

Zadanie nr 31



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

Okres realizacji: 2022 rok

Zespół wykonawców projektu:

Projekt został realizował zespół liczący łącznie 12 osób w 3 podzespołach badawczych, w tym:

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

Wykonawcy: dr. G.Gryń³⁾, dr inż. M. Łabańska¹⁾, dr inż. P. Dederko-Kantowicz¹⁾, dr inż. K.Franke³⁾, mgr inż. K.Sadowska¹⁾, mgr inż. D.Michałowska²⁾, mgr inż. E.Cichońska¹⁾, mgr inż. L.Michałowska³⁾, 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 7 osób (w tym Kierownik).

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

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

Cele projektu

Głównym celem projektu jest opracowanie metod identyfikacji i ograniczenia rozprzestrzeniania się kwarantannowych bakterii (w produkcji wyjściowej) ziemniaka.

Cel główny osiągnięto poprzez realizację celów poszczególnych tematów badawczych:

- ✓ Ocena badanego materiału biologicznego oraz opracowanie przeciwciał skierowanych na bakterie *R. solanacearum*. (Temat 1).
- ✓ Ocena czułości wybranych par starterów molekularnych względem zróżnicowanych szczepów bakterii *R. solanacearum*. (Temat 2).
- ✓ Ocena wrażliwości bakterii *R. solanacearum* oraz kultur *in vitro* badanych odmian na obecność substancji o charakterze antymikrobiologicznym. (Temat 3).

Wszystkie założone cele zostały osiągnięte.

Materiały i metody

Jako materiał biologiczny w ramach projektu stosowano 12 odmian ziemniaka (w formie roślin/bulw oraz kultur *in vitro*), 1 odmianę pomidora zwyczajnego oraz wzorcowe szczepy bakterii, w tym 9 szczepów *C. sepedonicus*, 9 szczepów *R. solanacearum* i 10 innych, referencyjnych bakterii ziemniaka.

- ✓ Wyselekcjonowane w ubiegłym roku odmiany ziemniaka charakteryzowano i oceniano pod względem podatności na wybrane niekwarantannowe choroby ziemniaka w ramach tematu badawczego 1, a następnie formie kultur *in vitro* w temacie 3 projektu oceniano pod kątem fitotoksyczności w obecności dwóch substancji o charakterze antymikrobiologicznym.
- ✓ Badane szczepy kwarantannowych bakterii *R. solanacearum*, *C. sepedonicus*, jak również inne patogeny ziemniaka w temacie 1 posłużyły do oceny patogeniczności w teście biologicznym na pomidorze, teście IFAS i CMC, jak również do opracowania i oceny jakości przeciwciał anti-Rs. Szczepy *R. solanacearum* posłużyły dodatkowo w temacie 2 do oceny czułości i specyficzności wyselekcjonowanych w poprzednim roku starterów molekularnych oraz w temacie 3 do oceny wrażliwości na obecność substancji o charakterze antymikrobiologicznym.
- ✓ Opracowane w ramach tematu badawczego 1 poliklonalne przeciwciała anti-Rs badano testem ELISA pod kątem czułości i specyficzności.
- ✓ Wyselekcjonowane do badań startery molekularne PCR i Real-Time PCR oceniano w ramach tematu badawczego 2 pod kątem efektywności w diagnostyce molekularnej bakterii *R. solanacearum*.
- ✓ Opracowane substancje o charakterze antydrobnoustrojowym, w tym nanocząsteczki koloidu oraz detergent posłużyły w ramach zadania 3 do opracowania mieszanin, które oceniano pod kątem fitotoksyczności na badane kultury *in vitro* oraz oddziaływania antybakteryjnego względem badanych szczepów Rs.

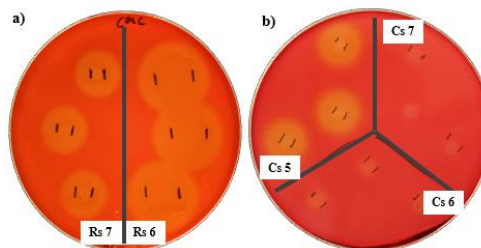
Ważniejsze wyniki i wnioski

Tabela 1. Podatność badanych w projekcie odmian ziemniaka na zarazę i parcha srebrzystego ziemniaka.

Badana odmiana	Użytkowanie	Grupa wczesności	Zaraza ziemniaka		Parch srebrzysty	
			Stopień w skali porażenia bulw	Odporność wg skali*	Stopień porażenia bulw	Odporność wg skali**
1.	Skr.	śr. późna	2	b. podatna	38,8 %	podatna
2.	Skr.	śr. wczesna	4	podatna	29,2 %	podatna
3.	Jad.	wczesna	4	podatna	9,5 %	śr. podatna
4.	Jad.	wczesna	2	b. podatna	9,3 %	śr. podatna
5.	Skr.	śr. wczesna	4	podatna	10,3 %	śr. podatna
6.	Jad.	śr. wczesna	5	śr. podatna	5,9 %	śr. odporna
7.	Skr.	śr. wczesna	4	podatna	22,6 %	podatna
8.	Jad.	wczesna	6	śr. odporna	8,1 %	śr. podatna
9.	Skr.	późna	4,5	podatna	10,1 %	śr. podatna
10.	Jad.	wczesna	1	b. podatna	3,9 %	odporna
11.	Jad.	b. wczesna	4	podatna	7,1 %	śr. podatna
12.	Skr.	śr. wczesna	4	podatna	11,3 %	śr. podatna



Rys. 1. Widok roślin pomidora w teście biologicznym inokulowanych awirulentnym a) i wirulentnym b) szczepem Rs.



Rys. 2. Aktywność hydrolityczna szczepów *R. solanacearum* a) i *C. sepedonicus* b) w teście CMC.

Tabela 2. Specyficzność badanych przeciwciał anti-Rs oceniana metodą DAS- i PTA-ELISA.

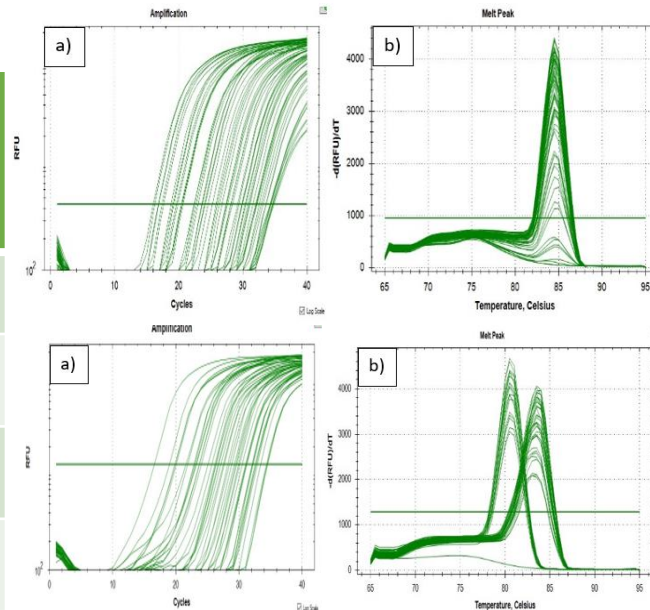
Bakterie	Badane szczepy	Zestaw z Loewe (DAS-ELISA)	IgG anti-Rs (PTA-ELISA)	
KN	Bufor	-	-	
	Szczepy bakterii <i>R. solanacearum</i>	Rs 1	+	+
		Rs 2	+	+
		Rs 3	+	+
		Rs 4	+	+
		Rs 5	+	+
		Rs 6	+	+
		Rs 7	-	+
		Rs 8	+	+
		Rs 9	+	+
Szczepy bakterii <i>C. sepedonicus</i>	Cs 1	-	-	
	Cs 2	-	-	
	Cs 3	-	-	
	Cs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

- ✓ Oceniono podatność 12 odmian ziemniaka na 2 niekwwarantannowe choroby ziemniaka.
- ✓ Oceniono wirulencję bakterii *R. solanacearum* oraz *C. sepedonicus* testem biologicznym, testem IFAS i CMC.
- ✓ Badane szczepy wykazywały skrajne różnicowanie pod kątem wirulencji i zdolności do hydrolizy celulozy.
- ✓ Ocena wirulencji testem biologicznym na pomidorze korelowała z wynikami testu IFAS, CMC i z wynikami ubiegłorocznych badań na bakłażanie i pozwoliła podzielić badane szczepy na silnie-, średnio- oraz awirulentne.
- ✓ Opracowano przeciwciała poliklonalne na komórki bakterii *R. solanacearum*.
- ✓ Uzyskane wyniki testu PTA-ELISA potwierdziły obecność specyficznych przeciwciał anti-Rs w badanej surowicy krwi, jednak dla uzyskania lepszego miana i specyficzności konieczna jest kontynuacja badań.

Ważniejsze wyniki i wnioski

Tabela 3. Startery typowane do badań molekularnych z *R. solanacearum*.

Lp.	Startery	Region kodowania genomu	Numer filotypu	
1	Para 1	16S rDNA	Filotyp I, II i III	
2.	Multipleks	Para 1	16–23S rRNA	Filotyp I
		Para 2	16–23S rRNA	Filotyp II
		Para 3	16–23S rRNA	Filotyp III
		Para 4	16–23S rRNA	Filotyp IV



Rys 3 i 4. Krzywe amplifikacji a) oraz krzywe topnienia b) badanego DNA 9 szczepów bakterii *R. solanacearum* testem Real-Time PCR przy zastosowaniu starterów Oli1/Y2 i Nmult.

Tabela 4 i 5. Wyniki oceny czułości starterów Oli1/Y2 i Nmult w teście Real-Time PCR.

Oli1-Y2 – Real-time PCR								
Szczep	10 ⁻³	10 ⁻⁴	10 ⁻⁵	10 ⁻⁶	10 ⁻⁷	10 ⁻⁸	10 ⁻⁹	KN
Rs	µg/ul	µg/ul	µg/ul	µg/ul	µg/ul	µg/ul	µg/ul	(H ₂ O)
Rs 1	+++	++	++	+	+	+	+	-
Rs 2	+++	++	++	+	+	+	+	
Rs 3	+++	++	++	+	+	+	-	
Rs 4	+++	++	++	+	+	+	+	
Rs 5	+++	+++	++	++	+	+	+	
Rs 6	+++	++	++	+	+	-	-	
Rs 7	+++	+++	++	+	+	-	-	
Rs 8	+++	++	++	+	+	+	+	
Rs 9	+++	++	+	+	+	+	+	
Nmult – Real-time PCR								
Szczep	10 ⁻³	10 ⁻⁴	10 ⁻⁵	10 ⁻⁶	10 ⁻⁷	10 ⁻⁸	10 ⁻⁹	KN
Rs	µg/ul	µg/ul	µg/ul	µg/ul	µg/ul	µg/ul	µg/ul	(H ₂ O)
Rs 1	++++	+++	++	+	+	+	+	-
Rs 2	+++	++	++	+	+	+	+	
Rs 3	++++	+++	++	++	+	+	-	
Rs 4	++++	+++	++	++	+	+	+	
Rs 5	+++	++++	++	++	+	+	+	
Rs 6	++++	++++	++	++	+	-	-	
Rs 7	++++	+++	++	++	+	+	-	
Rs 8	++++	+++	++	++	+	+	-	
Rs 9	++++	+++	++	++	+	+	+	

- ✓ Oceniono czułość detekcji DNA bakterii *R. solanacearum* przy użyciu dwóch testów molekularnych oraz 2 wyselekcjonowanych kompletów starterów Oli1-Y2 oraz Nmult.
- ✓ Wykonane badania PCR i Real-Time PCR pozwoliły na ustalenie progu detekcji DNA badanych szczepów Rs i selekcję starterów do dalszych badań w projekcie.
- ✓ Spośród badanych starterów bardziej przydatne okazały się startery Nmult umożliwiające diagnostykę wszystkich badanych szczepów Rs z jednoczesnym wyszczególnieniem ich filotypów.
- ✓ Badany multipleks starterów Nmult okazał się również relatywnie czulszy względem badanych szczepów starterów w obu badanych testach molekularnych.
- ✓ Wybrane startery wykrywały w sposób specyficzny wszystkie badane filotypy gatunku *Ralstonia* i jednocześnie nie reagowały niespecyficznym z innymi badanymi szczepami bakteryjnymi.





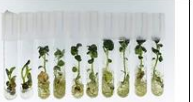





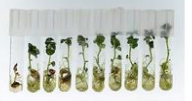







Ważniejsze wyniki i wnioski

Tabela. 6 i 7. Wpływ nanocząsteczek koloidu Ag i Tween 20 na badane szczepy *R. solanacearum*.

Lp.	Badane szczepy <i>R. solanacearum</i>	Obecność kolonii bakterijnych				
		Koncentracja koloidu Ag				KN
		5%	0,5%	0,05%	0,005%	
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)	-	-	-	-	-

Lp.	Badane szczepy <i>R. solanacearum</i>	Obecność kolonii bakterijnych				
		Koncentracja detergentu				KN
		1%	0,1%	0,01%	0,001%	
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)	-	-	-	-	-

Tabela. 8 i 9. Wpływ różnych stężeń nanocząsteczek koloidu srebra oraz Tween 20 względem kultur *in vitro* badanych odmian ziemniaka.

Lp.	Koncentracja koloidu Ag	Odmiana 3	Odmiana 11	Lp.	Koncentracja detergentu	Odmiana 3	Odmiana 11
		1.	5%				
2.	0,5%			2.	0,1%		
3.	0,05%			3.	0,01%		
4.	0,005%			4.	0,001%		
5.	KN			5.	KN		

- ✓ Oceniono wpływ 2 substancji o charakterze antydrobnoustrojowym względem 9 badanych szczepów bakterii *R. solanacearum* oraz kultur *in vitro* 2 odmian ziemniaka.
- ✓ Zastosowanie obu substancji spowodowało efekt antymikrobiologiczny w stosunku do badanych szczepów Rs, ale jednocześnie przy najwyższych stężeniach powodowało oddziaływanie fitotoksyczne w stosunku do kultur *in vitro* badanych odmian.
- ✓ Działanie antydrobnoustrojowe obu substancji zaobserwowano u wszystkich badanych szczepów *R. solanacearum*, aczkolwiek relatywnie bardziej efektywny w zwalczaniu bakterii okazał się koloid srebra.
- ✓ Pomimo tego, iż relatywnie wyższy efekt fitotoksyczny zaobserwowano w przypadku stosowania detergentu Tween 20, niższe stężenia obu substancji wpływały korzystnie na wiele parametrów ocenianych cech fenotypowych badanych roślin.

Ważniejsze osiągnięcia projektu w 2022 roku

- ✓ Scharakteryzowano i oceniono podatność 12 odmian na wybrane choroby ziemniaka.
- ✓ Dokonano oceny wirulencji 9 szczepów kwarantannowych bakterii *R. solanacearum* oraz *C. sepedonicus* testem biologicznym oraz testem CMC.
- ✓ Ocena wirulencji potwierdzona testem IFAS i CMC korelowała z wynikami ubiegłorocznych badań i pozwoliła podzielić badane szczepy na silnie-, średniopatogeniczne oraz awirulentne.
- ✓ Opracowano przeciwciała poliklonalne skierowane na komórki bakterii *Rs*
- ✓ Oceniono efektywność działania 2 wybranych kompletów starterów molekularnych do diagnostyki bakterii *R. solanacearum* testami PCR i Real-Time PCR.
- ✓ Oceniono wrażliwość kultur *in vitro* 2 odmian ziemniaka oraz bakterii *R. solanacearum* względem dwóch substancji antymikrobiologicznych.

Wykaz publikacji wyników projektu w 2022 roku

Doniesienia konferencyjne:

1. Przewodowski W., Szarek D., Michałowska D., Gryń G., Salamońska K., Łabańska M., Przewodowska A. 2022. Sensitivity of different potato cultivars to the presence of *Ralstonia solanacearum* bacteria in *in vitro* cultures. 11 World Potato Congress (WPC). 30.05.-2.06.2022 Dublin, Irlandia: Poster P-036.
2. Przewodowski W., Salamońska K., Szarek D. 2022. Detection and identification of different strains of *Ralstonia solanacearum* using selected molecular primers in PCR and Real-Time PCR tests. Kraków, Polska: 21st Triennial Conference of the European Association for Potato Research (EAPR) 4-8.06.2022 r. Kraków: Poster 4.P01.

Opracowane publikacje:

1. Gryń G., Franke K., Michałowska L., Nowakowski M., Przewodowski W., Łabańska M., Kuźdowicz K., Sadowska K. 2022. Differentiation of virulence of *Ralstonia solanacearum* strains in a biological test with the use of *Solanum melongena* L. and *Solanum lycopersicum* L. Plant Protection Science (*Publikacja w recenzji*).