

**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:**

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.

**Materiały i metody:**

W ramach pierwszego z tematów dotyczącego opracowania materiałów i procedur do selektywnej izolacji bakterii Cms ze środowiska, prowadzono badania nad uzyskaniem specyficznych przeciwciał skierowanych na komórki bakterii Cms. W tym celu na bazie mieszanin różnych szczepów bakterii Cms opracowano 3 antygeny, które posłużyły do opracowania IgG anty-Cms. Po oczyszczeniu i zbadaniu jakości badanych przeciwciał, wybrane IgG anty-Cms o najlepszym mianie i specyficzności użyto do opracowania immunosorbentu do izolacji bakterii Cms z tkanek roślinnych. Efektywność działania opracowanej matrycy oceniano względem ekstraktów z bulw różnych odmian ziemniaka w warunkach laboratoryjnych oraz polowych.

W ramach kolejnego zadania oceniano wpływ warunków izolacji DNA z zawiesin bakteryjnych o różnej koncentracji na czułość testu molekularnego PCR. Badania wykonywano w obecności komponentów z soku ziemniaka, stosując do izolacji serię 7-miu 10-krotnych rozcieńczeń zawiesin silnie mukoidalnego szczepu Cms, cztery enzymy lityczne oraz trzy różne metody izolacji DNA. Jako kontrole stosowano odpowiednio próby bez enzymów oraz wodę molekularnie czystą. Jako metodę odnośną stosowano metodę izolacji DNA zalecaną przez EPPO. Jakość wyizolowanego DNA oceniano na podstawie pomiaru spektrofotometrycznego oraz na podstawie oceny wizualnej elektroforegramów uzyskanych przed i po wykonaniu testu PCR.

Skuteczność opracowanych materiałów i procedur w izolacji i identyfikacji bakterii Cms z prób pobranych w warunkach polowych oceniano w ramach trzeciego tematu badawczego. Badania prowadzono z udziałem 6-ciu odmian ziemniaka, będących przedstawicielami dwóch grup zróżnicowanych pod kątem podatności na porażenie bakteriami Cms oraz dwóch zróżnicowanych mukoidalnie, patogenicznych szczepów bakterii Cms. Próby analizowano zarówno w trakcie wegetacji roślin, jak i po zbiorze bulw ziemniaka badając zarówno tkanki porażonych roślin, jak i bulwy potomne ziemniaka. Stopień porażenia badanych odmian bakteriami Cms oceniano na podstawie 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 cyklicznie mierzono temperaturę i wilgotność stosowanych profili glebowych oraz temperaturę powietrza.

Badania związane z oceną wpływu koncentracji bakterii Cms w mieszaninie inokulacyjnej na poziom ekspresji objawów na badanych roślinach *in vitro* wykonano przy udziale dwóch odmian ziemniaka, wyselekcjonowanych uprzednio jako skrajnie reagujących na porażenie bakteriami Cms. Stopień porażenia badanych odmian oceniano stosując serię 10-cio krotnych rozcieńczeń mieszaniny 3 patogenicznych szczepów bakterii Cms. Rośliny *in vitro* po poddaniu działaniu zawiesin bakteryjnych, a następnie umieszczano w podłożach wzrostowych MS i inkubowano w optymalnych dla nich warunkach wzrostu. Stopień porażenia badanych roślin oceniano w trakcie wegetacji na podstawie objawów makroskopowych na roślinach oraz na podstawie wyniku testu PCR po izolacji DNA.

W ramach tematu dotyczącego opracowania warunków pozwalających zapobiegać kontaminacjom bakteriami Cms podłoży stosowanych do hodowli roślin *in vitro* ziemniaka, oceniano wpływ mieszanin 2 wybranych koloidów o właściwościach antymikrobiologicznych na stan roślin *in*

*in vitro* ziemniaka oraz żywotność bakterii Cms. Badania miały na celu opracowanie i 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:**

Wyniki badań uzyskane w ramach pierwszego tematu pozwoliły na opracowanie materiałów do izolacji bakterii Cms z prób środowiskowych. Na podstawie opracowanych antygenów, w procesie immunizacji królików uzyskano 3 surowice z IgG anti-Cms, które po oczyszczeniu badano pod kątem czułości i specyficzności względem badanych szczepów bakteryjnych. Przeciwciała co prawda miały miano podobne do opracowanych w roku poprzednim, ale charakteryzowały się zróżnicowaną specyficznością. Dlatego do opracowania immunopodłoża w bieżącym roku użyto przeciwciał dających najlepszy stosunek miana do specyficzności. Zastosowanie opracowanego wcześniej sposobu nanoszenia polimeru oraz odpowiedniego sposobu blokowania powierzchni pozwoliło na opracowanie funkcjonalnego immunopodłoża do izolacji bakterii Cms z soku ziemniaka w warunkach laboratoryjnych oraz polowych.

Badania wykonane w ramach kolejnego tematu badawczego, mające na celu zbadanie wpływu warunków izolacji DNA z zawiesin bakteryjnych na czułość testu molekularnego PCR, pozwoliły na ocenę skuteczności badanych metod izolacji DNA bakterii Cms w obecności wody oraz komponentów soku ziemniaka. Jakość wyizolowanego DNA oceniano na podstawie pomiaru spektrofotometrycznego oraz oceny wizualnej elektroforegramów uzyskanych przed i po przeprowadzeniu testu PCR. Metoda, która charakteryzowała się największą ilością DNA podczas izolacji w obecności soku, jednocześnie skutkowała wysokim stopniem degradacji materiału genetycznego. Okazało się jednak, że degradacja DNA nie skutkowała w znaczący sposób obniżeniem czułości testu PCR. Efektywność izolacji DNA, szczególnie w przypadku komórek Cms zawieszonych w soku ziemniaka w znaczący sposób poprawił dodatek enzymów litycznych.

Opracowane materiały oraz metodyka izolacji DNA bakteryjnego pozwoliły w temacie 3 na porównanie stopnia porażenia badanych roślin oraz bulw potomnych. Badane odmiany wykazały zróżnicowaną podatność na sztuczną inokulację bakteriami Cms obu szczepów. Stopień porażenia bakteriami Cms zależał w dużej mierze od profilu glebowego, ale większe znaczenie miał rodzaj użytego do inokulacji szczepu Cms. Wyniki wskazują na większą efektywność szczepu silnie mukoidalnego. Najmniejszą podatność uzyskano dla odmian Courage, Annabelle i Ikar, natomiast największe porażenie bulw zanotowano u odmian Gwiazda, Jurek i Sagitta. Stosowanie profilu glebowego miało wpływ na wysokość plonu i liczbę bulw potomnych. Praktycznie we wszystkich kontrolach pozytywnych i w większości kontroli negatywnych badanych odmian stwierdzono obecność bulw zgniłych. Metody IFAS i PCR w znacznym stopniu korelowały ze sobą potwierdzając wyższy indeks porażenia prób z bulw niż z roślin, niezależnie od wykrywanego szczepu Cms.

Wyniki badań uzyskane w ramach tematu 4, dotyczące zdolności bakterii Cms do infekowania roślin utrzymywanych w kulturach *in vitro*, pozwoliły ocenić wpływ koncentracji bakterii Cms na poziom ekspresji objawów chorobowych dwóch odmian oraz czułość testu molekularnego w badanych tkankach roślin *in vitro*. W porównaniu do wcześniejszych badań z użyciem jednego szczepu Cms, zaobserwowano, że zastosowanie mieszaniny 3 patogenicznych szczepów bakterii Cms spowodowało znacznie silniejsze oddziaływanie fitotoksyczne w stosunku do badanych roślin *in vitro*. Oceniono, iż badane odmiany wykazywały skrajnie zróżnicowaną wrażliwość na obecność badanych bakterii Cms, ale nawet w przypadku odmiany tolerancyjnej przy zastosowaniu dużych koncentracji Cms, nie obserwowano całkowitej tolerancji na porażenie. Obecność bakterii w tkance 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 opracowanie mieszaniny nanocząsteczek dwóch koloidów metali charakteryzujących się właściwościami antybakteryjnymi w stosunku do bakterii Cms. Poprzez dobranie odpowiedniej koncentracji dla każdego z koloidów, zdołano opracować warunki pozwalające uzyskać działanie antymikrobiologiczne koloidów oraz uniknąć działania fitotoksycznego nanocząsteczek na badane kultury *in vitro* ziemniaka.