

Lp. w zał. do Rozporządzenia MRiRW: 57.

Tytuł zadania: Badania nad opracowaniem metod selektywnej izolacji oraz czułej identyfikacji bakterii *Clavibacter michiganensis* ssp. *sepedonicus* w trudnych diagnostycznie próbach środowiskowych.

Kierownik zadania: dr inż. W. Przewodowski

Cel zadania:

Głównym celem zadania było opracowanie materiałów i procedur do selektywnej izolacji kwarantannowej bakterii - *Clavibacter michiganensis* ssp. *sepedonicus* (Cms) z różnych prób środowiskowych oraz opracowanie i weryfikacja wysoce czułych i specyficznych metod identyfikacji tej bakterii.

Cel ten osiągnięto poprzez realizację celów szczegółowych poszczególnych tematów badawczych zaplanowanych w ramach zadania.

Materiały i metody:

W ramach pierwszego z tematów opracowywano materiałów do izolacji bakterii Cms z prób środowiskowych. W tym celu m. innymi kontynuowano prace nad uzyskaniem i polepszeniem jakości przeciwciał skierowanych na komórki bakterii Cms. Jakość surowic otrzymanych po immunizacji nowego królika badano oceniając takie parametry, jak miano oraz specyficzność oczyszczonych przeciwciał anty-Cms. Opracowano również powtarzalny sposób syntezy trwałej i jednorodnej warstwy polimeru na powierzchni matrycy służącej do izolacji komórek bakterii z prób środowiskowych. Po opracowaniu immunosorbentu, skuteczność opracowanych rozwiązań oceniano w warunkach laboratoryjnych oraz polowych.

W celu polepszenia diagnostyki molekularnej bakterii Cms, w ramach drugiego z tematów prowadzono badania nad uzyskaniem skutecznej metody izolacji DNA bakterii Cms z prób środowiskowych. Stosując cztery różne enzymy oraz trzy zalecane metody izolacji DNA wyznaczano optymalne warunki izolacji DNA bakteryjnego z wody oraz komponentów z soku ziemniaka. Jako metodę odnośną stosowano metodę izolacji DNA zalecaną w dyrektywie WE 2006/56. Jakość wyizolowanego DNA oceniano poprzez pomiar spektrofotometryczny oraz na podstawie oceny wizualnej elektroforegramów uzyskanych przed i po przeprowadzeniu testu PCR.

Opracowane rozwiązania i procedury weryfikowano w ramach kolejnego tematu badawczego, oceniając skuteczność izolacji i identyfikacji bakterii Cms z prób pobranych w warunkach polowych. Diagnostykę wykonano w trakcie wegetacji roślin oraz po zbiorze bulw ziemniaka stosując jako próby odpowiednio tkanki (liście i łodygi) porażonych roślin oraz bulwy potomne ziemniaka. Do inokulacji bulw matecznych stosowano patogeniczny szczepem bakterii Cms wyselekcjonowany w ramach wcześniejszych badań. Stopień porażenia badanych odmian bakteriami Cms oceniano zarówno w okresie wegetacyjnym, jak i po zbiorze bulw, stosując obserwacje takich parametrów, jak terminy wschodów, kwitnienia i zasychania roślin oraz objawów porażenia części nadziemnej roślin oraz bulw ziemniaka. Aby ustalić dokładne warunki środowiskowe, w których pozyskano próby do badań, w trakcie wegetacji dokonywano regularnego pomiaru temperatury i wilgotności stosowanych profili glebowych oraz temperatury powietrza.

W ramach prac z udziałem roślin in vitro ziemniaka, oceniano wpływ mieszaniny 3 patogenicznych szczepów bakterii Cms na stopień porażenia odmian badanych roślin. Do badań użyto 16 odmian roślin in vitro ziemniaka, które poddano działaniu skoncentrowanej mieszaniny zawiesin bakteryjnych tych szczepów, a następnie umieszczano w podłożach wzrostowych MS. W dalszej części zadania, z udziałem dwóch najbardziej zróżnicowanych odmian, oceniano wpływ koncentracji Cms w mieszaninie inokulacyjnej na stopień porażenia badanych roślin.

W ramach prac dotyczących opracowania sposobu eliminacji zakażeń mikrobiologicznych w pożywkach hodowlanych roślin in vitro, oceniano wpływ 2 wybranych koloidów o właściwościach antymikrobiologicznych zarówno na bakterie Cms, jak i rośliny in vitro ziemniaka. Prace podjęte w bieżącym roku miały na celu znalezienie optymalnej koncentracji dla tych koloidów tak, aby z jednej strony uzyskać działanie antymikrobiologiczne koloidów względem badanych szczepów bakterii Cms,

a z drugiej uniknąć działania fitotoksycznego stosowanych koloidów na badane kultury *in vitro* ziemniaka.

Wyniki i dyskusja:

Realizowane w ramach pierwszego tematu badania polegające na opracowaniu materiałów do izolacji bakterii Cms z prób środowiskowych, pozwoliły na uzyskanie przeciwciał o wysokim mianie i specyficzności. Uzyskane przeciwciała wykazały lepszą specyficzność w obecności badanych szczepów bakterii Cms oraz innych patogenów bakteryjnych ziemniaka niż stosowane w badaniach jako odnośne przeciwciała anty-Cms zawarte w komercyjnie dostępnych zestawach diagnostycznych do testu ELISA. Z uwagi na krótki czas immunizacji nowego królika, miano surowic było zbliżone do przeciwciał anty-Cms otrzymanych wcześniej, dlatego proces immunizacji przedłużono. Z kolei badania dotyczące opracowania matrycy do izolacji bakterii Cms z prób środowiskowych pozwoliły na opracowanie powtarzalnego sposobu uzyskiwania trwałej i jednorodnej warstwy polimeru na powierzchni matrycy. Po opracowaniu matrycy, jej powierzchnię kowalencyjnie opłaszczano przeciwciałami anty-Cms uzyskując immunosorbent pozwalający na selektywną izolację i diagnostykę bakterii Cms z prób pozyskanych w warunkach laboratoryjnych oraz polowych.

Z uwagi na występujące powszechnie trudności z uzyskaniem wysokiej czułości testów molekularnych w diagnostyce Cms z prób środowiskowych, bogatych w inhibitory reakcji PCR, w ramach drugiego tematu prowadzono badania, które pozwoliły na zróżnicowanie warunków izolacji DNA tych bakterii. Stosując cztery różne enzymy zalecane w izolacji DNA oraz trzy metody izolacji DNA, wyznaczono warunki izolacji DNA bakteryjnego z wody oraz komponentów z soku bulw ziemniaka. Jakość wyizolowanego DNA oceniono na podstawie pomiaru spektrofotometrycznego oraz oceny wizualnej elektroforegramów uzyskanych przed i po przeprowadzeniu testu PCR.

Opracowane materiały oraz metodyka izolacji DNA bakteryjnego pozwoliły na ocenę skuteczności izolacji i identyfikacji bakterii Cms z prób pobranych w warunkach polowych w ramach tematu trzeciego. Badania przeprowadzone w dwóch jednostkach badawczych Instytutu usytuowanych w różnych rejonach kraju pozwoliły na określenie podatności badanych odmian ziemniaka na sztuczną inokulację bakteriami Cms. Próby pozyskane z tkanek (liści i łodyg) porażonych roślin oraz bulw potomnych ziemniaka odpowiednio w trakcie wegetacji roślin oraz po zbiorze bulw ziemniaka, pozwoliły na porównanie stopnia porażenia badanych odmian opracowanym testem immunomolekularnym. Stosowany jako odnośny immunofluorescencyjny test IFAS oraz obserwacje wyszczególnionych w metodyce parametrów w dużej mierze potwierdziły wyniki infekcji latentnej uzyskane przy pomocy zastosowanego testu immunomolekularnego.

Badania dotyczące zdolności bakterii Cms do infekowania roślin utrzymywanych w kulturach *in vitro*, pozwoliły na zróżnicowanie badanych odmian pod względem wrażliwości na obecność Cms. Zastosowanie mieszaniny 3 patogenicznych szczepów bakterii Cms powodowało większą presję patogenu aniżeli użycie do inokulacji roślin tylko jednego szczepu w roku poprzednim. W konsekwencji tego w odróżnieniu do wcześniejszych badań, wśród 16-tu badanych odmian w formie roślin *in vitro* nie zanotowano odmian całkowicie tolerancyjnych na obecność bakterii Cms. Badane odmiany podzielono natomiast na dwie grupy, odpowiednio bardziej i mniej tolerancyjne na porażenie badanymi bakteriami Cms. Brak całkowitej tolerancji wśród badanych odmian na obecność mieszaniny ww. szczepów Cms potwierdziły wyniki badań przeprowadzone z udziałem dwóch najbardziej zróżnicowanych odmian, w których oceniano wpływ koncentracji Cms w mieszaninie inokulacyjnej na stopień porażenia badanych roślin.

Prace w ramach tematu dotyczącego oceny fitotoksycznego wpływu na rośliny *in vitro* substancji koloidalnych, oceniano przy pomocy dwóch wybranych koloidów charakteryzujących się najwyższą skutecznością w hamowaniu wzrostu i rozmnażania bakterii Cms. Uzyskane wyniki badań pozwoliły opracować warunki optymalnej koncentracji dla tych koloidów tak, aby z jednej strony uzyskać działanie antymikrobiologiczne koloidów względem badanych szczepów bakterii Cms, a z drugiej uniknąć działania fitotoksycznego stosowanych koloidów na badane kultury *in vitro* ziemniaka.