

Zadanie nr 31



Badania nad opracowaniem metod identyfikacji i ograniczenia rozprzestrzeniania się kwarantannowych bakterii (w produkcji wyjściowej) ziemniaka.

Okres realizacji: 2023 rok

Zespół wykonawców projektu:

Projekt został realizował zespół liczący łącznie 13 osób w 3 podzespołach badawczych, w tym:

Kierownik: dr hab. inż. W. Przewodowski¹⁾ e-mail: w.przewodowski@ihar.edu.pl

Wykonawcy: dr. G.Gryń³⁾, dr inż. K.Franke³⁾, mgr inż. D.Michałowska²⁾, mgr inż. K.Sadowska¹⁾, mgr inż. L.Michałowska³⁾, mgr inż. B. Płóciennik²⁾, mgr inż. D. Białoskórska²⁾, inż. M. Marciniak¹⁾, 1 osoba na stanowisku st.technika, 2 osoby na stanowisku technika i 1 pracownik gospodarczy.

1) Podzespół 1 w Zespole Diagnostyki Molekularnej i Biochemii IHAR – PIB O/Bonin. Tematy 1-3. Łącznie 5 osób (w tym Kierownik) .

2) Podzespół 2 w Zespole Banku Genów In Vitro IHAR – PIB O/Bonin. Temat 3. Łącznie 5 osób

3) Podzespół 3 w Zespole Chorób i Szkodników Kwarantannowych Ziemniaka IHAR – PIB O/Bydgoszcz. Temat 1. Łącznie 3 osoby.

Cele projektu

Celem ogólnym badań objętych projektem jest opracowanie sposobów pozwalających na szybką i specyficzną identyfikację oraz zapobieganie rozprzestrzenianiu się kwarantannowych bakterii (w produkcji wyjściowej) ziemniaka, ze szczególnym uwzględnieniem tkanki roślin *in vitro* ziemniaka.

Cel główny osiągnięto poprzez realizację celów poszczególnych tematów badawczych:

- ✓ Temat 1: Ocena podatności badanych odmian ziemniaka na porażenie przez *C. sepedonicus* i *R. solanacearum* oraz opracowanie przeciwciał skierowanych na bakterie *R. solanacearum*.
- ✓ Temat 2: Ocena wrażliwości starterów molekularnych względem zróżnicowanych warunków izolacji bakterii *R. solanacearum*.
- ✓ Temat 3: Ocena możliwości zwalczania bakterii *R. solanacearum* w kulturach *in vitro* badanych odmian.

Wszystkie założone cele zostały osiągnięte.

Materiały i metody

Materiał biologiczny w projekcie stanowił 12 odmian ziemniaka (w formie bulw oraz kultur *in vitro*) oraz wzorcowe szczepy bakterii, w tym 9 szczepów *C. sepedonicus*, 9 szczepów z gatunku *Ralstonia* oraz 10 innych, referencyjnych szczepów bakterii ziemniaka.

- ✓ Bulwy wszystkich badanych odmian ziemniaka oceniano pod względem podatności/odporności na wybrane choroby ziemniaka (w tym raka ziemniaka (*S.endobioticum*), mątwika ziemniaczanego i agresywnego (*G.rostochiensis/ G.pallida*), mokrą i suchą zgniliznę ziemniaka (*Pectobacterium* ssp./*Fusarium* ssp.) oraz na obecność kwarantannowych bakterii *R. solanacearum* i *C. sepedonicus*. Dodatkowo dwie odmiany skrajnie zróżnicowane pod względem podatności na obecność bakterii Rs posłużyły w formie kultur *in vitro* w temacie 3 do oceny efektywności działania 2 substancji o charakterze antymikrobiologicznym.
- ✓ Wszystkie badane w projekcie szczepy kwarantannowych bakterii *Ralstonia*, *C. sepedonicus* oraz inne patogeny ziemniaka posłużyły w temacie 1 do opracowania i oceny jakości przeciwciał anti-Rs, natomiast po jednym wirulentnym szczepie Cs i Rs użyto również do oceny odporności badanych odmian ziemniaka, którą wykonano w warunkach fitotronowych. 9 badanych szczepów bakterii *Ralstonia* posłużyło w temacie 2 do badań molekularnych, natomiast 1 wirulentny szczep Rs8 w temacie 3 użyto w ocenie efektywności działania substancji o charakterze antymikrobiologicznym w zwalczaniu Rs obecnych w badanych kulturach *in vitro*.
- ✓ Jakość opracowanych w ramach 1 tematu badawczego surowic zawierających IgG anty-Rs badano testem PTA-ELISA w obecności wszystkich badanych szczepów bakterii oraz komercyjnego zestawu ELISA.
- ✓ Wrażliwość wyselekcjonowanych do diagnostyki bakterii Rs starterów molekularnych oceniano w ramach tematu badawczego 2 stosując zróżnicowane warunki izolacji bakterii *Ralstonia*, natomiast
- ✓ Opracowane w poprzednim roku substancje o charakterze antydrobnoustrojowym posłużyły w ramach zadania 3 do sporządzania mieszanin, których efektywność antymikrobiologiczną oceniano po uprzedniej inokulacji kultur *in vitro* 2 badanych odmian komórkami silnie wirulentnego szczepu *R. solanacearum*.

Ważniejsze wyniki i wnioski

Tabela 1. Podatność/odporność badanych odmian na wybrane choroby ziemniaka.

Lp.	Odmiana	Rak ziemniaka (<i>S. endobioticum</i>)*								Mątwik ziemniaczany (<i>G. rostochiensis</i>)**					Mątwik agresywny (<i>G. pallida</i>)**			Mokra zgnilizna (<i>Pectobacterium</i> ssp.)***		Sucha zgnilizna (<i>Fusarium</i> ssp.)****	
		1(D1)	2(G1)	2(Ch1)	3(M1)	6(O1)	8(F1)	18(T1)	39(P1)	38(Nevsehir)	Ro1	Ro2	Ro3	Ro4	Ro5	Pa1	Pa2	Pa3	Stożek odporności	Stożek odporności	
1	Amarant	1	1	nb	1	nb	nb	1	nb	nb	9	nb	nb	nb	nb	1	2	1	5,0	6,5	
2	Boryna	1	5	5	5	5	5	5	nb	nb	9	nb	8	9	2	2	1	1	3,0	5,8	
3	Gwiazda	2	nb	5	5	5	5	5	nb	nb	9	2	8	9	2	1	1	1	3,3	4,0	
4	Ignacy	1	5	5	4	5	5	5	nb	nb	9	5	6	9	2	1	1	2	1,0	7,0	
5	Jubilat	1	2	nb	2	nb	nb	4	nb	nb	9	8	9	9	3	1	1	1	3,0	6,5	
6	Jurek	2	nb	5	4	5	4	5	nb	nb	9	2	8	9	1	1	1	2	3,5	5,0	
7	Kuba	1	nb	2	2	2	2	2	2	2	9	4	9	9	2	1	1	1	2,0	6,0	
8	Magnolia	1	5	nb	5	nb	nb	5	nb	nb	9	nb	nb	nb	nb	1	1	1	5,0	6,8	
9	Skawa	2	nb	5	5	5	5	5	nb	nb	9	4	8	9	4	1	1	1	4,0	1,0	
10	Stokrotka	1	4	nb	4	nb	nb	5	nb	nb	9	nb	nb	nb	nb	1	2	1	3,0	6,5	
11	Surmia	2	nb	5	5	5	5	5	nb	nb	9	9	9	4	1	2	1	1	4,5	6,0	
12	Widawa	1	nb	4	5	4	4	5	5	nb	9	2	7	9	1	1	1	1	1,8	6,0	

Wzorzec odporności *	
Stożek	Stożek odporności
1	całkowicie odporne
2	odporne
3	słabo odporne
4	podatne
5	bardzo podatne

Wzorzec odporności **	
Stożek	Stożek odporności
1	bardzo wysoki
2	wysoki
3	wysoki do b. wysoki
4	umiarowany do wysoki
5	umiarowany
6	niski do umiarowanego
7	niski
8	b. niski do niski
9	b. niski

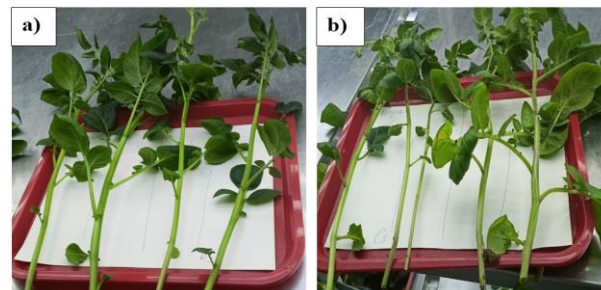
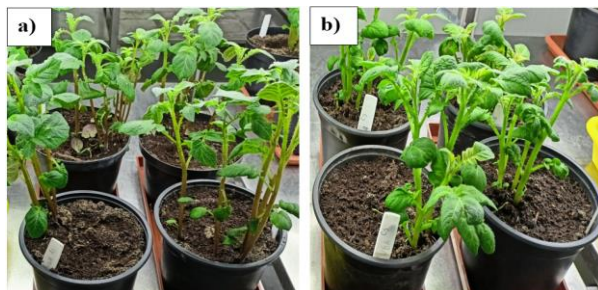
Wzorzec odporności *** ****	
Stożek	Stożek odporności
1	odporne
2	odporne
3	średnio odporne
4	średnio podatne
5	podatne
6	podatne
7	bardzo podatne

Tabela 2. Miano badanych przeciwciał anti-Rs

Miano	Szczep Rs 8		Szczep Rs 2	
	A450	SD	A450	SD
KN	0,042	0,006	0,044	0,005
1000000 x	0,123	0,008	0,583	0,010
100000 x	1,099	0,017	2,134	0,009
10000 x	2,150	0,032	2,632	0,014
1000 x	3,222	0,102	3,688	0,081
100 x	3,854	0,375	3,822	0,245

Tabela 3. Specyficzność badanych przeciwciał anti-Rs

Bakterie	Badane szczepy	Zestaw z Loewe (DAS-ELISA)	IgG anti-Rs (PTA-ELISA)
KN	Bufor	-	-
	Rs 1	+	+
	Rs 2	+	+
	Rs 3	+	+
	Rs 4	+	+
	Rs 5	+	+
	Rs 6	+	+
	Rs 7	-	+
	Rs 8	+	+
	Rs 9	+	+
Szczepy bakterii <i>Ralstonia</i>	Cs 1	-	-
	Cs 2	-	-
	Cs 3	-	-
	Cs 4	-	-
	Cs 5	-	-
	Cs 6	-	-
	Cs 7	-	-
	Cs 8	-	-
	Cs 9	-	-
Szczepy bakterii <i>C. sepedonicus</i>	In 1	-	-
	In 2	-	-
	In 3	-	-
	In 4	-	-
	In 5	-	(+)
	In 6	-	-
	In 7	-	-
	In 8	-	-
	In 9	+	-
	In 10	-	-

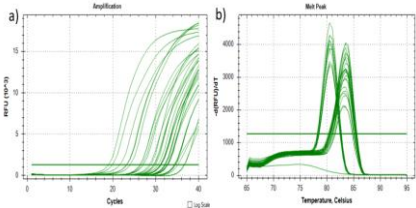


Rys. 1. Widok roślin inokulowanych zawiesiną wirulentnych szczepów *R. solanacearum* a) i *C. sepedonicus* b).

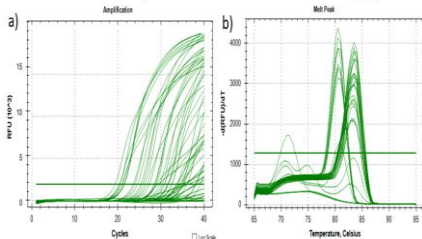
Rys. 2. Widok roślin przygotowanych do testu IFAS z sadzianek inokulowanych zawiesiną Rs a) i Cs b).

- ✓ Oceniono podatność 12 badanych odmian na porażenie bakteriami *R. solanacearum* i *C. sepedonicus*.
- ✓ Pomimo braku makroskopowych objawów porażenia bakteriami Rs i Cs na roślinach uzyskanych z inokulowanych bulw, zastosowana metodyka oceny pozwoliła w znacznym stopniu zdiagnozować porażenie latentne badanych prób.
- ✓ Dla uzyskania wyższej czułości konieczne jest powtórzenie badań po uprzednim wprowadzeniu modyfikacji w konstrukcji półek w pomieszczeniu fitotronowym.
- ✓ Oceniono podatność badanych odmian ziemniaka wobec 5 ważniejszych chorób ziemniaka.
- ✓ Badane odmiany wykazywały skrajne zróżnicowanie podatności na badane choroby, jak również na poszczególne szczepy/patotypy w obecności których prowadzono badania.
- ✓ Opracowane przeciwciała anti-Rs charakteryzowały się b. wysokim mianem oraz specyficznością.

Ważniejsze wyniki i wnioski



Rys 3. Krzywe amplifikacji a) oraz topnienia b) w teście Real-Time PCR z udziałem starterów NmUlt oraz DNA 9 szczepów gatunku *Ralstonia* izolowanego z wody H₂O.

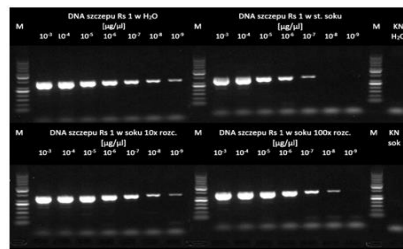


Rys 4. Krzywe amplifikacji a) oraz topnienia b) w teście Real-Time PCR z udziałem starterów NmUlt oraz DNA 9 szczepów gatunku *Ralstonia* izolowanego z soku bulw ziemniaka.

Tabela 4 Przykładowy wynik liczby cykli (Cq) i temperatur topnienia (Melt) w Real-Time PCR ze starterami NmUlt oraz DNA szczepu Rs1 izolowanego z wody i soku ziemniaka.

Badany szczep	Medium	NmUlt - Cq DNA [ng/ul]						KN (H ₂ O)	KN sok
		10 ³	10 ⁴	10 ⁵	10 ⁶	10 ⁷	10 ⁸		
Rs 1	H ₂ O	16,52	21,55	26,07	29,43	31,04	32,65	35,24	-
	Sok x1	20,31	28,96	30,21	31,26	31,81	-	-	-
	Sok x10	17,85	23,01	27,45	29,97	31,39	32,87	36,01	-
	Sok x100	26,83	30,25	31,09	32,09	34,29	35,09	-	-

Badany szczep	Medium	NmUlt - Melt DNA [ng/ul]						KN (H ₂ O)	KN sok
		10 ³	10 ⁴	10 ⁵	10 ⁶	10 ⁷	10 ⁸		
Rs 1	H ₂ O	83,50	83,50	83,50	83,50	83,50	83,50	83,00	-
	Sok x1	83,50	83,50	83,50	84,00	83,50	-	-	-
	Sok x10	83,50	83,50	83,50	83,50	83,50	83,50	83,50	-
	Sok x100	84,00	83,50	83,50	83,50	83,50	83,50	-	-



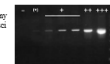
Rys 5. Przykładowy elektroforegram produktów amplifikacji testu PCR ze starterami NmUlt z DNA szczepu Rs1 izolowanego z wody i soku ziemniaka.

Tabela 5, 6 Wyniki oceny czułości starterów NmUlt w klasycznym teście PCR i Real-Time PCR.

Badany szczep	Medium	NmUlt PCR DNA [ng/ul]							KN (H ₂ O)	KN sok
		10 ³	10 ⁴	10 ⁵	10 ⁶	10 ⁷	10 ⁸	10 ⁹		
Rs 1	H ₂ O	+++	+++	+++	++	++	+	+	-	-
	Sok x1	+++	+++	+++	++	++	+	+	-	-
	Sok x10	+++	+++	+++	++	++	+	+	-	-
	Sok x100	+++	+++	+++	++	++	+	+	-	-

Badany szczep	Medium	NmUlt Real-Time PCR DNA [ng/ul]							KN (H ₂ O)	KN sok
		10 ³	10 ⁴	10 ⁵	10 ⁶	10 ⁷	10 ⁸	10 ⁹		
Rs 1	H ₂ O	+++	+++	++	+	+	+	+	-	-
	Sok x1	+++	+++	+++	++	++	+	+	-	-
	Sok x10	+++	+++	+++	++	++	+	+	-	-
	Sok x100	+++	+++	+++	++	++	+	+	-	-

Wzrost oceny wyniku testu PCR:
 (+) Brak pasm, wynik negatywny
 - Pasm na granicy widzialnosci
 - Wlasczny, czysty pasm
 +++ Wyniczny gruby pasm
 +++ Rz pasm pasm



Wzrost oceny wyniku testu Real-Time PCR:
 + brak amplifikacji, wynik negatywny
 ++ amplifikacja powyzej 28 cyklu
 +++ amplifikacja miedzy 22 a 28 cyklem
 ++++ amplifikacja powyzej 12 cyklu

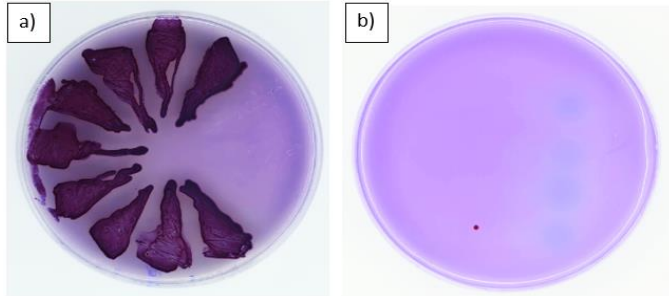
- ✓ Oceniono działanie starterów NmUlt w zróżnicowanych warunkach izolacji DNA i w obecności 9 szczepów *Ralstonia*.
- ✓ Uzyskane wyniki badań wskazują na dużą przydatność badanych starterów w obu wykonanych testach molekularnych.
- ✓ Zastosowanie starterów w detekcji bakterii pozwoliło uzyskać b. dużą czułość oraz specyficzność detekcji, natomiast multipleks 4 par różnicujących starterów umożliwił dodatkowo identyfikację fлотypów badanych szczepów *Ralstonia*.
- ✓ Najwyższy próg detekcji DNA uzyskano dla prób DNA izolowanych z wody oraz z 10x rozc. DNA z soku ziemniaka, natomiast najniższą czułość uzyskano dla prób DNA izolowanych w obecności skoncentrowanego soku.
- ✓ 10-krotne rozcieńczenie DNA z soku wyraźnie zmniejszyło inhibicję amplifikacji i podniosło czułość detekcji do poziomu DNA prób z wody, z kolei dalsze rozcieńczenie DNA z soku powodowało obniżenie czułości testu.
- ✓ Z uwagi na uzyskane wyniki, warto kontynuować badania i sprawdzić, czy stosowanie 10-krotnych rozcieńczeń prób DNA izolowanych w obecności soków różnych odmian oraz tkank ziemniaka umożliwi usprawnienie detekcji EPPO.

Ważniejsze wyniki i wnioski

Tabela. 7. Wpływ mieszaniny nanocząstek koloidu Ag i Tween 20 na badane szczepy *R. solanacearum*.

Lp.	Badane szczepy <i>Ralstonia</i>	Obecność kolonii bakterijnych				
		Mieszanina CollAg + Tween 20				
		5%	0,5%	0,05%	0,005%	0%
1.	Rs 1	-	-	(+)	+	+
2.	Rs 2	-	-	-	+	+
3.	Rs 3	-	-	-	+	+
4.	Rs 4	-	-	(+)	+	+
5.	Rs 5	-	-	(+)	+	+
6.	Rs 6	-	-	-	+	+
7.	Rs 7	-	-	(+)	+	+
8.	Rs 8	-	-	-	(+)	+
9.	Rs 9	-	-	(+)	+	+
10.	KN (bez Rs)	-	-	-	-	-

+ kolonie obecne, - brak kolonii, (+) znikoma ilość kolonii



Rys 6. Przykładowy elektroforegram produktów amplifikacji testu PCR ze starterami Nmult z DNA szczepu *Rs1* izolowanego z wody i soku ziemniaka.

Tabela. 8 i 9. Wpływ różnych koncentracji mieszaniny koloidu srebra i Tween 20 względem kultur *in vitro* odmian 3 i 11 ziemniaka inokulowanych bakteriami silnie wirulentnego szczepu *Rs8*.

Lp.	Koloid Ag + Tween 20 w podłożu MS	Kultury <i>in vitro</i> inokulowane <i>Rs8</i> (KP)	Test obecności <i>Rs</i> w MS	Kultury <i>in vitro</i> bez <i>Rs</i> (KN)	Test obecności <i>Rs</i> w MS	Lp.	Koloid Ag + Tween 20 w podłożu MS	Kultury <i>in vitro</i> inokulowane <i>Rs8</i> (KP)	Test obecności <i>Rs</i> w MS	Kultury <i>in vitro</i> bez <i>Rs</i> (KN)	Test obecności <i>Rs</i> w MS
1.	5,00 + 0,5 %		-		-	6.	5,00 + 0,5 %		-		-
2.	0,50 + 0,5 %		-		-	7.	0,50 + 0,5 %		-		-
3.	0,05 + 0,5 %		-		-	8.	0,05 + 0,5 %		-		-
4.	0,005+0,5 %		(+)		-	9.	0,005+0,5 %		(+)		-
5.	KN		+		-	10.	KN		+		-

- ✓ Oceniono wpływ mieszaniny 2 substancji o charakterze antydrobnoustrojowym względem 9 badanych szczepów bakterii *Ralstonia* oraz kultur *in vitro* 2 odmian ziemniaka.
- ✓ Zastosowanie obu substancji spowodowało efekt antymikrobiologiczny w stosunku do wszystkich badanych szczepów *Ralstonia* i w niewielkim stopniu (przy najwyższej koncentracji) powodowało oddziaływanie fitotoksyczne w stosunku do badanych kultur *in vitro*.
- ✓ Działanie antydrobnoustrojowe badanej mieszaniny substancji obserwowano wyraźnie w badanych podłożach MS z roślinami inokulowanymi bakteriami szczepu *Rs8*, natomiast nie uzyskano efektu sterylizacji samych inokulowanych bakteriami roślin.
- ✓ Przyczyną braku działania antymikrobiologicznego substancji w roślinach mógł być brak penetracji tych substancji do tkanek roślin i jednoczesna możliwość wnikania przez aparaty szparkowe *Rs*, co pokazała wykonana analiza mikroskopu elektronowego TEM.
- ✓ Z uwagi na powyższe konieczne jest podjęcie dalszych badań mających na celu przebadanie nowych bardziej efektywnych substancji.

Wykaz publikacji wyników projektu w 2023 roku

Doniesienia konferencyjne:

1. Przewodowski W., Sadowska K., Marciniak M. 2023. Innowacje i badania dotyczące diagnostyki kwarantannowych bakterii ziemniaka. (Prezentacja) [W:] 53 Konferencja naukowo-szkoleniowa IHAR-PIB ON Bonin "Nasiennictwo i ochrona ziemniaka", Mielno, 11-12.05.2023. Streszczenia: 17.
2. Przewodowski W., Gryń G., Michałowska D., Franke K., Michałowska L., Sadowska K., Cichońska E., Płóciennik B., Białoskórska D. and Przewodowska A. 2023. Variety of pathogenicity of *Ralstonia solanacearum* strains (Poster) [In:]. 12th International Congress of Plant Pathology (ICPP) org. przez ISPP (The International Society for Plant Pathology) Lyon, Francja: 20-25.08.2023 r.: P8.3-010.

Publikacje w opracowaniu:

1. Przewodowski W., Szarek D., Michałowska D., Gryń G., Salamońska K., Łabańska M., Sadowska K., Płóciennik B., Białoskórska D. and Przewodowska A. Sensitivity of different potato cultivars to the presence of *Ralstonia solanacearum* bacteria in *in vitro* cultures.
Publikacja planowana do *Frontiers in Plant Science*, obecnie w trakcie korekty językowej.