



INSTYTUT HODOWLI I AKLIMATYZACJI ROŚLIN  
– PAŃSTWOWY INSTYTUT BADAWCZY  
W RADZIKOWIE

Zakład Nasiennictwa i Ochrony Ziemiaka w Boninie

# *Nasiennictwo i ochrona ziemiaka*

*48. konferencja  
naukowo-szkoleniowa*



Dźwirzyno  
13-15 maja 2015 r.

Bonin 2015

## CHARAKTERYSTYKA PATOGENICZNOŚCI WYBRANYCH SZCZEPÓW *CLAVIBACTER MICHIGANENSIS* SUBSP. *SEPEDONICUS* Z KOLEKCJI ZAGRANICZNYCH

dr inż. Teresa Pastuszevska, dr inż. Grzegorz Gryń  
IHAR-PIB Oddz. w Bydgoszczy, al. Powstańców Wlkp. 10, 85-090 Bydgoszcz  
e-mail: t.pastuszevska@ihar.bydgoszcz.pl

**P**atogen ziemniaka *Clavibacter michiganensis* subsp. *sepedonicus* (*Cms*) nadal stanowi poważne zagrożenie dla upraw, powodując straty plonów oraz wzrost kosztów produkcji wynikających z nałożenia kwarantanny na producentów ziemniaków. Zapobieganie występowaniu i zwalczanie tego mikroorganizmu jest szczególnie trudne z wielu powodów. Poznanie dróg rozprzestrzeniania się bakterii *Cms* w dużym stopniu pozwoli na ograniczenie występowania bakteriozy pierścieniowej ziemniaka, choroby, której jest sprawcą. Bardzo ważne jest również poznanie mechanizmów pozwalających bakteriom *Cms* zasiedlać wiązki przewodzące ziemniaka. Często mimo stwierdzania obecności komórek *Cms* w materiale pobranym z części nadziemnej roślin lub bulw ziemniaka nie obserwuje się charakterystycznych objawów chorobowych.

Występowanie symptomów choroby w postaci chloroz liści, więdnienia części lodyg, zmian w tkance przewodzącej bulw zależy od odmiany ziemniaka, koncentracji patogenu w roślinie i czynników środowiskowych. Wyizolowane z roślin bakterie *Cms* mogą różnić się stopniem patogeniczności (wirulencją). Spośród poznanych czynników wirulencji wymienia się wydzielane zewnątrzkomórkowo enzymy celulolityczne, białka indukujące nadwrażliwość oraz wytwarzane otoczki egzopolisacharydowe – EPS (Baer, Gudmestad 1995; Jahr i in. 1999; Nissinen i in. 2001).

Celem badań była charakterystyka patogeniczności wybranych szczepów *C. michiganensis* subsp. *sepedonicus* z kolekcji zagranicznych. W badaniach użyto 15 szczepów pochodzących z National Collection of Plant Pathogenic Bacteria, York w Wielkiej Brytanii (NCPBPB). W doświadczeniu przeprowadzono test płytkowy określający aktywność celulolityczną, test biologiczny na roślinie bakłazana, ocenę wizualną kolonii oraz opracowywano metodykę określającą stopień mukoidalności szczepów użytych do badania.

Aktywność celulolityczną stwierdzono po posianiu zawiesin *Cms* na pożywkę z dodatkiem soli sodowej karboksymetylocelulozy (cmc). Po 10 dniach inkubacji w temperaturze 21°C zaznaczono obszar kolonii bakterii, a następnie wybarwiono płytki roztworem czerwieni Kongo. Po 15 min płytki odbarwiono 1M roztworem NaCl. Wielkość strefy niezabarwionej w obrębie kolonii świadczyła o ilości wydzielanego enzymu celulolitycznego. Testy wykonano w trzech powtórzeniach.



W teście patogeniczności użyto siewki bakłażana odmiany Black Beauty w stadium trzeciego liścia. Test wykonano w trzech terminach, każdorazowo inokulując zawiesiną danego szczepu *Cms* 10 roślin bakłażana. W trakcie eksperymentu określano powierzchnię blaszek liściowych z charakterystycznymi objawami, wyrażoną w procentach.

W metodyce opisującej poziom mukoidalności – ilości wytwarzanej przez bakterie *Cms* otoczki egzopolisacharydowej – użyto 7-dniowej hodowli bakterii. Na wadze analitycznej odważano 0,1 g inokulum bakteryjnego każdego szczepu, a następnie wykonywano szereg 10-krotnych rozcieńczeń (0,9% NaCl) i posiew na podłoże YPGA. Jednocześnie wykonano pomiar gęstości optycznej (OD) otrzymanych zawiesin. Pomiary OD przeprowadzano na spektrofotometrze (Shimadzu UV-2100) przy długości fali  $\lambda = 600$  nm (wyniki niezamieszczone).

Otrzymane wyniki przedstawiają duże zróżnicowanie szczepów *Cms* z kolekcji NCCPB pod kątem patogeniczności wyrażonej ilością wydzielanego enzymu celulazy i powierzchnią blaszki liściowej z objawami chorobowymi inokulowanych roślin bakłażana (tab. 1). Większość przebadanych szczepów była mukoidalna.

Opracowanie odpowiednich testów oceniających stopień wirulencji szczepów *Cms* jest pierwszym krokiem do wyjaśnienia mechanizmów odpowiedzialnych za występowanie objawów chorobowych na roślinie i skutecznej walki z bakteriozą pierścieniową ziemniaka w formie latentnej. Opracowywany test stwierdzający ilość wydzielanego egzopolisacharydu z próbki inokulum bakteryjnego na podstawie pomiaru spektrofotometrycznego i posiewu na podłożu stałym pozwoli, w przypadku skrajnie różniących się mukoidalnością bakterii *Cms*, na doprecyzowanie warunków prowadzonych testów patogeniczności.

**Charakterystyka szczepów *Clavibacter michiganensis* subsp. *sepedonicus***

Szczep <i>Cms</i>	Strefa hydrolizy cmc na pożywce (mm)	Ocena wizualna mukoidalności kolonii <i>Cms</i>	Powierzchnia liści bakłażana z objawami (%)
NCPPB 3898	0,33(0,47)*	-	0
NCPPB 3896	0,58(0,32)	-	0
NCPPB 378	2,83(0,24)	+++	6,1(4,4)*
NCPPB 3385	1,75(0,50)	++	7,8(2,5)
NCPPB 3917	3,25(0,40)	+++	13,9(3,7)
NCPPB 379	3,04(0,21)	++	15,8(13,6)
NCPPB 2138	3,04(0,21)	+	17,1(6,7)
NCPPB 2140	1,08(0,35)	-	19,8(4,0)
NCPPB 4229	1,33(0,24)	++	24(14,0)
NCPPB 299	2,50(0,00)	+	26,2(4,0)
NCPPB 3295	3,04(0,48)	+++	28,4(5,0)
NCPPB 3294	2,87(0,25)	+++	29,6(10,2)
NCPPB 3324	4,29(0,34)	+++	29,6(3,7)
NCPPB 3296	4,04(0,08)	+++	34,5(10,5)
NCPPB 4053	4,00(0,00)	+++	38,4(4,7)

\* odchylenie standardowe

- brak mukoidalności, + mukoidalność słaba, ++ mukoidalność średnia, +++ mukoidalność duża

## LITERATURA

1. Baer D., Gudmestad N. C. 1995. In vitro cellulolytic activity of plant pathogen *Clavibacter michiganensis* subsp. *sepedonicus*. – Canad. J. Microbiol. 41 (10): 877-888
2. Jahr H., Bahro R., Ahlemeyer J., Eichenlaub R. 1999. Interactoins between *Clavibacter michiganensis* and its host plants. – Environ. Microbiol. 1(2): 113-118
3. Nissinen R., Kassuwi S., Peltola R., Metzler M. C. 2001. In planta – complementation of *Clavibacter michiganensis* subsp. *sepedonicus* strains deficient in cellulose production or HR induction restores virulence. – Eur. J. Plant Path. 107: 175-182

### PODATNOŚĆ WYBRANYCH ODMIAN ZIEMNIAKA NA PORĄŻENIE BAKTERIAMI *CLAVIBACTER MICHIGANENSIS* SUBSP. *SEPEDONICUS* W ZRÓŻNICOWANYCH WARUNKACH GLEBOWYCH

mgr Milena Pietraszko<sup>1</sup>, dr inż. Włodzimierz Przewodowski<sup>2</sup>  
dr inż. Teresa Pastuszewska<sup>3</sup>, dr inż. Grzegorz Gryń<sup>3</sup>

<sup>1</sup>IHAR-PIB Oddz. w Jadwisinie, ul. Szaniawskiego 15, 05-140 Jadwisin

<sup>2</sup>IHAR-PIB Zakład Nasiennictwa i Ochrony Ziemiaka w Boninie

<sup>3</sup>IHAR-PIB Oddz. w Bydgoszczy, al. Powstańców Wlkp. 10, 85-090 Bydgoszcz,  
e-mail: m.pietraszko@ihar.edu.pl

Podgatunek bakterii *Clavibacter michiganensis* subsp. *sepedonicus* (Cms) (Spickermann et Kotthoff) Davies et al., jest organizmem kwarantannowym wywołującym bakteriozę pierścieniową ziemniaka. Występowanie Cms na plantacjach powoduje znaczne straty gospodarcze. Bezpośrednie straty, które w Polsce występują sporadycznie, są efektem wędnięcia części nadziemnej ziemniaka, redukcji plonów i gnicia bulw podczas przechowywania. Znaczne są natomiast straty pośrednie, które wynikają z konieczności respektowania przepisów fitosanitarnych określonych w dyrektywach unijnych i krajowych rozporządzeniach, nakazujących utylizację ziemniaków, kilkuletni zakaz ich uprawy oraz ograniczenia w eksporcie.

Bakterioza pierścieniowa ziemniaka jest chorobą trudną do rozpoznania i zwalczania ze względu na zasiedlanie przez patogen systemu naczyniowego bulw, łodyg i liści, powolny rozwój objawów na roślinach oraz występowanie całkowicie bezobjawowej (latentnej) postaci choroby.

Rozwój objawów i nasilenie porażenia bakteriozą pierścieniową zależy od wielkości i rodzaju inokulum bakteryjnego, odmiany ziemniaka i warunków środowiskowych, takich jak temperatura, wilgotność i skład gleby. Nie wyhodowano do tej pory odmian odpornych na Cms, jedynie tolerancyjne, które mogą stanowić groźne źródło rozprzestrzeniania się bakterii w bulwach porażonych latentnie (Van der Wolf 2005).

Praca stanowi wstępne opracowanie wyników trwających badań, którego celem jest ocena podatności odmian ziemniaka wybranych z krajowego rejestru na sztuczną inokulację zawieszoną komórek Cms w zależności od warunków glebowych.

Porównywano dwie odmiany średnio późne skrobiowe pochodzące z polskiej hodowli: Bosman i Ikar. Sadzeniaki tych odmian inokulowano zawiesiną patogenicznego szczepu Cms. Sadzeniaki nieinokulowane stanowiły kontrolę negatywną. Bulwy wysadzano na mikropolet-