

WŁODZIMIERZ PRZEWODOWSKI

KATARZYNA SALAMOŃSKA

DOROTA SZAREK

DOROTA MICHAŁOWSKA

WIOLETA STOCHŁA

AGNIESZKA PRZEWODOWSKA

GRZEGORZ GRYŃ

MILENA PIETRASZKO

KATARZYNA FRANKE

Instytut Hodowli i Aklimatyzacji Roślin — Państwowy Instytut Badawczy, Radzików

Kierownik Tematu: dr hab. inż. Włodzimierz Przewodowski Instytut Hodowli i Aklimatyzacji Roślin

Państwowy Instytut Badawczy, Radzików, Oddział W Boninie, 76-009 Bonin 3, tel. 94 3423031 w. 211,

e-mail: w.przewodowski@ihar.edu.pl

Prace zostały wykonane w ramach badań podstawowych na rzecz postępu biologicznego w produkcji roślinnej na podstawie decyzji Ministra Rolnictwa i Rozwoju Wsi nr HOR.hn.802.19.2018, Zadanie 57.

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

**Research and development of selective isolation and sensitive identification methods
of *Clavibacter michiganensis* ssp. *sepedonicus* bacteria in difficult diagnostic
environmental samples**

Słowa kluczowe: bakterioza pierścieniowa ziemniaka, *Clavibacter michiganensis* ssp. *sepedonicus*,
diagnostyka, nowoczesne metody, próby środowiskowe, ziemniak

CEL TEMATU ORAZ PROWADZONYCH BADAŃ

Celem realizowanego projektu 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.

Założony cel osiągnięto poprzez realizację założeń poszczególnych tematów badawczych projektu.

OPIS WYNIKÓW

Wyniki uzyskane w temacie 1 pozwoliły na opracowanie materiałów do konstrukcji immunopodłoża do izolacji bakterii Cms z badanych prób. Na podstawie opracowanych antygenów, w procesie immunizacji królików uzyskano 3 surowice z IgG anty-Cms, które po oczyszczeniu badano pod kątem czułości i specyficzności względem stosowanych szczepów bakteryjnych. Do opracowania immunopodłoża użyto przeciwciał dających najlepszy stosunek miana do specyficzności. Opracowane materiały pozwoliły na opracowanie funkcjonalnego immunopodłoża do izolacji bakterii Cms z soku ziemniaka w warunkach laboratoryjnych oraz polowych.

Badania związane z weryfikacją metody izolacji DNA z zawiesin Cms o różnej zawartości śluzów bakteryjnych, potwierdziły skuteczność opracowanej metody zarówno w obecności wody, jak i komponentów soku ziemniaka. Jakość wyizolowanego DNA oceniano na podstawie pomiaru spektrofotometrycznego oraz analizy elektroforegramów zawierających produkty amplifikacji DNA po przeprowadzeniu testu PCR. W porównaniu do zalecanej obecnie metody izolacji DNA, którą stosowano jako odnośną, opracowana metoda pozwalała na uzyskanie wyższej czułości w przypadku prób z wody, ale była jednocześnie bardziej wrażliwa na komponenty soku ziemniaka. Wprowadzenie modyfikacji w opracowanej metodzie w trakcie izolacji DNA z ekstraktów roślinnych pozwoliło na uzyskanie czułości adekwatnej do metody odnośnej.

Wyniki uzyskane w ramach tematu 3 związane z porównaniem stopnia porażenia badanych roślin oraz bulw potomnych pozwoliły potwierdzić funkcjonalność opracowanych materiałów oraz metodyki izolacji DNA. Badane odmiany wykazały podobnie jak w poprzednim roku zróżnicowaną podatność na sztuczną inokulację bakteriami Cms obu szczepów. Pomimo odmiennych do poprzednich lat warunków pogodowych, stopień porażenia bakteriami Cms zależał zarówno od stosowanego profilu glebowego, jak i użytego do inokulacji szczepu Cms. Wyniki wskazały na większą efektywność szczepu silnie mukoidalnego. Najmniejszą podatność uzyskano dla odmian Courage i Ikar, natomiast największe porażenie bulw zanotowano u odmian Gwiazda i Sagitta. Stosowanie profilu glebowego miało wpływ na wysokość plonu i liczbę bulw potomnych. Metody IFAS i PCR w znacznym stopniu korelowały ze sobą potwierdzając wyższy indeks porażenia prób z bulw, niezależnie od wykrywanego szczepu Cms.

Wyniki badań uzyskane w ramach tematu 4, pozwoliły ocenić wpływ obecności zróżnicowanych mukoidalnie szczepów bakterii Cms na poziom ekspresji objawów chorobowych oraz czułość testu molekularnego w badanych tkankach roślin *in vitro*. Badane odmiany wykazały zróżnicowaną wrażliwość na obecność poszczególnych szczepów bakterii Cms. W porównaniu do wcześniejszych badań z użyciem mieszaniny 3 szczepów Cms, przy zastosowaniu pojedynczych szczepów i analogicznych koncentracji komórek bakterii w mieszaninie inokulacyjnej, oddziaływanie fitotoksyczne było znacznie słabsze. Obecność bakterii Cms oceniona testem PCR potwierdzono praktycznie w większości badanych prób pozytywnych, często pomimo braku widocznych objawów makroskopowych na roślinach oraz zamgleń w podłożach wskazujących na silne porażenie bakteriami Cms.

Badania dotyczące zapobiegania kontaminacjom bakteriami Cms podłoży stosowanych do hodowli roślin *in vitro* ziemniaka, pozwoliły na ocenę wpływu obecności koloidu złota na działanie mieszaniny dwóch innych koloidów o działaniu antymikrobiologicznym. Obserwowano różną wrażliwość badanych odmian ziemniaka na mieszaninę koloidów, zależnie od stosowanej koncentracji. Niższe stężenia badanych koloidów powodowały lepszy wzrost i namnażanie się badanych roślin w porównaniu z roślinami kontrolnymi, natomiast zwiększenie koncentracji nanocząsteczek w mieszaninie powodowało wyższą aktywność antymikrobiologiczną w stosunku do Cms.

WNIOSKI Z PROWADZONYCH BADAŃ

1. Przeciwciała skierowane na komórki bakterii Cms uzyskane w ramach pierwszego z tematów badawczych w porównaniu z IgG z roku 2017 roku cechowały się wysoką specyficnością oraz relatywnie niższym mianem wobec badanych bakterii Cms. Odpowiednia modyfikacja podłoży oraz zastosowanie opracowanych w roku poprzednim IgG pozwoliły na opracowanie powtarzalnego immunopodłoża do specyficznej izolacji komórek bakterii Cms niezależnie od stopnia mukoidalności badanych szczepów Cms, jak również wczesności i zawartości skrobi badanych odmian ziemniaka. Opracowany test immuno-PCR w porównaniu do poprzedniego roku został ulepszony, ale wymaga jeszcze dopracowania i optymalizacji w celu poprawienia czułości.
2. Badania dotyczące opracowania warunków izolacji DNA bakteryjnego pozwoliły porównać i wyznaczyć warunki, przy których uzyskano najwyższą i najniższą czułość testu PCR bakterii Cms izolowanych z wody oraz z ekstraktu z bulw ziemniaka. Z uwagi na znaczne oddziaływanie inhibitorów reakcji PCR w próbach z ekstraktu ziemniaka, do dalszych badań w ramach zadania wybrano metodę wysokosolną z proteinazą K stosując 10-krotne rozcieńczenie izolowanego DNA.
3. W temacie trzecim wykazano zróżnicowaną podatność badanych odmian na sztuczną inokulację badanymi szczepami bakterii Cms. Odmianami najmniej podatnymi na porażenie roślin i bulw potomnych przez badane szczepy Cms były Courage, Ikar i Jurek, natomiast porażenie bulw w wysokim stopniu obserwowano u odmian Annabelle, Gwiazda i Sagitta. Wysokie porażenie pędów przekładało się na wysokie porażenie plonu. Obserwowane w trakcie wegetacji zmiany w postaci chloroz na liściach u odmian Sagitta i Gwiazda potwierdzone zostały wysokim indeksem porażenia obliczonym na podstawie obserwacji mikroskopowej. Wyższy indeks porażenia łodyg i bulw stwierdzono w preparatach pochodzących z roślin, których sadzeniaki były inokulowane mukoidalnym szczepem Cms NCPPB 4053 i były uprawiane na glebie ciężkiej, gliniastej profilu VI. Metody IFAS i PCR w znacznym stopniu korelowały ze sobą potwierdzając wyższy indeks porażenia prób z bulw, niezależnie od wykrywanego szczepu Cms.
4. Badania przeprowadzone w ramach kolejnego zadania pozwoliły ocenić wpływ obecności zróżnicowanych mukoidalnie szczepów bakterii Cms na poziom ekspresji objawów chorobowych oraz czułość testu molekularnego w badanych tkankach roślin

- in vitro*. Badane odmiany wykazały zróżnicowaną wrażliwość na obecność poszczególnych szczepów bakterii Cms. Najbardziej wrażliwą odmianą była się odmiana Sagitta, natomiast najmniej podatną na obecność badanych szczepów Cms, odmiana Courage. Obecność bakterii Cms oceniona testem PCR potwierdzono praktycznie w większości badanych prób pozytywnych często pomimo braku widocznych objawów makroskopowych na roślinach oraz zamgleń w podłożach wskazujących na silne porażenie bakteriami Cms.
5. W ramach tematu 5 oceniono wpływ obecności koloidu złota na działanie mieszaniny koloidów srebra i miedzi na bakterie Cms, jak również na wzrost i namnażanie badanych roślin *in vitro*. Obecność złota zwiększyła działanie toksyczne nanocząsteczek w stosunku do mukoidalnego szczepu patogenicznych bakterii Cms już przy koncentracji 0,1% docelowego stężenia nanocząsteczek w podłożu mikrobiologicznym. Obserwowano różną wrażliwość badanych odmian ziemniaka w postaci kultur *in vitro* na mieszaninę koloidów, zależnie od stosowanej koncentracji. Niższe stężenia badanych koloidów powodowały lepszy wzrost i namnażanie się badanych roślin w porównaniu z roślinami kontrolnymi.

LITERATURA

- Barnyk A., Lewosz J., Treder K., Przewodowski W., Pilecki T. 2008. Zastosowanie chromatografii tiofilnej do izolacji przeciwciał poliklonalnych z surowicy krwi królików. Biul. IHAR 248: 87 — 95.
- Gryń G., Pastuszewska T., Przewodowski W. 2016. Ocena patogeniczności wybranych szczepów *Clavibacter michiganensis* subsp. *sepedonicus* pochodzących z kolekcji NCPPB w Wielkiej Brytanii. Prog. Plant Prot. / Post. Ochr. Rośl. 56 (1): 73 — 78. DOI: 10.14199/2016-013.
- Nowacki W. 2009. Problemy profilaktyki i zwalczania bakteriozy pierścieniowej ziemniaka wywoływanej przez *Clavibacter michiganensis* subsp. *sepedonicus*. Prog. Plant Prot. / Post. Ochr. Rośl. 49 (2): 678 — 685.
- Pastuszewska T., Gryń G., Franke K. 2010. Podatność odmian ziemniaka na porażenie przez *Clavibacter michiganensis* subsp. *sepedonicus*. Prog. Plant Prot. / Post. Ochr. Rośl. 50: 244 — 248.
- Pastuszewska T., Gryń G. 2012. Przeżycie *Clavibacter michiganensis* subsp. *sepedonicus* na powierzchniach wybranych materiałów w warunkach różnych temperatur. Prog. Plant Prot. / Post. Ochr. Rośl. 52 (2): 443 — 446.
- Pietraszko M., Gryń G., Przewodowski W. 2018. An effect of weather and soil conditions and their interaction on infection of leaves and tubers of potato with bacteria *Clavibacter michiganensis* subsp. *sepedonicus* Am. J. Potato Res. (2018) 95: 278. <https://doi.org/10.1007/s12230-017-9629-6>.
- Przewodowski W. 2009. Nowoczesne metody w diagnostyce bakterii *Clavibacter michiganensis* subsp. *sepedonicus*. Prog. Plant Prot. / Post. Ochr. Rośl. 49, 3: 1335 — 1343.
- Przewodowski W., Sekrecka D., Przewodowska A. 2012. The influence of colloidal metals on growth and proliferation of potato plants. Eurobiotech 2012 IV Congress of Polish Biotechnology and IV EUROBIOTECH, Krakow, Poland, 12-15.10.2011: 28.
- Przewodowski W., Przewodowska A. 2017. Development of a sensitive and specific polyclonal antibody for serological detection of *Clavibacter michiganensis* subsp. *sepedonicus*. PLoSONE12(1):e0169785. DOI:10.1371/journal.pone.0169785.
- Salamońska K., Stochła W., Przewodowski W. 2016. Nowoczesne metody diagnostyczne w identyfikacji molekularnej bakterii kwarantannowych ziemniaka Ziemn. Pol. 2016, 4: 41 — 45.
- Stochła W., Przewodowski W., Przewodowska A. 2014. Wybrane metody otrzymywania przeciwciał służących do wykrywania i identyfikacji patogenów ziemniaka. Ziemn. Pol. 3: 46 — 49.

- Stochła W., Przewodowska A., Przewodowski W. 2015. Przydatność przeciwciał króliczych uzyskiwanych dwiema metodami do wykrywania *Clavibacter michiganensis* subsp. *sepedonicus* testem DAS-ELISA. Prog. Plant Prot. /Post. Ochr. Rośl. 55: 352 — 357.
- Waleron M., Waleron K., Kamasa J., Przewodowski W., Lojkowska E. 2011. Polymorphism analysis of housekeeping genes for identification and differentiation of *Clavibacter michiganensis* subspecies. Europ. J. Plant Pathol. 131: 341 — 354.

