

Ryzosfera, czyli strefa przykorzeniowa roślin (zewnątrzna warstwa komórek korzeni wraz z wydzielinami korzeniowymi, glebą bezpośrednio przylegającą do korzeni i zamieszkującymi ją (mikro)organizmami) w przeciwieństwie do gleby pozbawionej wpływu korzeni roślin, jest środowiskiem wysokiej aktywności mikroorganizmów. W środowisku tym mikroorganizmy konkurują o substancje odżywcze i niszę ekologiczną, kształtując swoisty „rynek”, gdzie „kupującymi” i „sprzedającymi” są mikroorganizmy (pożyteczne lub patogenne bakterie, grzyby, wirusy czy pierwotniaki) oraz ich gospodarze (rośliny). Ta mikrobiologiczna „giełda” podlega zjawiskom „hossy” i „bessy”, zależnym od składu i dostępności substancji odżywczych, metabolitów wtórnych i cząsteczek sygnalizacyjnych przedostających się do danego środowiska. Efektami jej funkcjonowania są m.in.: skład gatunkowy mikroorganizmów kolonizujących dane środowisko oraz modulowanie odporności gospodarza. Szereg bakterii produkuje metabolity wtórne o charakterze przeciwdrobnoustrojowym. Substancje te mogą korzystnie wpływać na roślinę, ale przede wszystkim pozwalają bakteriom przeżyć w środowisku ryzosfery w warunkach wysokiego współzawodnictwa. Bakterie z rodzaju *Pseudomonas* zasiedlające zróżnicowane środowiska (wodę, glebę i organy roślin), posiadają dużą plastyczność adaptacyjną i zdolność do konkutowania w środowisku. Szereg szczepów bakterii z tego rodzaju cechuje się zdolnością do promowania wzrostu roślin oraz hamowania rozwoju i rozprzestrzeniania się fitopatogenów. Są to tzw. bakterie promujące wzrost roślin (ang. *plant growth promoting (rhizo)bacteria*, PGPR)

Szczep P482 należy do mało poznanego gatunku *P. donghuensis*, opisanego w 2014r. Szczep ten wydaje się być szczególnie interesujący, ze względu na to, że produkuje czynnik przeciwdrobnoustrojowy nieopisane wcześniej u innych szczepów bakterii z rodzaju *Pseudomonas*. Ponadto, wykazuje cechy szczepu zdolnego do promocji wzrostu i ochrony rośliny przed chorobotwórczymi dla nich bakteriami i grzybami. Szczep P482 chroni tkankę roślin przed aktywnością bakterii chorobotwórczych oraz kolonizuje korzenie roślin pomidora, kukurydzy i ziemniaka. Nasze badania pozwoliły określić podłoże genetyczne szczepu P482 istotne dla produkcji czynnika o aktywności przeciwdrobnoustrojowej. Geny odpowiedzialne za syntezę tego czynnika w szczepie P482 znajdują się pośród 800 genów unikalnych dla tego szczepu. Co więcej, wykazały, że produkcja tego czynnika zależna jest od dostępności substancji odżywczych oraz jonów żelaza. Można przypuszczać, że w środowisku ryzosfery dochodzi do specyficznego włączania genów odpowiedzialnych za produkcję metabolitów o aktywności przeciwdrobnoustrojowej w szczepie P482, a także genów warunkujących przeżywalność i adaptację tych bakterii do środowiska ryzosfery. Jednocześnie włączanie tych genów może zależeć od rodzaju substancji wydzielanych przez korzenie roślin oraz cząsteczek sygnałowych i metabolitów wydzielanych przez mikroorganizmy bytujące w ryzosferze badanych roślin. Dlatego celem proponowanych badań jest identyfikacja i analiza molekularnych mechanizmów istotnych dla wzajemnego oddziaływania szczepu P482 z korzeniami roślin: jednoliściennej - kukurydzy i dwuliściennej - pomidora.

W proponowanych badaniach zastosujemy nowoczesne podejście badawcze oparte o techniki molekularne: i) technikę RNA-seq polegającą na poznanie transkryptu genów ulegających globalnej i specyficznej ekspresji (włączeniu) w szczepie *P. donghuensis* P482, w zależności od składu wydzielin korzeniowych, ii) technikę IVET – *in vivo* expression technology - opartą na „wylapywaniu” i identyfikacji genów szczepu P482 specyficznie włączanych w danym środowisku – ryzosferze badanych roślin, pod wpływem zarówno wydzielin korzeni, jak i mikroorganizmów obecnych w tym środowisku, oraz iii) technikę mikromacierzy pozwalającą na analizę genów kukurydzy i pomidora, uruchomianych w odpowiedzi na obecność szczepu P482 w ryzosferze tych roślin. W projekcie wykorzystane zostaną także analizy ekologiczne mające na celu: a) określenie dynamiki populacji szczepu P482 oraz jego mutantu negatywnego w genie *gacA* (gen *gacA* koduje białko regulatorowe istotne dla syntezy metabolitów wtórnych) w ryzosferze badanych roślin oraz b) określenie wpływu szczepu P482 i mutantu *gacA* na promocję wzrostu i witalność roślin. Badania przeżywalności szczepu P482 i mutantu *gacA* w ryzosferze oraz efektywność kolonizacji roślin prowadzone będą z wykorzystaniem wariantu szczepu P482 wyznakowanego białkiem zielonej fluorescencji (GFP). Pozwoli to na obserwacje mikroskopowe skuteczności kolonizacji. Zdolność szczepu P482 i jego mutantu *gacA* do promocji wzrostu roślin kukurydzy i pomidora będzie odzwierciedlona przez zwiększenie masy i długości korzeni, liczby ich rozgałęzień oraz przyrost długości łodyg.

Proponowane badania mają charakter badań podstawowych i nie mają na celu osiągnięcia wymiernych korzyści ekonomicznych, jednak uzyskane wyniki mogą mieć istotne znaczenie w późniejszych projektach o charakterze aplikacyjnym. Poszerzenie wiedzy dotyczącej aktywności przeciwdrobnoustrojowej szczepu P482 w środowisku ryzosfery odmiennych gatunków roślin, daje możliwość podjęcia kolejnych badań nad opracowaniem strategii kontroli bakteryjnych i grzybowych patogenów roślin. Biorąc pod uwagę konieczność poszukiwania nowych, przyjaznych środowisku metod zwalczania patogenów roślin niniejszy projekt wpisuje się w myśl strategii Komisji Europejskiej, dotyczącej zmniejszenia użycia środków chemicznych do ochrony roślin.