

Lp. w zał. do Rozporządzenia MRiRW: 57.

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

Kierownik zadania: **dr 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.

#### Materiały i metody:

W celu opracowywania materiałów do izolacji bakterii Cms z tkanek roślinnych i wody, w pierwszej części zadania pozyskano, charakteryzowano i odpowiednio selekcjonowano na potrzeby badań szczepy bakterii Cms oraz innych patogenów ziemniaka. Na bazie tych pierwszych opracowywano specyficznie działające cząstki receptorowe, które umieszczano na uprzednio wyselekcjonowanych i opracowanych matrycach uzyskując docelowo materiały do selektywnej izolacji Cms. Opracowane materiały oceniano w obecności soku różnych odmian ziemniaka stosując jako odnośną zalecany przez EPPO test IFAS. Oceniano jednocześnie przydatność dwóch różnych metod izolacji IgG, jak również sposób blokowania powierzchni immunosorbenta białkami z soku bulw ziemniaka.

Analizując stopień degradacji DNA oraz czułość testu PCR oceniano przydatność 4 różnych metod izolacji DNA bakterii Cms z wody oraz soku roślinnego. Na bazie metody dającej najczulszy wynik w teście PCR opracowano procedurę specyficznej izolacji i identyfikacji bakterii Cms z ww. mediów. Jako odnośne stosowano dwa komercyjne zestawy do izolacji genomowego DNA z bakterii.

W dalszej części zadania badano podatność różnych odmian ziemniaka na porażenie bakteriami Cms. W tym celu z krajowego rejestru odmian ziemniaka wyselekcjonowano na potrzeby badań 16 odmian ziemniaka zróżnicowanych pod kątem wartości użytkowej i agrotechnicznej, wczesności i zawartości skrobi oraz pochodzenia (odmiany polskie i zagraniczne). Badane odmiany impregnowano zawiesiną bakterii Cms, a następnie wysadzono na początku maja na specjalnie przygotowanych do tego celu mikropoletkach doświadczalnych o różnych profilach glebowych. Podatność i stopień porażenia badanych odmian oceniano zarówno na podstawie objawów makroskopowych, jak i testów diagnostycznych na obecność bakterii Cms. Diagnostykę przeprowadzano w trakcie wegetacji roślin oraz po zbiorze bulw ziemniaka, stosując jako próby badawcze odpowiednio tkanki (liście i łodygi) porażonych roślin oraz bulwy potomne ziemniaka.

Aby określić wpływ czynników zewnętrznych na stopień porażenia, w okresie wegetacyjnym prowadzono obserwacje terminów wschodów, kwitnienia i zasychania roślin oraz obserwacje pod kątem objawów porażenia części nadziemnej porażonych roślin ziemniaka. Dodatkowo każdy z profili glebowych biorących udział w doświadczeniu badano pod kątem właściwości chemicznych natomiast w trakcie wegetacji dokonywano regularnego pomiaru temperatury i wilgotności tych gleb oraz temperatury powietrza.

W kolejnym zadaniu z udziałem roślin *in vitro* ziemniaka, oceniano zdolność bakterii Cms do infekowania roślin utrzymywanych w kulturach *in vitro*. Prowadzono badania mające na celu opracowanie efektywnego sposobu porażania roślin *in vitro* bakteriami Cms, następnie opracowania metody izolacji i identyfikacji tych bakterii z roślin *in vitro* oraz selekcji odmian ziemniaka o największej wrażliwości na porażenie Cms. Badania wykonywano przy udziale odmian ziemniaka wyselekcjonowanych we wcześniejszej części zadania. Spośród 4 opracowanych sposobów porażania, wyselekcjonowano najbardziej efektywny, który stosowano w dalszej części badań z udziałem całej puli badanych odmian. W celu zbadania stopnia porażenia badanych roślin bakteriami Cms, opracowano warunki pozwalające na molekularną ocenę komórek obecnych wewnątrz badanych roślin po uprzedniej maceracji tkanek tych roślin. Opracowane warunki pozwoliły na przeprowadzenie badań i różnicowanie badanych odmian pod względem wrażliwości na porażenie bakteriami Cms.

Dalsze prace badawcze związane były z identyfikacją potencjalnych źródeł zakażeń mikrobiologicznych w pożywkach hodowlanych roślin *in vitro* oraz opracowaniem metodyki zapobiegania tego typu kontaminacjom. W celu ustalenia potencjalnych źródeł występowania oraz

dróg rozprzestrzeniania zakażeń mikrobiologicznych z udziałem bakterii Cms, opracowano schemat postępowania z roślinami *in vitro* w Banku Genów Ziemniaka. Dla wyznaczonych miejsc potencjalnego porażenia komórkami sprawcy bakteriozy pierścieniowej ziemniaka, prowadzono badania mające na celu opracowanie metodyki zapobiegania kontaminacjom mikrobiologicznym w Banku Genów. W tym celu opracowywano i charakteryzowano substancje koloidalne wykazujące działanie antymikrobiologiczne w stosunku do bakterii Cms. Następnie poprzez impregnację podłoży wzrostowych dla roślin *in vitro* oceniano fitotoksyczność tych substancji względem badanych roślin *in vitro*. Badania prowadzono na podstawie obserwacji makroskopowych oraz współczynnika rozmnażania wyznaczonego dla średniej z 10-ciu powtórzeń dla każdego z przyjętych wariantów badania.

#### Wyniki i dyskusja:

Wyselekcjonowano, scharakteryzowano i zróżnicowano materiał biologiczny do badań w postaci szczepów bakterii Cms oraz innych patogenów ziemniaka, jak również 16 odmian ziemniaka.

W wyniku badań przeprowadzonych w pierwszej części zadania opracowano materiały do izolacji bakterii Cms z tkanek roślinnych i wody. Na bazie odpowiednio dobranych i scharakteryzowanych pod względem mukoidalności oraz patogeniczności szczepów bakterii Cms, opracowano nowej jakości cząsteczki receptorowe, które w odróżnieniu od dostępnych komercyjnie przeciwciał pozwalały na specyficzne wykrywanie wszystkich badanych szczepów Cms. Spośród dwóch ocenianych metod, które wykazały równoważną przydatność w izolacji IgG, wybrano metodę mniej czasochłonną.

Dzięki odpowiedniej konfiguracji cząstek receptorowych oraz powierzchni matryc, opracowano materiały do selektywnej izolacji bakterii Cms. Prowadzone próby polepszenia właściwości opracowanych materiałów poprzez blokowanie ich powierzchni białkami z soku różnych odmian ziemniaka nie przyniosły zakładanych rezultatów, w wyniku czego powierzchnie matryc pokrywano powszechnie stosowanym do tego celu białkiem blokującym.

Spośród badanych metod izolacji DNA bakterii Cms, za najbardziej przydatną uznano metodę pozwalającą uzyskać najwyższą czułość testu PCR oraz niezdegradowane DNA bakteryjne. Stosowane jako odnośne komercyjne zestawy do izolacji genomowego DNA z bakterii wykazały mniejszą czułość w izolacji DNA z soku, ale lepszą z wody. Przy pomocy wybranej metody izolacji DNA bakteryjnego oraz opracowanych materiałów do selektywnej izolacji bakterii Cms, opracowano procedurę specyficznej izolacji i identyfikacji bakterii Cms z prób z prób takich, jak woda oraz sok roślinny.

Wykazano przydatność opracowanej metody zarówno w identyfikacji prób przygotowanych w warunkach laboratoryjnych, jak i prób pozyskanych ze środowiska naturalnego (pola). Wyniki uzyskane w pierwszym przypadku w zewnętrznych laboratoriach potwierdziły przydatność opracowanych rozwiązań w izolacji Cms w obecności komponentów soku różnych odmian ziemniaka, wskazując na wyższą skuteczność izolacji oraz łatwość wykorzystania opracowanych sorbentów w odróżnieniu od zalecanego przez EPPO testu IFAS. Natomiast badania prowadzone na próbach w warunkach polowych pozyskanych w okresie wegetacji z tkanek porażonych roślin oraz po zbiorze z bulw potomnych ziemniaka wykazały lepszą przydatność standardowego testu IFAS w identyfikacji prób latentnych oraz większą skuteczność opracowanej metody w analizie prób wykazujących symptomy choroby.

Zastosowanie metod diagnostycznych oraz wykonana w okresie wegetacji roślin analiza parametrów gleby, warunków atmosferycznych oraz ocena objawów makroskopowych na roślinach i bulwach potomnych pozwoliły określić wpływ czynników zewnętrznych na stopień porażenia bakteriami Cms badanych odmian, jak również wykazać zróżnicowanie w wrażliwości badanych odmian na obecność w tkance ziemniaka bakterii Cms.

Prace z udziałem wyselekcjonowanych odmian ziemniaka w formie roślin *in vitro* pozwoliły ocenić zdolność bakterii Cms do infekowania roślin utrzymywanych w kulturach *in vitro*. Spośród 4 opracowanych sposobów porażania roślin *in vitro* testowanych na dwóch odmianach, wyselekcjonowano najbardziej efektywny, który stosowano w dalszej części badań z udziałem całej puli badanych odmian. Opracowano również skuteczny sposób izolacji i identyfikacji tych bakterii z roślin *in vitro*, co pozwoliło na selekcję odmian ziemniaka o największej wrażliwości na porażenie Cms. Prawdopodobnie wskutek zbyt silnej presji patogenicznych bakterii Cms, praktycznie wszystkie rośliny badanych odmian *in vitro* wykazywały symptomy chorobowe związane m. innymi z brakiem

ukorzenia, nekrozami liści oraz częściowym bądź całkowitym zahamowaniem wzrostu. Na podstawie uzyskanych wyników badane odmiany podzielono na silnie i średnio podatne na bakteriozę pierścieniową.

W wyniku analizy czynności w Banku Genów, przeprowadzonej na podstawie ankiety, za potencjalne źródła zakażeń mikrobiologicznych uznano momenty związane z wprowadzaniem do banku nowych odmian/rodów, jak również momenty namnażania/pasażowania istniejących w banku zasobów. Aby zapobiegać powstawaniu i rozprzestrzenianiu się kontaminacji w tych miejscach, prowadzono badania zmierzające do opracowania metodyki pozwalającej zapobiegać tego typu kontaminacjom w Banku Genów. W tym celu opracowano i scharakteryzowano substancje koloidalne wykazujące działanie antymikrobiologiczne w stosunku do bakterii Cms. Następnie poprzez impregnację podłoży wzrostowych dla roślin *in vitro* oceniano fitotoksyczność tych substancji względem badanych roślin *in vitro*. Opracowane substancje koloidalne o działaniu antibakteryjnym w stosunku do bakterii Cms różniły się między sobą stopniem fitotoksycznego oddziaływania na rośliny ziemniaka w kulturach *in vitro*.