

VYUŽITÍ BAKTERIOFÁGŮ PŘI OCHRANĚ BRAMBORU PROTI BAKTERIÍM RODU *DICKEYA*

The use of bacteriophages in the protection of potatoes against bacteria of the genus *Dickeya*

Kmoch M.¹, Petrzik K.², Brázdová S.², Kopačka V.³, Vacek J.¹, Ševčík R.⁴

¹Výzkumný ústav bramborářský Havlíčkův Brod, s.r.o.; Laboratoř virologie

²Biologické centrum AV ČR, v. v. i.; Ústav molekulární biologie rostlin (ÚMBR)

³Veselá Velhartice, a. s.

⁴Vysoká škola chemicko-technologická v Praze (VŠCHT); Ústav konzervace potravin

Abstrakt

Bakterie z čeledi *Enterobacteriaceae*, do kterých patří rody *Pectobacterium* a *Dickeya*, způsobují hospodářsky významné ztráty na výnosu a kvalitě produkce brambor. Cílem práce bylo ověření účinnosti izolovaných lytických bakteriofágů ϕ Ds3CZ a ϕ Ds20CZ na bakterii *Dickeya solani* pomocí laboratorních testů na plátcích hlíz bramboru. Směs fágů účinně potlačovala symptomy měkké hniloby hlíz bramboru vyvolané bakterií *D. solani*. Mezi ošetřenou a neošetřenou variantou byly zaznamenány statisticky průkazné rozdíly v infekci hlíz. Aplikace směsi fágů vedla ke snížení vývoje symptomů choroby v průměru o 47,5 %. Účinnost fágů je nutné ještě ověřit v poloprovozních a provozních podmínkách. V případě dostatečné účinnosti lze bakteriofágy využít v ekologické produkci brambor jako ochranu proti bakteriím, která je šetrná k životnímu prostředí a bezpečná pro spotřebitele.

Klíčová slova: *Dickeya* spp.; měkká hniloba bramboru; hlízy; bakteriofágy; biologická ochrana.

Abstract

Bacteria from the family *Enterobacteriaceae*, which include the genera *Pectobacterium* and *Dickeya*, cause economically significant losses in the yield and quality of potato production. The aim of the work was to verify the effectiveness of isolated lytic bacteriophages ϕ Ds3CZ and ϕ Ds20CZ on the bacterium *Dickeya solani* using laboratory tests on potato tuber slices. The phage mixture effectively suppressed the symptoms of soft rot of potato tubers caused by *D. solani*. Statistically significant differences were noted between the treated and untreated variants. Application of the phage mixture reduced the development of disease symptoms on average 47.5 %. Efficacy of phage must still be verified in pilot and operational conditions. If sufficiently effective, bacteriophages can be used in organic potato production as protection against bacteria that is environmentally friendly and safe for consumers.

Key words: *Dickeya* spp.; Potato soft rot; Tubers; Bacteriophages; Biocontrol.

Úvod

Druhy rodu *Dickeya* (dříve *Erwinia chrysanthemi*) jsou patogenní gramnegativní fakultativně anaerobní bakterie rostlin z čeledi *Enterobacteriaceae*. Způsobují měkkou hnilobou u širokého spektra hospodářsky významných plodin (brambory, rajčata, mrkev, cibule, ananas, kukuřice, rýže aj.) a okrasných rostlin (hyacint, chryzantéma, kala aj.) po celém světě (Perombelon *et al.* 1980; Czajkowski *et al.*, 2011; Toth *et al.*, 2011; Adriaenssens *et al.*, 2012). Produkují charakteristické enzymy, které jsou příčinou degradace buněčné stěny rostlin projevující se macerací pletiv (Czajkowski *et al.*, 2011; Adriaenssens *et al.*, 2012). Mohou se šířit infikovanými rostlinami na velké vzdálenosti a jsou schopny žít jako epifyté nebo fakultativní saprophyté v půdě a podzemní vodě (Reverchon *et al.* 2013). Byly detekovány v různých

vodních zdrojích a závlahové vodě (Toth *et al.*, 2011). Rod *Dickeya* zahrnuje osm druhů, tj. *Dickeya zeae*, *D. dadantii*, *D. chrysanthemi*, *D. solani*, *D. aquatica*, *D. dianthicola*, *D. paradisiaca* a *D. fangzhongdai* (Samson *et al.*, 2005; Toth *et al.*, 2011; Adriaenssens *et al.*, 2012; Tian *et al.*, 2016).

V současné době neexistují žádné účinné chemické látky k potlačování infekce *Dickeya* spp., což způsobuje značné ekonomické ztráty, zejména pokud jde o produkci brambor (Adriaenssens *et al.*, 2012; Czajkowski *et al.*, 2014). Použití bakteriofágů je atraktivní možností biologické ochrany rostlin (Jones *et al.*, 2007; Adriaenssens *et al.*, 2012; Buttner *et al.*, 2017). Bakteriofágy (fágy) jsou viry, které infikují bakteriální buňky. Byly popsány poprvé na počátku 20. století (Abedon, 2008). Jsou velmi rozšířené v biosféře. Přirozeně se vyskytují např. v půdě, vodě, rostlinách a zvířatech, kde mohou přetrvávat po dlouhou dobu prostřednictvím autoreplikace závislé na hostiteli. Jsou přítomny všude, kde přežívají hostitelské druhy bakterií (Marsh *et al.*, 1994; Jones *et al.*, 2007). Bakteriofágy se skládají z jednovláknových nebo dvouvláknových, lineárních nebo kruhových molekul DNA nebo RNA, které se nachází uvnitř proteinového nebo lipoproteinového obalu (kapsida). Některé fágy mohou tvořit složité morfologické struktury, které usnadňují jejich interakci s bakteriálním hostitelem nebo slouží k přenosu genetického materiálu do hostitelských buněk (Bradley, 1965). Bakteriofágy obvykle vykazují vysokou specifitu k bakteriálním hostitelům. Jejich použití proti bakteriím je zcela bezpečné, protože nemohou infikovat eukaryotické buňky. Pro biologickou ochranu rostlin je možno použít pouze tzv. lytické bakteriofágy, které na konci infekce bakteriální buňku lyzují. Lze je relativně snadno a levně produkovat (Jones *et al.*, 2007, 2012).

Cílem experimentů bylo ověření účinnosti izolovaných lytických bakteriofágů ϕ Ds3CZ a ϕ Ds20CZ na bakterii *Dickeya solani* pomocí laboratorních testů na řezech hlíz bramboru.

Materiál a Metody

Pro zjištění účinnosti směsi lytických fágů ϕ Ds3CZ a ϕ Ds20CZ (rod *Limestonevirus*, čeleď *Ackermannviridae*) na bakterii *D. solani* byly použity laboratorní testy na plátcích hlíz bramboru. Fágy byly izolovány ze vzorků půdy odebraných z polí brambor z různých lokalit České republiky. Vzorky půdy (přibližně 5g) byly kultivovány 16 hodin při 20 °C na třepačce s 20 ml LB média, aby došlo k namnožení přítomných bakterií. Poté byly vzorky sedimentovány centrifugací a supernatant byl sterilizován filtrací přes bakteriální filtr. Tímto způsobem bylo připraveno více než 200 vzorků. Přítomnost fága/fágů ve vzorku byla testována aplikací 1 μ l sterilního filtrátu na vrstvu měkkého agaru, ve které byla rozmíchána aktivně rostoucí bakteriální kultura a jeho kultivací 16 hodin při 20 °C. Vzorky byly testovány proti kmenům *Dickeya* ssp. CPPB 016, CPPB 019, CPPB 050, CPPB 065, CPPB 176 a CPPB 200, získané ze sbírky fytopatogenních bakterií VÚRV Praha-Ruzyně. Přítomnost fága proti konkrétnímu bakteriálnímu kmenu byla signalizována prosvětlenou zónou (plakem) v místě aplikace vzorku. Asi 1 mm² z plaku byl resuspendován v 1 ml pufru (10mM Tris-HCl, pH 7.4, 10mM MgSO₄, 150mM NaCl), filtrován přes bakteriální filtr a 1 μ l filtrátu byl v měkkém agaru spolu s příslušným bakteriálním kmenem kultivován 16 hod při 20 °C. Tímto způsobem byl každý fág pasážován 5x. Fágový lyzát pro purifikaci byl připraven inokulací 200ml exponenciálně rostoucí kultury *Dickeya* ssp. CPPB 050 v LB médiu pasážovaným fágem a jeho kultivací při pomalém třepání 24 hod při 20 °C. Materiál byl odstředěn 15 min při 15 000 x g a supernatant byl filtrován přes bakteriální filtr. Fágy byly z filtrátu vysráženy pomocí 10 % PEG6000 a 4 % NaCl 16 hod při 10 °C a koncentrovány centrifugací 30 min při 20 000 x g. Fágový extrakt byl rozpuštěn v pufru a sterilizován filtrací.

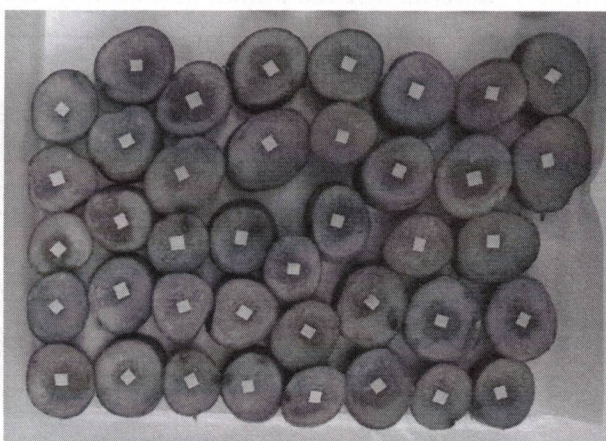
Zdravé hlízy odrůdy 'Jasmína', 'Red Anna' a 'Bohemia' (jednalo se o citlivé odrůdy k bakteriím způsobujícím měkkou hnilobu bramboru) byly omyty pod tekoucí vodou pro odstranění ulpívajících zbytků půdy, dezinfikovány postřikem 70 % etanolem a osušeny po dobu 30 min.

Dezinfikované hlízy brambor byly nakrájeny na plátky přibližně 10 mm silné, které byly vyrovnány do sterilních uzavíratelných boxů z PVC. Do jednoho boxu bylo uloženo na vlhký filtrační papír (nasycený 200 ml vody) 4×10 plátků hlíz od každé varianty pokusu. Na plátky hlíz bylo nejprve pipetou nanесeno 200 μ l fágového roztoku (10^{-8} PFU/ml). Plátky byly ponechány po dobu 10 minut, aby roztok mohl dobře difundovat do pletiv. Na plátky hlíz byly potom pomocí pinzety položeny sterilní papírové čtverečky o rozměru 9×9 mm nasycené bakteriální suspenzí (jednalo se o kmen *D. solani* CPPB-050 vykazující významnou pektinolytickou aktivitu, 500 tisíc jednotek na 1 ml). Jako pozitivní kontrola sloužila varianta bez ošetření plátků hlíz fágy (pouze inokulace bakteriální suspenzí). Jako negativní kontroly byly použity varianty s aplikací roztoku fágů a sterilní vody na papírové štítky. Od každé varianty pokusu byla provedena tři opakování pro potřebné statistické vyhodnocení. Potom byly boxy uzavřeny a uloženy při teplotě 21 °C. Po třech dnech inkubace bylo provedeno vyhodnocení pokusu. Účinnost ošetření testovanými fágy byla vypočtena dělením průměru oblasti bramborového plátku vykazujícím příznaky měkké hniloby a celkovým průměrem hlízy. Výsledky byly vyjádřeny v procentech. Potom bylo provedeno statistické vyhodnocení pokusu (program UNISTAT), kdy byla vzájemně porovnána průměrná infekce plátků hlíz bramboru jednotlivých variant pokusu.

Výsledky a diskuze

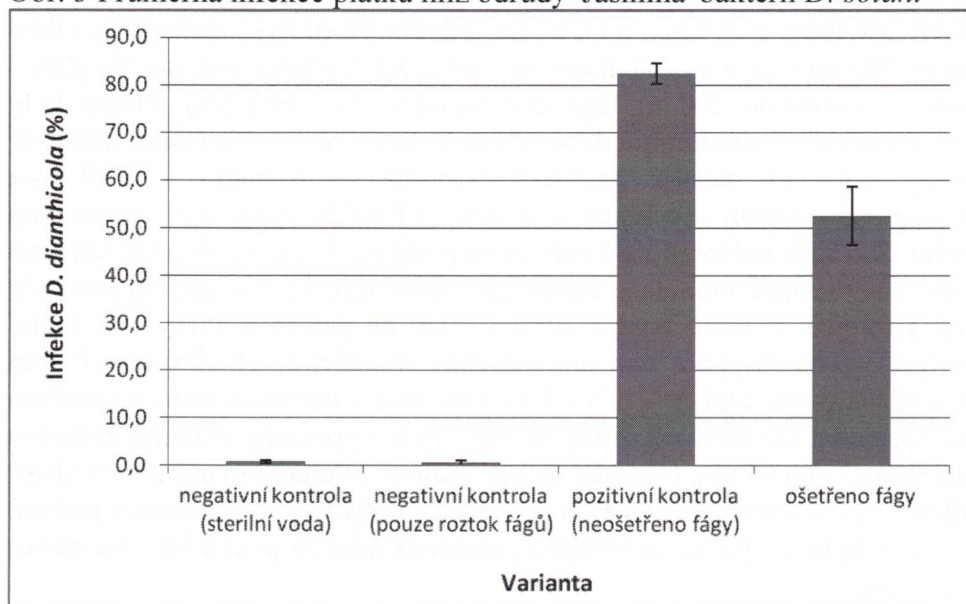
Experimentální data ukázala, že směs izolovaných lytických fágů ϕ Ds3CZ a ϕ Ds20CZ o koncentraci 10^{-8} PFU/ml účinně potlačovala měkkou hnilobu hlíz bramboru způsobenou bakterií *D. solani*. Na ošetřené variantě fágy byla zjištěna statisticky průkazně nižší infekce *D. solani* u všech testovaných odrůd bramboru (obr. 3 až 5). Na obr. 1 a 2 lze vidět patrný rozdíl mezi ošetřenou a neošetřenou variantou pokusu. Aplikace roztoku fágů na plátky bramboru před inokulací bakteriálním patogenem vedla ke snížení vývoje symptomů choroby v průměru o 47,5 % (obr. 6). Muturi *et al.* (2019) zjistil pomocí stejné metody snížení infekce druhem *P. carotovorum* vyšší než 50 %. Carstens *et al.* (2018) prokázal snížení infekce bakterií *D. solani* pomocí bakteriofágů o 93,3 % až 48,9 %.

Přestože aplikace směsi fágů ϕ Ds3CZ a ϕ Ds20CZ účinně snižovala příznaky měkké hniloby, nedokázala úplně eliminovat infekci, což je ve shodě s Muturi *et al.* (2019), který se zabýval fágy proti *P. carotovorum*. Není jasné, zda se bakterie, které vyvolají infekci na hlízách ošetřených fágy, stanou rezistentní vůči všem fágům ve směsi, nebo jakým způsobem se vyhnou infekci fágy. Pro snížení pravděpodobnosti vytvoření případné rezistence bakterií vůči všem fágům je vhodné pro účinné snížení infekce použít geneticky různorodou sadu fágů.

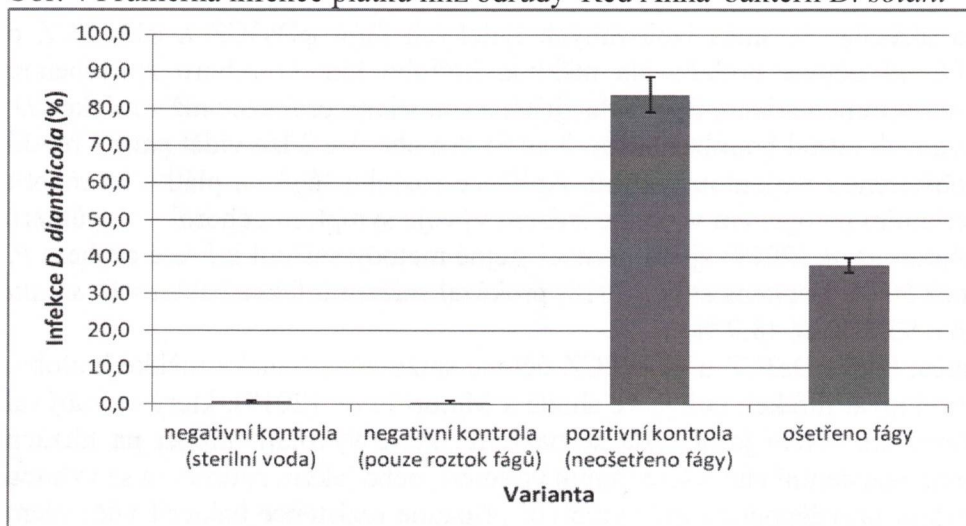


Obr. 1 Neošetřená varianta fágy ('Red Anna') Obr. 2 Ošetřená varianta fágy ('Red Anna')

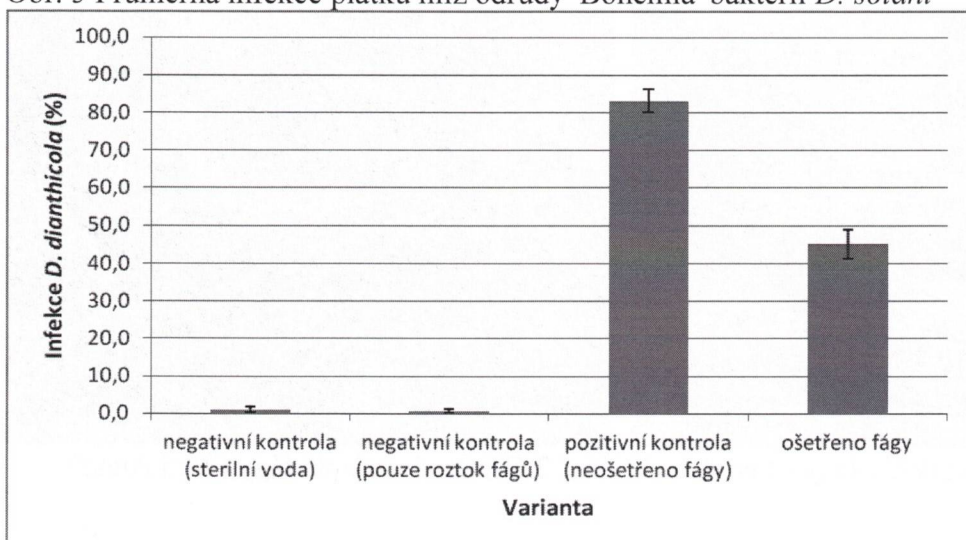
Obr. 3 Průměrná infekce plátků hlíz odrůdy 'Jasmína' bakterií *D. solani*



Obr. 4 Průměrná infekce plátků hlíz odrůdy 'Red Anna' bakterií *D. solani*

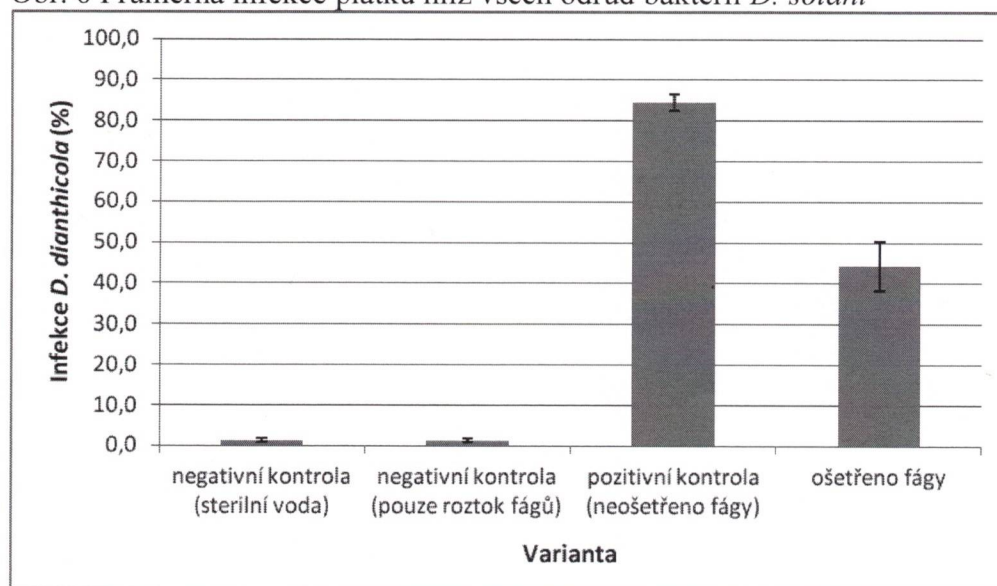


Obr. 5 Průměrná infekce plátků hlíz odrůdy 'Bohemia' bakterií *D. solani*



Možnost ochrany rostlin pomocí bakteriofágů byla studována u různých patogenních bakterií (např. *E. amylovora*, *Agrobacterium tumefaciens*, *Ralstonia solanacearum*, *Streptomyces*, *Pseudomonas* sp., *Xanthomonas* sp., *Pectobacterium* sp., *Xylella fastidiosa*, *Dickeya* sp.) [Jones *et al.*, 2007; Monk *et al.*, 2010; Buttner *et al.*, 2017]. Byly izolovány a identifikovány bakteriofágy, které byly účinné na druh *D. solani* v podmínkách *in vitro* (Czajkowski *et al.*, 2014). Adriaenssens *et al.* (2012) popsal T4 bakteriofágy proti *D. solani*, kdy došlo po jejich aplikaci ke zvýšení výnosu brambor. Různé výzkumné skupiny se zabývali účinností fágů na *Pectobacterium* spp. a *Dickeya* spp. v rostlinách a hlízách brambor *in vitro*, ve skleníkových podmínkách a v polních pokusech (Czajkowski, 2015). Komerčně byl vyvinut produkt na bázi bakteriofágů s názvem AgriPhage™ (Omnilytics) proti např. *P. syringae* pv. *tomato*, *Xanthomonas pruni*, *Clavibacter michiganensis* subsp. *michiganensis*, *Erwinia amylovora* (Monk *et al.*, 2010, Anonymus, 2020a). Dále byl na trh uveden přípravek Biolyse®-PB proti bakteriím z čeledi *Enterobacteriaceae* způsobujícím měkkou hnilobu bramboru (Anonymus, 2020b).

Obr. 6 Průměrná infekce plátků hlíz všech odrůd bakterií *D. solani*



Závěr

Pomocí laboratorních experimentů byla ověřena účinnost směsi lytických fágů ϕ Ds3CZ a ϕ Ds20CZ na infekci bakterií *D. solani* na plátcích hlíz bramboru. Roztok fágů účinně potlačoval symptomy měkké hniloby hlíz bramboru způsobené bakterií *D. solani*. Mezi ošetřenou a neošetřenou variantou byly zaznamenány statisticky významné rozdíly v infekci hlíz bramboru u všech testovaných odrůd. Aplikace směsi fágů na plátky bramboru před inokulací bakteriálním patogenem vedla ke snížení vývoje symptomů choroby v průměru o 47,5 %. Účinnost fágů je nutné ještě ověřit v poloprovozních a provozních podmínkách. Fágy by mohly být aplikovány po sklizni brambor pro snížení znehodnocení hlíz způsobené měkkou hnilobou během skladování, nebo bezprostředně před výsadbou brambor pro snížení infekce bakteriemi během vegetačního období. Udržení nízké úrovně kontaminace produkce brambor bakteriemi je v současné době velkým problémem. V případě dostatečné účinnosti na infekci lze bakteriofágy využít v ekologické produkci brambor pro ochranu proti bakteriím, která je šetrná k životnímu prostředí a bezpečná pro spotřebitele.

Dedikace

Příspěvek byl zpracován s podporou projektu NAZV QK1910028 „Biologická ochrana brambor proti vybraným patogenním bakteriím“.

<i>Název publikace:</i>	Aktuální poznatky v pěstování, šlechtění, ochraně rostlin a zpracování produktů
<i>Druh publikace:</i>	Vědecká příloha časopisu Úroda 12/2020
<i>Autoři publikace:</i>	Kolektiv autorů dle obsahu
<i>Editor:</i>	Ing. Barbora Badalíková Ing. Ivana Šindelková
<i>Náklad:</i>	5. 500 výtisků
<i>Forma:</i>	CD
<i>Vydal:</i>	Výzkumný ústav pícninářský, spol. s r.o. Troubsko Zemědělský výzkum, spol. s r.o. Troubsko a časopis Úroda