



Zadanie 6.2.

**Śledzenie zmian patogeniczności w populacjach
Clavibacter michiganensis ssp. *sepedonicus*
-sprawcy bakteriozy pierścieniowej ziemniaka
oraz *Ralstonia solanacearum*
- sprawcy śluzaka ziemniaka**

Teresa Pastuszewska

Wykonawcy zadania

**Oddział IHAR-PIB w Bydgoszczy
Zakład Technologii Produkcji Roślin Okopowych,
Pracownia Chorób i Szkodników Kwarantannowych Ziemniaka
dr Teresa Pastuszevska, mgr Grzegorz Gryń**

**IHAR-PIB w Radzikowie
Zakład Fitopatologii,
Pracownia Organizmów Kwarantannowych
dr Anna Przetakiewicz, mgr Małgorzata Lisowska (2008-2009),
mgr Agnieszka Węgierek**

Cel zadania

Cel 1: Charakterystyka struktury polskiej populacji bakterii z podgatunku *Clavibacter michiganensis* subsp. *sepedonicus* (Cms) poprzez określenie jej ewentualnego zróżnicowania pod względem wirulencji. Przewidziano pozyskiwanie nowych izolatów Cms z różnych regionów w kraju, ich identyfikację oraz przeprowadzenie analizy stopnia patogeniczności.

W latach 2008–2013 w wyniku współpracy z Wojewódzkimi Inspektoratami Ochrony Roślin i Nasiennictwa (WIORiN) pozyskano ekstrakty tkankowe z porażonych przez Cms bulw ziemniaka, które wykorzystano jako materiał badawczy.

Cel zadania

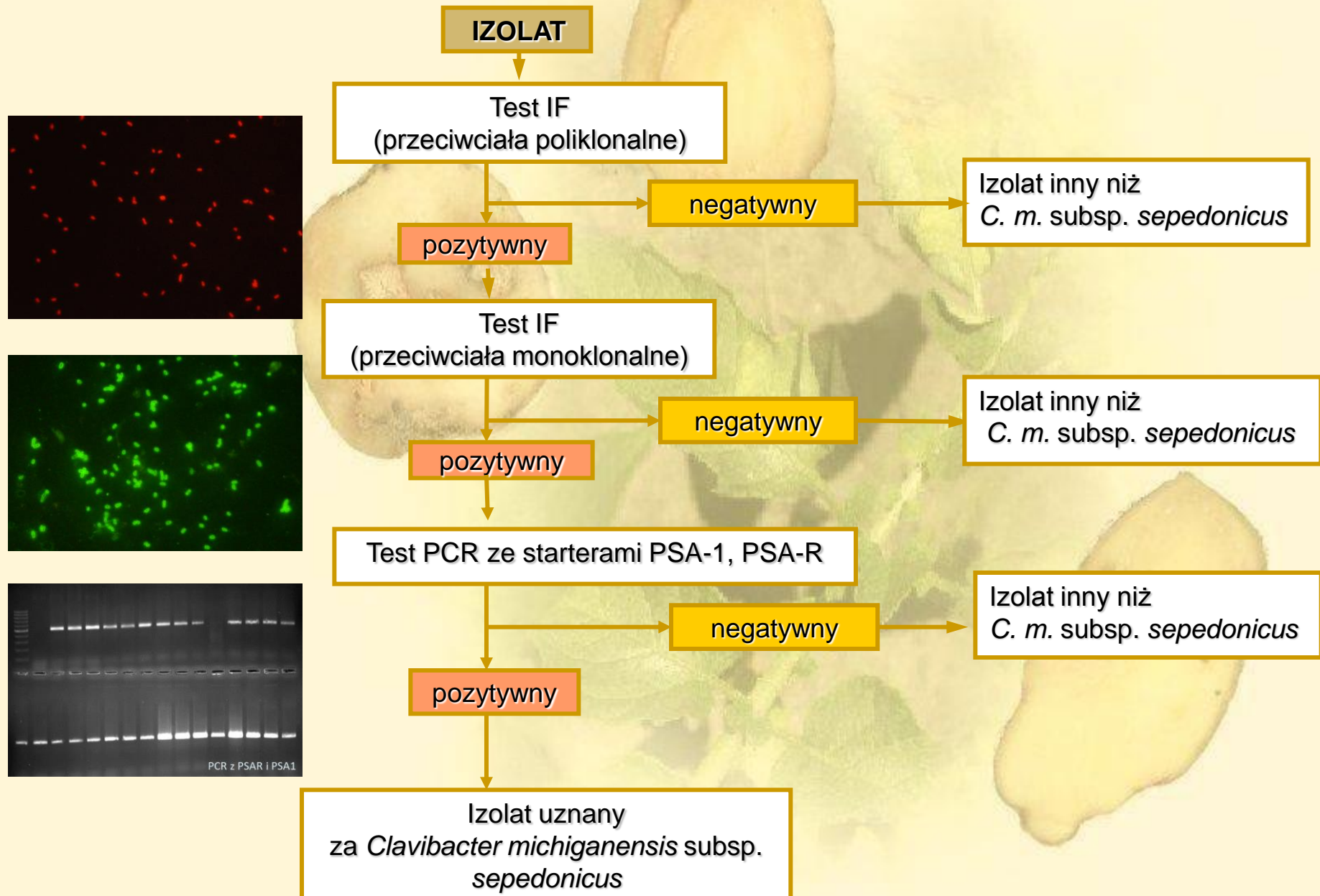
Cel 2: Zgromadzenie kolekcji głównych europejskich szczepów *Ralstonia solanacearum* (rasa 3) oraz przeprowadzenie oceny ich wirulencji w stosunku do odmian ziemniaka uprawianych w Polsce.

Dla realizacji celu z kolekcji Plant Research International w Holandii sprowadzono 4 szczepy bakterii *Ralstonia solanacearum*, rasa 3.

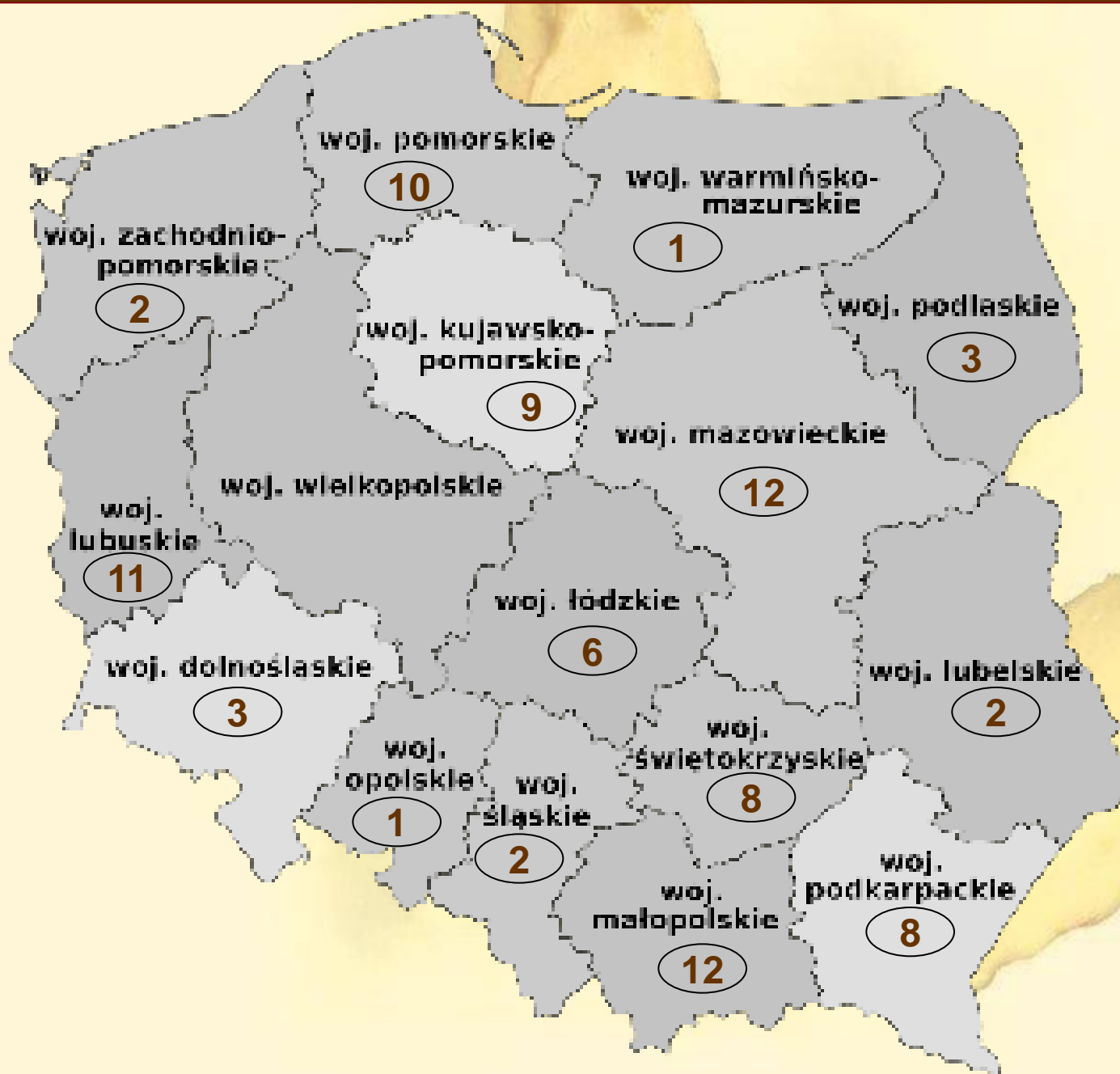
Wymierne rezultaty 2008-2013

- Otrzymano z WIORiN 240 ekstraktów z bulw ziemniaka, porażonych latentnie przez *Cms*.
- Wyosobniono 2209 czystych kultur bakteryjnych. Przeprowadzono ich identyfikację z zastosowaniem dwóch metod: serologicznej (test IF, przy użyciu przeciwciał poli i monoklonalnych) i molekularnej (PCR) oraz testów biologicznych na roślinach bakłazana.
- Zidentyfikowano 90 izolatów jako podgatunek bakterii *Clavibacter michiganensis* subsp. *sepedonicus*, które powiększyły kolekcję szczepów *Cms* w IHAR PIB. Nowe izolaty *Cms* pochodziły z 15 WIORiN jak pokazano na mapie.

Schemat identyfikacji *Clavibacter michiganensis* ssp. *sepedonicus*



Wykaz izolatów *Cms* wyosobnionych w latach 2008-2013



Wymierne rezultaty 2008-2013

Wykonano 16 testów na bakłazanie, w których zawiesinami *Cms* zakażono 1900 roślin bakłazana, w celu oceny patogeniczności 56 izolatów *Cms*, wyosobnionych w latach 2008–2013:

- Potwierdzono patogeniczność 53 izolatów *Cms* w stosunku do bakłazana. Na blaszkach liściowych obserwowano zróżnicowane pokrycie objawami chorobowymi w postaci plamistości liści i więdnienia w zakresie od 0,4% (na roślinach zakażonych *Cms* 5 Warszawa) do 71,3% (*Cms* 3692/09 Katowice).

Porażenie liści bakłazana odmiana Black Beauty w teście patogeniczności izolatów *Cms*, ocenianych w latach 2009-2013

Stopień porażonych liści [%]		Izolat <i>Cms</i>	Liczba izolatów
brak porażenia	0	2 Gorzów Wlkp., 6967 Gdańsk, CL 585	3
niski	>0-12,5	2440 Białystok, 70 Warszawa, 5 Warszawa, 310/08 Gdańsk, 1K/08 Kielce, 2K/08 Kielce, 5006 Gdańsk, CL 581, CL 583, CL 616, 4405/10 Bydgoszcz, 2242 Kraków	12
średni	12,6-25,0	287/08 Gdańsk, 3K/08 Kielce, CL 613, 1292 Kielce, 2740 Rzeszów	5
	25,1-37,5	4398 Kraków, 4711 Kraków, 3127/1 Gorzów Wlkp., CL 589, CL 587, CL 607, CL 620, 12053 Bydgoszcz, 4848 Gorzów Wlkp., 2816 Rzeszów	10
	37,6-50,0	2408 Białystok, 256/08 Gdańsk, 6269 Gdańsk, 1965/2 Opole, 4553 Warszawa, CL 599, 10682 Bydgoszcz, 12047 Bydgoszcz, 2718 Rzeszów, 2794 Rzeszów	10
wysoki	50,1-62,5	11 Warszawa, 2409 Wrocław, 2313 Wrocław, 15 Bydgoszcz, 4 Warszawa, 3535 Katowice, 1588 Kraków, 1656 Kielce, 1625 Kraków	9
	62,6-75,0	2470 Wrocław, 2389 Białystok, 243/08 Gdańsk, 333/08 Gdańsk, 7636 Gdańsk, 3692/09 Katowice, 5289 Warszawa	7
bardzo wysoki	75,1-87,5	-	0
	87,6-100,0	-	0



Wymierne rezultaty *Cms*

Założono 5 doświadczeń polowych (w latach 2009–2013) z 2-3 odmianami ziemniaka o różnej podatności na porażenie przez *Cms* (Annabelle, Benek, Courage, Felka, Owacja) w celu przeprowadzenia oceny patogeniczności 56 izolatów *Cms*:

- Zainokulowano zawiesinami izolatów ok. 1400 bulw ziemniaka,
- Dla wszystkich izolatów wykonano 1322 testy IF z łodyg (oprócz roku 2009) i 1982 testy IF ze zbiorczych prób bulw spod jednego krzaka.



Wymierne rezultaty *Cms*

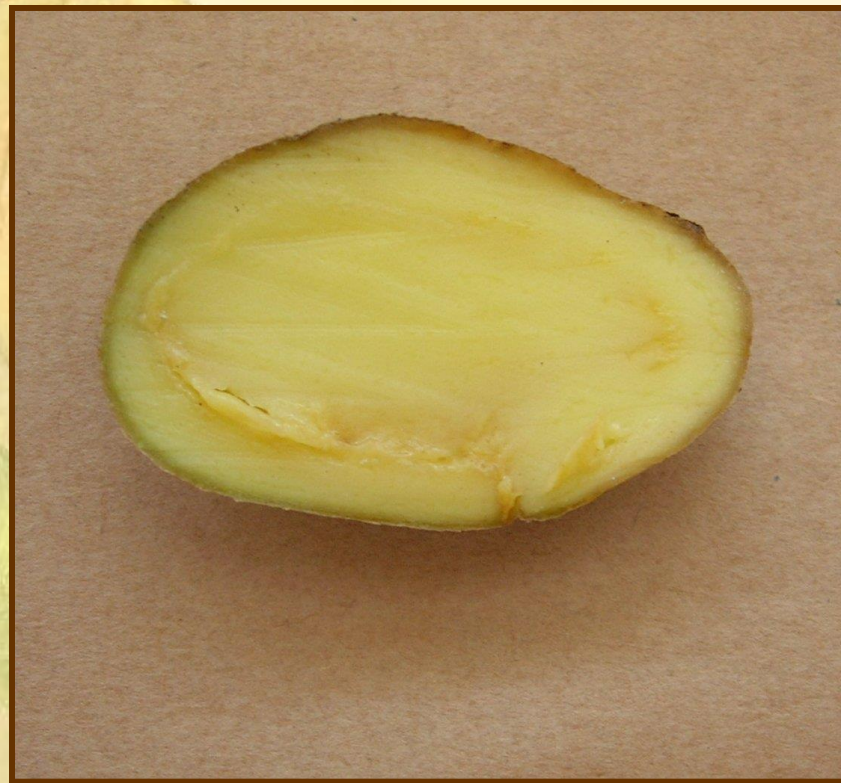
- Porażenie łodyg potwierdzono w łodygach roślin wyrosłych z sadzeniaków inokulowanych 45 izolatami *Cms* na 46 badanych.
- Uzyskano zróżnicowane porażenie bulw potomnych wyrosłych z sadzeniaków inokulowanych 53 izolatami *Cms*.
- W dwóch latach 2008 i 2009, podczas jesiennych obserwacji stwierdzono objawy na bulwach potomnych 3 odmian ziemniaka, inokulowanych ośmioma izolatami *Cms* (odmiana Annabelle: *Cms* 2313 Wrocław; odmiana Felka: *Cms* 70 Warszawa; odmiana Benek: *Cms* 2408 Białystok, *Cms* 243/08 Gdańsk, *Cms* 333/08 Gdańsk, *Cms* 2 Gorzów Wlkp., *Cms* 4711 Kraków, *Cms* 2313 Wrocław).
- Wiosną każdego roku notowano objawy w bulwach.
- Indeks porażenia w formie latentnej bulw odmiany podatnej ziemniaka w latach 2009-2013 wahał się w granicach 0,5% (*Cms* 2816 Rzeszów, odmiana Owacja) do 89,5% (*Cms* 4398 Kraków, odm. Felka).

Porażenie bulw potomnych odmian ziemniaka Benek i Owacja w doświadczeniu infekcyjnym z izolatami *Cms*, na podstawie testu IF (2009-2013)

Indeks porażenia bulw [%]		Izolat <i>Cms</i>	Liczba izolatów
brak porażenia	0	6967 Gdańsk, 7636 Gdańsk, 1625 Kraków, CL 585,	4
niski	>0-12,5	256/08 Gdańsk, 287/08 Gdańsk, 2 Gorzów Wlkp., 3K/08 Kielce, 5Warszawa, 5006 Gdańsk, 6269 Gdańsk, 1965/2 Opole, 4553 Warszawa, CL 581, CL 583, 4405/10 Bydgoszcz, 4848 Gorzów Wlkp., 2242 Kraków, 2740 Rzeszów, 2816 Rzeszów	16
średni	12,6-25,0	11 Warszawa, 310/08 Gdańsk, 1K/08 Kielce, 3127/1 Gorzów Wlkp., 3692/09 Katowice, 1588 Kraków, CL 607, 10682 Bydgoszcz, 12047 Bydgoszcz,	9
	25,1-37,5	15 Bydgoszcz, 2K/08 Kielce, 3535 Katowice, 5289 Warszawa, 1656 Kielce, CL 597, CL 620, 2794 Rzeszów,	8
	37,6-50,0	2408 Białystok, 70 Warszawa, CL 616, 12053 Bydgoszcz, 2718 Rzeszów	5
wysoki	50,1-62,5	2389 Białystok, 2409 Wrocław, 243/08 Gdańsk, 4 Warszawa, CL 589, 1292 Kielce	6
	62,6-75,0	2440 Białystok, 4711 Kraków, CL 613	3
bardzo wysoki	75,1-87,5	4398 Kraków, 2470 Wrocław, 2313 Wrocław, 333/08 Gdańsk, CL 599	5
	87,6-100,0		0

Izolaty *Cms*, po inokulacji którymi stwierdzono bulwy potomne z objawami, podczas jesiennych obserwacji

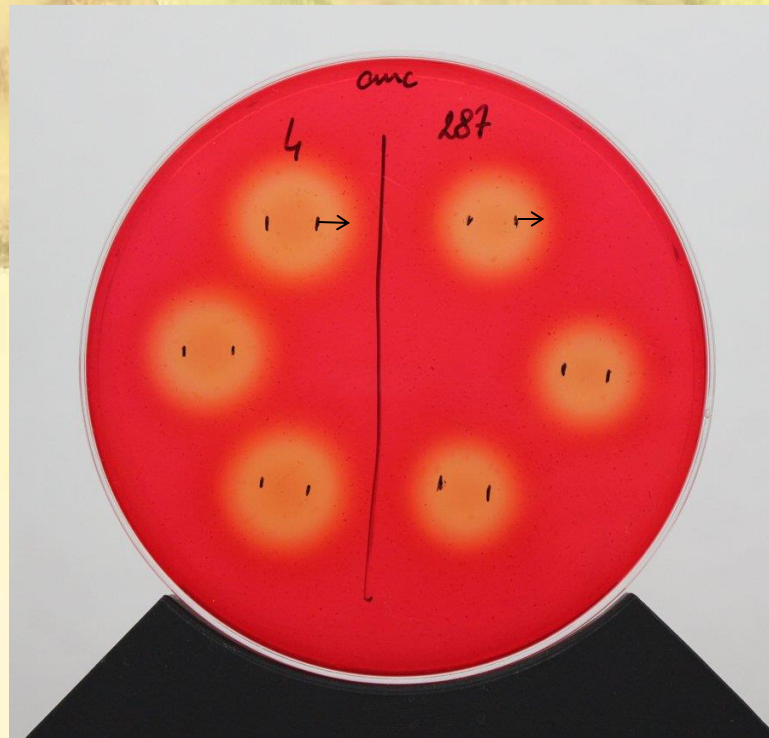
Izolaty *Cms*, po inokulacji którymi stwierdzono bulwy potomne z objawami, podczas wiosennych obserwacji



Objawy bakteriozy pierścieniowej w bulwach potomnych odmiany Benek, której sadzeniaki inokulowano izolatami: *Cms* 2408 Białystok (z lewej strony), *Cms* 4398 Kraków (z prawej strony)

Wymierne rezultaty *Cms*

Dla 25 izolatów *Cms* przeprowadzono 3 testy płytkowe (w trzech powtórzeniach) dla określenia aktywności celulolitycznej. Potwierdzono zróżnicowanie izolatów pod względem ilości wytwarzanego enzymu celulazy, czynnika wirulencji bakterii *Cms*. Wraz ze wzrostem aktywności enzymu obserwowano wzrost wirulencji bakterii *Cms*, wyrażoną stopniem pokrycia liści bakłażana objawami chorobowymi.



Aktywność celulolityczna izolatów *Clavibacter michiganensis* subsp. *sepedonicus*: 4 Warszawa (z lewej strony), 287 Gdańsk (z prawej strony), wyrażona strefą rozkładu celulozy w pożywce

Wymierne rezultaty *R. sol.*

- Liczba zgromadzonych szczepów *R. sol.*: 4 (szczep 1608, 1609, 1610, GMI 1000).
- Liczba inokulowanych bulw zawiesinami szczepów *R. sol.*: 290.
- Liczba bulw poddanych testom PCR: ok. 900.

Obraz obserwowany na żelu agarowym potwierdził obecność lub brak występowania bakterii *Ralstonia solanacearum* w tkance bulw potomnych testowanych odmian ziemniaka. U większości odmian, sztucznie inokulowanych zawiesiną *R.sol.* w koncentracji 10^6 jtk/ml, obecność patogena była potwierdzona w pierwszym pokoleniu wegetatywnym, natomiast w drugim i trzecim proporcja bulw potomnych zawierających komórki bakteryjne zmniejszała się. Najsilniejsze porażenie bulw potomnych obserwowano u odmian Zebra i Tetyda.

Wymierne rezultaty

- Wyniki przedstawiono w formie 8 referatów i szkoleń 8 posterów.
- Opublikowano 14 prac, w tym 8 doniesień konferencyjnych. Najważniejsze to:

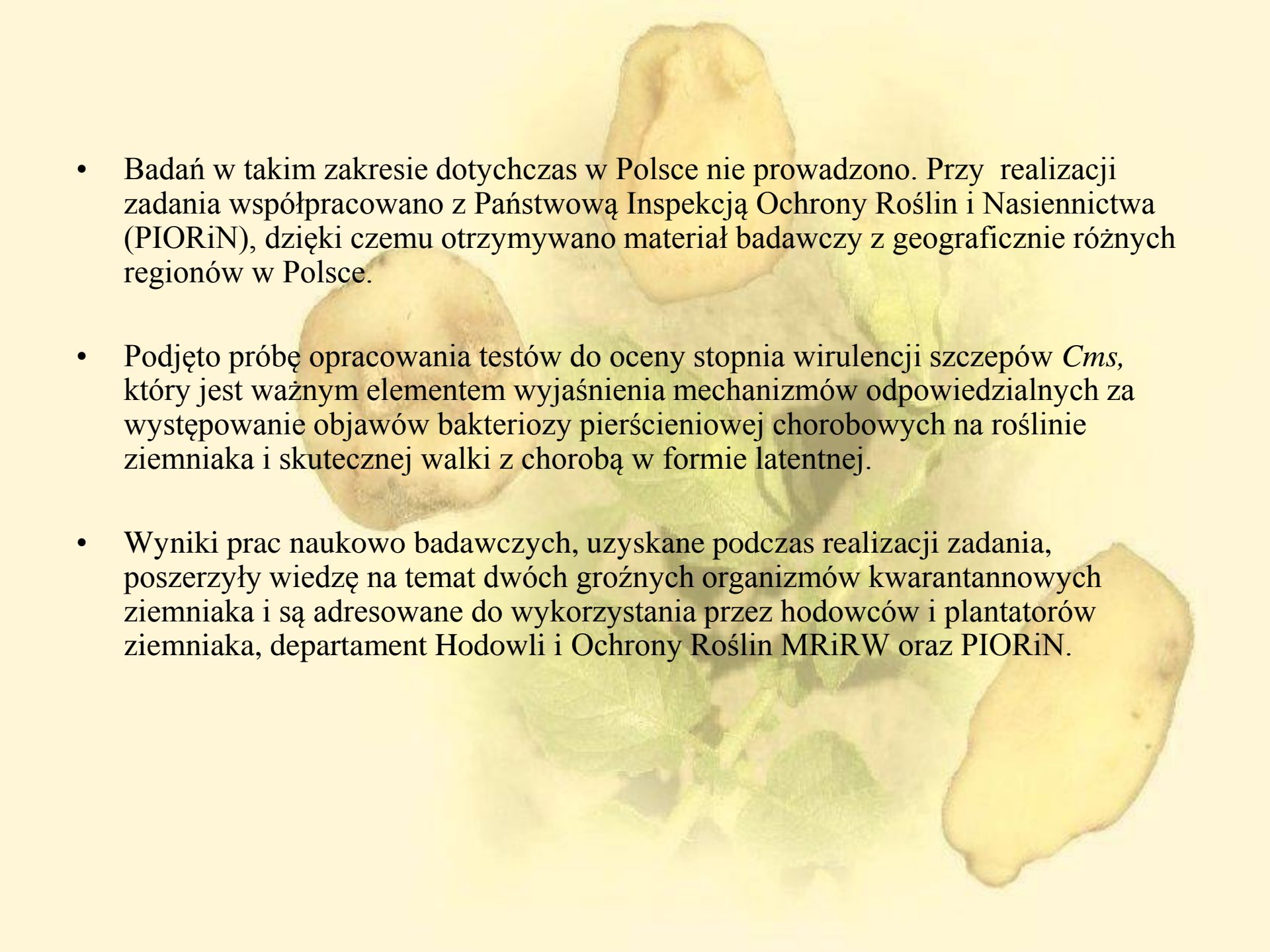
Zijlstra C., Lund I., Justesen A., Nicolaisen M., Jensen P.K., Bianciotto V., Posta K., Balestrini R., Przetakiewicz A., Czembor E., van de Zande J. 2011. Combining novel monitoring tools and precision application technologies. *Pest Management Science* 67 (6): 616–625).

Pastuszewska T., Gryń G., Franke K. 2010. Podatność odmian ziemniaka na porażenie przez *Clavibacter michiganensis* subsp. *sepedonicus*. *Prog. Plant Protection/Post. Ochr. Roślin* 50 (1): 244-248.

Pastuszewska T., Gryń G., Lisowska M., Węgierek A. 2010. Ocena patogeniczności izolatów *Clavibacter michiganensis* subsp. *sepedonicus* względem bakłażana (*Solanum melongena*) i ziemniaka (*Solanum tuberosum*). *Biul. IHAR* 257/258: 49-56.

Pastuszewska T., Gryń G. 2013. Aktywność celulolityczna a wirulencja *Clavibacter michiganensis* subsp. *sepedonicus*. *Biul. IHAR* 270: 123-131.

Pastuszewska T., Gryń G., Węgierek A., Przetakiewicz A. 2014. Śledzenie zmian patogeniczności w populacjach *Clavibacter michiganensis* subsp. *sepedonicus* – sprawcy bakteriozy pierścieniowej ziemniaka oraz *Ralstonia solanacearum* – sprawcy śluzaka ziemniaka. s. 249-257. W: „Ulepszanie roślin dla zrównoważonych agrosystemów, wysokiej jakości żywności i produkcji roślinnej na cele nieżywnościowe” Monografie i rozprawy naukowe IHAR-PIB 48 (E. Arseniuk, red.) Wyd. IHAR-PIB Radzików, 407 ss.

- 
- The background of the slide features a soft-focus image of several potato tubers and green leaves, creating a naturalistic and agricultural context for the text.
- Badań w takim zakresie dotychczas w Polsce nie prowadzono. Przy realizacji zadania współpracowano z Państwową Inspekcją Ochrony Roślin i Nasiennictwa (PIORiN), dzięki czemu otrzymywano materiał badawczy z geograficznie różnych regionów w Polsce.
 - Podjęto próbę opracowania testów do oceny stopnia wirulencji szczepów *Cms*, który jest ważnym elementem wyjaśnienia mechanizmów odpowiedzialnych za występowanie objawów bakteriozy pierścieniowej chorobowych na roślinie ziemniaka i skutecznej walki z chorobą w formie latentnej.
 - Wyniki prac naukowo badawczych, uzyskane podczas realizacji zadania, poszerzyły wiedzę na temat dwóch groźnych organizmów kwarantannowych ziemniaka i są adresowane do wykorzystania przez hodowców i plantatorów ziemniaka, departament Hodowli i Ochrony Roślin MRiRW oraz PIORiN.