiobacter* and *Agrobacterium rhizogenes*. *International Journal of Systematic Bacteriology* **43**: 694-702.
- Süle S. 1978. Biotypes of *Agrobacterium tumefaciens* in Hungary. *Journal of Applied Bacteriology* **44**: 207-213
- Young J.M., Kuykendall L.D., Martinez-Romero E., Kerr A., Sawada H., 2001. A revision of *Rhizobium* Frank 1889, with an emended description of the genus, and the inclusion of all species of *Allorhizobium undicola* de Lajudie *et al.* 1998 as new combinations: *Rhizobium radiobacter*, *R. rhizogenes*, *R. rubi*, *R. undicola* and *R. vitis*. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology* **51**: 89-103.

5. Omówienie pozostałych osiągnięć naukowych

a. Zestawienie dorobku publikacyjnego przed i po uzyskaniu stopnia doktora

Rodzaj publikacji	Przed uzyskaniem stopnia doktora	Po uzyskaniu stopnia doktora	Ogółem
1. Oryginalne prace twórcze			
1.1. Czasopisma z IF* (z bazy JCR**)	3	12***	15
1.2. Czasopisma w języku kongresowym	-	8****	8
1.3. Czasopisma w języku polskim	1	6	7
2. Pozostałe publikacje naukowe			
2.1. Prace przeglądowe			
2.1.1. Czasopisma z IF* (z bazy JCR**)		2****	2
2.1.2. Czasopisma w języku kongresowym		1	1
2.1.3. Czasopisma w języku polskim	1	6	7
2.2. Prace konferencyjne:			
2.2.1. Opublikowane w materiałach z konferencji międzynarodowych	4	26	30
2.2.2. Opublikowane w materiałach z konferencji krajowych	12	25	37
2.3. Artykuły popularnonaukowe	1	2	3
2.4. Książki i skrypty	2		2
3. Doniesienia konferencyjne			
3.1. Referaty wygłoszone na konferencjach			
3.1.1. międzynarodowych		7	7
3.1.2. krajowych	5	9	14
3.2. Plakaty prezentowane na konferencjach			
3.2.1. międzynarodowych	3	11	14
3.2.2. krajowych	5	7	12
OGÓŁEM	37	122	159

* IF – Impact Factor; ** JCR – Journal Citation Report; *** W tym 3 wchodzące w skład rozprawy habilitacyjnej, **** W tym jedna wchodząca w skład rozprawy habilitacyjnej

b. Sumaryczny wskaźnik Impact Factor (IF) - **31,069²**

w tym przed uzyskanie stopnia doktora – **2,974**

c. Sumaryczna liczba punktów wg MNiSW - **544³ + X⁴**

w tym przed uzyskanie stopnia doktora – **75**

d. Sumaryczna liczba cytowań wg Web of Science – **56**

e. Index Hirscha wg Web of Science - **4**

f. **Udział i rola w projektach badawczych krajowych i zagranicznych**

1995-1998: wykonawca w projekcie badawczym KBN nr 04708: - „Wykorzystanie antagonistycznych bakterii do biologicznej ochrony jabłek przed szarą pleśnią i mokrą zgnilizną w czasie przechowywania” projekt realizowany w Instytucie Sadownictwa i Kwiaciarnictwa w Skierniewicach;

1997-1999: wykonawca w ramach współpracy naukowo – badawcza na podstawie umowy bilateralnej między Research Station for Plant Pathology w Merelbeke (Belgia) a Instytutem Sadownictwa i Kwiaciarnictwa w Skierniewicach „Wykrywanie *Agrobacterium tumefaciens* (sprawcy guzowatości korzeni)”

1998-2000: wykonawca w projekcie Głównego Inspektoratu Ochrony Roślin Ministerstwa Rolnictwa „Prognozowanie występowania zarazy ogniowej (*E. amylovora*)” projekt realizowany w Instytucie Sadownictwa i Kwiaciarnictwa w Skierniewicach;

2000-2001: główny wykonawca w projekcie badawczym KBN nr 5P06A 02119 – grant promotorski: „Molekularne podstawy wykrywania i identyfikacji *Agrobacterium* spp.” projekt realizowany w Instytucie Sadownictwa i Kwiaciarnictwa w Skierniewicach;

2003-2005: wykonawca w projekcie 5 PR UE " Research Centre of Excellence in Sustainable Pomology " - Akronim PomoCentre (kontrakt nr QLK1-CT-2002-30402);

2002-2005: kierownik projektu w ramach akcji COST 853 580/E-177/SPB/COST/P-06/DZ447/2002-2005: “Opracowanie metody identyfikacji i rozróżniania bakteryjnych sprawców

² Zgodnie z rokiem publikacji. W przypadku publikacji z lat 2011, 2012 dla których IF nie został obliczony podawano 5-o letni IF dla danego czasopisma

³ Zgodnie z punktacją MNiSW z 2010r

⁴ Punkty za publikację w czasopiśmie PLoS ONE (IF = 4.610), które nie jest umieszczone na liście MNiSW. Zostało zgłoszone do MNiSW w styczniu 2012.

chorób roślin sadowniczych z zastosowaniem markerów DNA” projekt realizowany w Instytucie Sadownictwa i Kwiaciarnictwa w Skierniewicach;

- 2003-2006:** **wykonawca** projektu KBN: „Wpływ czynników agrotechnicznych na wzrost, kwitnienie, trwałość kwiatostanów oraz podatność na miękką zgniliznę podczas uprawy kolorowej cantedeskii na kwiat cięty” ; Umowa nr. 072/P06/2003/25; projekt realizowany w Instytucie Sadownictwa i Kwiaciarnictwa w Skierniewicach;
- 2005-2008:** **wykonawca** projektu badawczego zamawianego PBZ-KBN-112/P06/2005 pt. „Mikroorganizmy i związki naturalnego pochodzenia potencjalnie przydatne w uprawie roślin oraz mechanizmy ich działania”; projekt realizowany w Instytucie Sadownictwa i Kwiaciarnictwa w Skierniewicach
- 2006-2009:** **wykonawca** projekt nr COST/89/2006 pt. „Reakcje obronne jabłoni przeciwko zarazie ogniowej (*Erwinia amylovora*) po zastosowaniu elicytorów pochodzenia naturalnego”; projekt realizowany w Instytucie Sadownictwa i Kwiaciarnictwa w Skierniewicach
- 2007-2011:** **kierownik** projektu międzynarodowego niewspółfinansowanego nr 118/N-COST/2008/0 pt. „Fenotypowa i genotypowa charakterystyka sprawców bakteryjnych chorób owocowych drzew pestkowych, leszczyny i orzecha włoskiego” projekt realizowany w Instytucie Sadownictwa i Kwiaciarnictwa (od 01.01.2011 Instytut Ogrodnictwa) w Skierniewicach
- 2008-2014:** **kierownik** zadania pt.: „Diagnostyka oraz zmienność populacyjna bakterii (*Erwinia amylovora*), sprawcy zarazy ogniowej” realizowanego w ramach Programu Wieloletniego finansowanego przez Ministerstwo Rolnictwa i Rozwoju Wsi pt.: „Rozwój zrównoważonych metod produkcji ogrodnictwa w celu zapewnienia wysokiej jakości biologicznej i odżywczej produktów ogrodnictwa oraz zachowania bioróżnorodności środowiska”; projekt realizowany w Instytucie Sadownictwa i Kwiaciarnictwa (od 01.01.2011 Instytut Ogrodnictwa) w Skierniewicach;
- 2010-2011:** **wykonawca** zadania pt.: „Opracowanie metodyk prowadzenia obserwacji występowania organizmów szkodliwych i oceny potrzeby wykonania zabiegów ochrony roślin” realizowanego w ramach Programu Wieloletniego finansowanego przez Ministerstwo Rolnictwa i Rozwoju Wsi pt.: „Rozwój zrównoważonych metod produkcji ogrodnictwa w celu zapewnienia wysokiej jakości biologicznej i odżywczej produktów ogrodnictwa oraz zachowania bioróżnorodności środowiska”; projekt realizowany w Instytucie Sadownictwa i Kwiaciarnictwa (od 01.01.2011 Instytut Ogrodnictwa) w Skierniewicach;
- 2011-2014:** **wykonawca** zadania pt.: „Prowadzenie kolekcji wirusów i patogenów wirusopodobnych roślin sadowniczych i ozdobnych” realizowanego w ramach Programu Wieloletniego finansowanego przez Ministerstwo Rolnictwa i Rozwoju Wsi pt.: „Rozwój zrównoważonych metod produkcji ogrodnictwa w celu zapewnienia wysokiej jakości biologicznej i odżywczej produktów ogrodnictwa oraz zachowania bioróżnorodności środowiska”; projekt realizowany w Instytucie Ogrodnictwa w Skierniewicach;
- 2011-2014:** **główny wykonawca** w projekcie NCN nr 2011/01/B/NZ9/01750 pt. „Występowanie, wykrywanie i charakterystyka wirusów, fitoplazm i bakterii porażających orzech włoski i leszczynę w Polsce” projekt realizowany w Instytucie Ogrodnictwa w Skierniewicach;

g. międzynarodowe lub krajowe nagrody za działalność naukową

- Stypendium Ministra Edukacji Narodowej – rok akademicki 1994/1995, Warszawa 1.10.1994
- Nagroda Politechniki Gdańskiej za dyplom magisterski 1995
- Stypendium krajowe Fundacji na Rzecz Nauki Polskiej na rok 2001
- Nagroda Dyrektora Instytut Sadownictwa i Kwiaciarstwa w Skierniewicach za pracę doktorską , 2001
- Stypendium krajowe Fundacji na Rzecz Nauki Polskiej na rok 2002
- Nagroda Towarzystwa Przyjaciół Instytutu Sadownictwa i Kwiaciarstwa, 2002
- Nagroda Prezydium Oddziału PAN w Łodzi i Konferencji Rektorów Państwowych Wyższych Uczelni m. Łodzi za rok 2002 w dziedzinie nauk biologiczno – medycznych.
- Medal Międzynarodowego Towarzystwa Nauk Ogrodniczych (ISHS) za organizację XII Międzynarodowej Konferencji nt. Zarazy Ogniewej (XII International Workshop on Fire Blight)

h. wygłoszenie referatów na międzynarodowych lub krajowych konferencjach tematycznych

1. **Puławska J.** „Wykorzystanie metod biologii molekularnej w diagnostyce bakterioz roślinnych.” I Konferencja Grupy Roboczej Bakteryjnych Chorób Roślin KOR PAN, Skierniewice 9.12.1997.
2. Berczyński S., **J. Puławska.** „Niektóre aspekty ekologii *Agrobacterium tumefaciens* - sprawcy guzowatości korzeni.” I Konferencja Grupy Roboczej Bakteryjnych Chorób Roślin KOR PAN, Skierniewice 9.12.1998.
3. **Puławska J.** „Systematyka *Agrobacterium* – molekularne podstawy rozróżniania gatunków.” III Konferencja Grupy Roboczej Bakteryjnych Chorób Roślin KOR PAN, Skierniewice 12.12.2000.
4. **Puławska J.**, E. Łojkowska „Sprawozdanie z X Międzynarodowej Konferencji nt. Bakterii Chorobotwórczych dla Roślin 24-27.07.2000, Charlottetown, Kanada.” III Konferencja Grupy Roboczej Bakteryjnych Chorób Roślin KOR PAN, Skierniewice 12.12.2000.
5. **Puławska J.**, P. Sobiczewski „Nowa metoda wykrywania *Agrobacterium tumefaciens* w glebie z zastosowaniem techniki PCR – możliwości wykorzystania w praktyce szkółkarskiej.” Ogólnopolska Naukowa Konferencja Ochrony Roślin Sadowniczych, Skierniewice 22-23 .02. 2001
6. Sobiczewski P., **J. Puławska** „Główne kierunki badań nad zarazą ogniową (*Erwinia amylovora*) w Polsce i w świecie.” Ogólnopolska Konferencja Ochrony Roślin Sadowniczych. Skierniewice, 20-21.02. 2002
7. **Puławska J.** „Nowe technologie w diagnostyce chorób roślin.” Ogólnopolska Konferencja Ochrony Roślin Sadowniczych. Skierniewice, 26-27.02.2003
8. **Puławska J.** „Perspektywy zastosowania nowoczesnych technik w diagnostyce chorób roślin sadowniczych.” Ogólnopolska Konferencja Ochrony Roślin Sadowniczych. Skierniewice.25-26.02.2004

9. **Puławska J.**, M. Sulikowska, P. Sobiczewski. „Genetic diversity of *Agrobacterium* strains determined by RAPD and *gyrB* gene sequence analysis” 11th International Conference on Plant Pathogenic Bacteria, Edinburgh, United Kingdom 10-14.07.2006.
10. **Puławska J.**, P. Sobiczewski. “Detection and identification of tumorigenic agrobacteria using PCR-based methods.” Workshop “Diagnostic and monitoring of bacterial diseases of stone fruits and nuts”, Angers, France, 17-19 April, 2007.
11. **Puławska J.**, P. Sobiczewski, M. Sulikowska „Research on *Pseudomonas syringae* – pathogen of stone fruit trees in Poland – the past and the future.” STF Meeting on "Determination of the incidence of the different pathovars of *Pseudomonas syringae* in stone fruits" COST Action 873 "Bacterial diseases of stone fruits and nuts" Skierniewice, 27-28 March, 2008.
12. **Puławska J.**, A. Mikiciński “Efficacy and possible mode of action of bacteria isolated from soil and apple leaves against *Erwinia amylovora*.” WG1/WG3 Joint Meeting COST 864. Izmir, Turkey, May 14-16, 2008.
13. **Puławska J.** “Plasmid profiles of *Erwinia amylovora* isolates originating from Poland.” WG 1-4 Meeting COST 864. IVIA – Valencia, Spain, 3-5.07. 2009.
14. **Puławska J.**, M. Kałużna, A. Kołodziejska, P. Sobiczewski. „Bakteryjna zgorzel leszczyny – nowa groźna choroba w Polsce.” 53 Ogólnopolska Konferencja Ochrony Roślin Sadowniczych. Skierniewice.25-26.02.2010
15. **Puławska J.**, P. Sobiczewski, S. Berczyński, M. Lewandowski „Diversity in *Erwinia amylovora* virulence.” 12th International Workshop on Fire Blight, 16-20.08.2010, Warszawa, Polska
16. **Puławska J.** “Economic significance of crown gall and the diversity of its causal agent - screening of Polish stone fruits nurseries.” Annual meeting of Working Groups 1,2,3 and 4 COST 873. Jurmala, Latvia, 13-15.09.2010
17. **Puławska J.**, M. Kałużna, A. Kołodziejska, P. Sobiczewski „*Xanthomonas arboricola* pv. *corylina* – sprawca bakteryjnej zgorzeli leszczyny – nowy patogen w Polsce.” II Konferencja Naukowa „Nowe patogeny i choroby roślin” Skierniewice, 13-14.04.2010
18. **Puławska J.**, A. Mikiciński, L.B. Orlikowski „*Acidovorax cattleyae* – sprawca bakteryjnej brązowej plamistości *Phalenopsis* w Polsce.” II Konferencja Naukowa „Nowe patogeny i choroby roślin” Skierniewice, 13-14.04.2010
19. **Puławska J.**, P. Sobiczewski „Zagrożenie roślin sadowniczych guzowatością korzeni i możliwości ograniczania choroby.” 54 Ogólnopolska Konferencja Ochrony Roślin Sadowniczych. Ossa 23-24.02.2011
20. **Puławska J.**, A. Mikiciński, P. Sobiczewski „Zróźnicowanie wirulencji *Erwinia amylovora* – jaka jest rola plazmidów?” Sympozjum Naukowe „Fitopatologia: zdrowe rośliny – zdrowi ludzie”. Bydgoszcz, 20-22.09.2011
21. **Puławska J.**, A. Willems, S. Süle, P. Sobiczewski „*Rhizobium skierniewicense* i *Rhizobium nepotum* – nowe gatunki bakterii wywołujących guzowatość korzeni.” Sympozjum Naukowe „Fitopatologia: zdrowe rośliny – zdrowi ludzie”. Bydgoszcz, 20-22.09.2011

6. Przebieg pracy naukowej

Działalność badawczą rozpoczęłam w roku 1992, na trzecim roku studiów na kierunku biotechnologia Wydziału Chemicznego Politechniki Gdańskiej. W ramach indywidualnego toku studiów brałam udział w pracach badawczych Katedry Mikrobiologii PG kierowanych przez prof. dr hab. Józefa Kura. Uczestniczyłam w badaniach nad wpływem histono-podobnego białka IHF (ang. Integration Host Factor) *Escherichia coli*, na transkrypcje startera (RNAII) inicjacji replikacji plazmidu zawierającego *ori* p15A. Pracę magisterską obroniłam 13 czerwca 1995 roku z wynikiem celującym.

W roku 1995 rozpoczęłam pracę w Pracowni Fitopatologii, Zakładu Ochrony Roślin Instytutu Sadownictwa i Kwiaciarstwa w Skierniewicach pod kierunkiem prof. dr hab. Piotra Sobiczewskiego. Prowadzone przeze mnie badania dotyczyły różnych aspektów bakteryjnych chorób roślin sadowniczych i ozdobnych, począwszy od ich etiologii poprzez opracowanie metod identyfikacji i wykrywania ich czynników sprawczych, analizy zróżnicowania fenotypowego i genetycznego bakteryjnych patogenów roślin aż do ich filogenezy i taksonomii.

Pierwszym zagadnieniem, nad którym pracowałam była analiza składu DNA plazmidowego szczepów tumorogennych *Agrobacterium* wyizolowanych z guzów na drzewach owocowych pochodzących z różnych rejonów geograficznych Polski. Celem tych badań było określenie zróżnicowania zawartości DNA plazmidowego – liczby plazmidów i ich wielkości a następnie porównanie uzyskanych wyników z wybranymi cechami fenotypowymi (**publikacja nr 2 w wykazie publikacji**).

Jednym z ważniejszych problemów studiowanych w trakcie moich badań było opracowanie metody wykrywania tumorogennych bakterii z rodzaju *Agrobacterium* w glebie. Z praktycznego punktu widzenia, sprawą o zasadniczym znaczeniu jest określenie czy gleba przeznaczona pod uprawy jest wolna od tego patogena. W ramach prowadzonych badań opracowałam metodę z zastosowaniem techniki półzagnieżdżonej PCR (ang. semi-nested PCR). Badania obejmowały zaprojektowanie starterów oraz sprawdzenie ich specyficzności i czułości. Opracowano również metodę izolacji i oczyszczania DNA bakteryjnego dzięki czemu możliwe jest wykrycie nawet jednej komórki tumorogennych *Agrobacterium* w gramie gleby. Dotychczas nikomu na świecie nie udało się opracować tak czułego systemu wykrywania patogena. Uzyskane wyniki wskazują, że metoda może być bardzo pomocna przy określeniu skażenia pola przeznaczonego pod uprawy szkółkarskie drzew owocowych i roślin ozdobnych (**6,7**). Kolejnym zagadnieniem, którym zajmuję się w mojej pracy badawczej - tym razem o charakterze podstawowym jest analiza filogenetyczna bakterii należących do różnych biowarów i gatunków rodzaju *Agrobacterium* oraz spokrewnionych z nimi bakterii z rodzajów *Rhizobium* i *Sinorhizobium*. Przeprowadzone badania w oparciu o analizę sekwencji genu 23S rRNA wykazały, że różne gatunki wymienionych rodzajów są blisko spokrewnione i filogenetycznie wymieszane. Stwierdzono również, że obecny podział *Agrobacterium* na biowary jest

najprawdopodobniej odzwierciedleniem rzeczywistych filogenetycznych związków między tymi taksonami. Dotychczas nigdzie nie prowadzono badań porównawczych dla wymienionej grupy bakterii w oparciu o analizę sekwencji genu 23S rRNA (4).

Następny problem, którym zajmowałam się, to opracowanie systemu umożliwiającego szybkie i zgodne z zasadami taksonomii rozróżnienie bakterii z rodzaju *Agrobacterium*. Istniejąca metoda rozróżniania gatunków i biowarów bakterii z tego rodzaju wymaga przeprowadzenia co najmniej kilkunastu czasochłonnych testów biochemicznych, których wyniki są często trudne do interpretacji. Na podstawie wcześniej uzyskanych sekwencji genu kodującego 23S rRNA bakterii rodziny Rhizobiaceae opracowałam system identyfikacji *Agrobacterium* spp. z zastosowaniem techniki multiplex PCR. Metoda ta wykorzystuje amplifikację z jednoczesnym użyciem 5 starterów – jednego uniwersalnego i czterech specyficznych dla różnych taksonów w obrębie rodzaju *Agrobacterium*: biowaru 1, biowaru 2, *A. vitis* i *A. rubi* (9). Prace nt. wykrywania tumorogennych *Agrobacterium* w glebie, filogenezy i metody identyfikacji taksonów w obrębie rodzaju *Agrobacterium* opartej na sekwencji genu 23S rRNA były tematem mojej pracy doktorskiej.

Jednym z ważniejszych problemów, których rozwiązania podjęłam się w trakcie moich badań, było opracowanie metody wykrywania i identyfikacji bakterii *Erwinia amylovora* – sprawcy zarazy ogniowej, organizmu kwarantannowego w materiale rozmnożeniowym określonych roślin żywicielskich i podlegającego obowiązkowi zwalczania. Dzięki zastosowaniu w tej metodzie techniki łańcuchowej reakcji polimerazy (PCR), wykorzystaniu bardzo specyficznych starterów komplementarnych do genu 23S rRNA oraz specjalnego oczyszczania DNA bakteryjnego na kolumnach, możliwe jest uzyskanie wyniku analizy w ciągu 8 godzin. Bardzo istotna jest czułość metody, którą szacuje się na 200 komórek bakterii w badanej próbce. Metoda ta została wdrożona do praktyki diagnostycznej w Centralnym Laboratorium Państwowej Inspekcji Ochrony Roślin i Nasiennictwa w Toruniu. Ponadto jest ona wykorzystywana w badaniach naukowych m.in. nad prognozowaniem występowania zarazy ogniowej pod kątem oceny przeżywania patogena w porażonych tkankach jako potencjalnym źródle zakażeń pierwotnych (33, 34, 35).

Kolejne moje badania dotyczyły problemów związanych z występowaniem, rozwojem i rozprzestrzenianiem się zarazy ogniowej w Polsce. W ramach badań określono zależność między patogenem a rośliną-gospodarzem i klimatem - zwłaszcza wpływem temperatury i wilgotności na przeżywalność i rozmnażanie się bakterii *Erwinia amylovora* – sprawcy choroby. O powstawaniu nowych ognisk zarazy ogniowej wiosną decyduje występowanie źródła infekcji – bakterie przetrzymują głównie w zgorzelach i nekrozach jakie rozwinęły się na różnych organach nadziemnej części roślin wskutek ich infekcji w ubiegłym sezonie. Dzięki zastosowaniu opracowanej w badaniach własnych metody wykrywania *E. amylovora* z zastosowaniem PCR stwierdzono, że nawet ponad 50%

zgorzeli na pędach jabłoni uznanych na podstawie konwencjonalnej analizy mikrobiologicznej jako wolne od sprawcy choroby, była faktycznie zasiedlona tymi bakteriami. Jednak liczebność ich populacji była na tyle niska, że nie można było jej wykryć metodami mikrobiologii klasycznej. Stwierdzenie to ma duże znaczenie praktyczne bowiem nawet niewielki potencjał inokulacyjny w sadzie czy szkółce może zapoczątkować chorobę, która następnie może przybrać rozmiary epidemii (11, 34, 35). Innym aspektem badań nad *Erwinia amylovora* było określenie zróżnicowania genetycznego szczepów tego gatunku. Stwierdzono, że jest to gatunek bardzo homogeny, a szczepy izolowane w naszym kraju z różnych roślin gospodarzy, w różnych rejonach geograficznych i różnych latach są niemal identyczne pod względem cech fenotypowych i genetycznych, jednak istotnie różnią się wirulencją (40). Ciekawym odkryciem był nowy plazmid u *E. amylovora*, dla którego określono sekwencję i potencjalny wpływ na wirulencję patogena. Stwierdzono, że występował on u ok. 7% testowanych szczepów pochodzących z naszego kraju (26).

W toku mojej pracy naukowej prowadziłam również badania nad występowaniem nowych bakteryjnych patogenów roślinnych w naszym kraju. Jako pierwsi stwierdziliśmy występowanie: *Xanthomonas axonopodis* pv. *dieffenbachiae* na anturium (14), *Paenibacillus polymyxa* - sprawcy bakteryjnej miękkiej zgnilizny cantedeskii (16), *Xanthomonas arboricola* pv. *corylina* – sprawcy bakteryjnej zgorzeli leszczyny (19), *Acidovorax cattleyae* – sprawcy bakteryjnej brązowej plamistości *Phalenopsis* (21), *Xanthomonas arboricola* pv. *juglandis* – sprawcy bakteryjnej zgorzeli orzecha włoskiego (20). Brałam również udział w badaniach nad zróżnicowaniem genetycznym patogenów: *Clavibacter michiganensis* subsp. *michiganensis* (10), *Pseudomonas syringae* pv. *tomato* (12), *Pseudomonas syringae* pv. *syringae* pv. *morsprunorum* (17); badaniach nad wykrywaniem i identyfikacją: *Agrobacterium* na malinach i winorośli w Serbii (13, 28), *Xanthomonas hortorum* pv. *pelargonii* na pelargonii (24) a także nad uwalnianiem kultur *in vitro* roślin sadowniczych i ozdobnych od zakażeń bakteryjnych (3, 8). Oprócz prac związanych z bakteriami fitopatogenicznymi uczestniczyłam także w innych projektach badawczych jak wykrywanie i identyfikacja fitoplazm w roślinach ozdobnych (1).

Obecnie kontynuuję badania nad różnorodnością szczepów wywołujących guzowatość na drzewach i krzewach owocowych, a także nad charakterystyką innych bakteryjnych patogenów roślin. Jednym z zagadnień, nad którym pracuję jest analiza czynników wirulencji, w tym również kodowanych na plazmidach, u bakterii *E. amylovora*.

Świętokrzyskie 02.05.2012

J. Piórkowa