

Zadanie nr 31



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

Okres realizacji: 2021

Zespół wykonawców projektu:

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

Kierownik: dr hab. inż. W. Przewodowski²⁾ e-mail: w.przewodowski@ihar.edu.pl oraz

Wykonawcy: dr. G.Gryń³⁾, dr inż. M. Łabańska¹⁾, dr inż. P. Dederko-Kantowicz¹⁾, mgr inż. K.Salamońska¹⁾, mgr inż. D.Szarek¹⁾, mgr inż. D.Michałowska²⁾, mgr inż. K.Franke³⁾, mgr inż. M. Nowakowski³⁾ oraz 4 osoby na stanowisku technika.

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

2) Podzespół 2 w Pracowni Zasobów Genowych i Kultur in vitro IHAR – PIB O/Bonin. Tematy 1-3. Łącznie 5 osób (w tym Kierownik).

3) Podzespół 3 w Pracowni 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:

- ✓ Opracowanie i charakterystyka materiału biologicznego do badań oraz opracowanie warunków pozwalających na uzyskanie przeciwciał skierowanych na bakterie *R. solanacearum*. (Temat 1).
- ✓ Opracowanie i optymalizacja warunków identyfikacji bakterii *R. solanacearum* metodami molekularnymi (Temat 2).
- ✓ Identyfikacja potencjalnych źródeł zakażeń mikrobiologicznych, ze szczególnym uwzględnieniem ryzyka kontaminacji organizmami kwarantannowymi podłoży stosowanych do hodowli roślin *in vitro* oraz ocena wrażliwości bakterii Rs 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 bakłażana oraz wzorcowe szczepy bakterii, w tym 9 szczepów *C. sepedonicus*, 9 szczepów *R. solanacearum* i 10 innych, referencyjnych bakterii ziemniaka.

- ✓ Wyselekcjonowane w bieżącym roku odmiany ziemniaka zróżnicowano pod względem wczesności, użyteczności i zawartości skrobi, przebadano i scharakteryzowano w ramach tematu badawczego 1, a następnie formie kultur *in vitro* w temacie 3 zadania oceniano pod kątem wrażliwości na bakterie *R. solanacearum*, jak również w ocenie fitotoksyczności w obecności dwóch substancji o charakterze antymikrobiologicznym.
- ✓ Wyselekcjonowane do badań kwarantannowe bakterie *R. solanacearum*, *C. sepedonicus*, jak również inne patogeny ziemniaka w temacie 1 posłużyły do oceny patogeniczności na bakłażanie oraz do opracowania i oceny jakości przeciwciał anti-Rs, w temacie 2 do oceny czułości i specyficzności starterów molekularnych do identyfikacji bakterii *R. solanacearum*, natomiast w temacie 3 do inokulacji i oceny wrażliwości roślin *in vitro* na obecność bakterii *R. solanacearum*.
- ✓ 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 weryfikowano pod kątem ich przydatności w diagnostyce molekularnej bakterii *R. solanacearum* w ramach tematu badawczego 2.
- ✓ Opracowane substancje o charakterze antydrobnoustrojowym, w tym nanocząsteczki koloidu srebra, jak również detergent posłużyły w ramach zadania 3 do opracowania mieszanin, które oceniano pod względem fitotoksyczności na badane kultury *in vitro* oraz oddziaływania antybakteryjnego na badane szczepy Rs.

Ważniejsze wyniki i wnioski

Tabela 1. Wykaz odmian ziemniaka do badań w projekcie.

Lp.	Odmiana	Rok wpisu do KR	Użytk.	Grupa wczesności	Typ kulinarny
1.	Odmiana 1	2016	Skr.	śr. późna	C
2.	Odmiana 2	2012	Skr.	śr. wczesna	BC
3.	Odmiana 3	2011	Jad.	wczesna	B
4.	Odmiana 4	2012	Jad.	wczesna	B
5.	Odmiana 5	2011	Skr.	śr. wczesna	C
6.	Odmiana 6	2012	Jad.	śr. wczesna	B
7.	Odmiana 7	1999	Skr.	śr. wczesna	C
8.	Odmiana 8	2015	Jad.	wczesna	B-BC
9.	Odmiana 9	2000	Skr.	późna	C
10.	Odmiana 10	2017	Jad.	wczesna	B-BC
11.	Odmiana 11	2020	Jad.	b. wczesna	AB
12.	Odmiana 12	2015	Skr.	śr. wczesna	BC



Rys. 1. Test patogenności na bakłażanie odmiany Black Beauty z udziałem awirulentnego (a) i silnie patogenicznego (b) szczepu *Ralstonia solanacearum*.

Tabela 2. Wykaz bakterii *R. solanacearum* wyselekcjonowanych do badań.

Lp.	Szczep	Pochodzenie	Rok izolacji	Żywiciel	Rasa	Filotyp	Biovar
1.	Rs 1	USA	1953	Pomidor doniczkowy	1	IIA-7	1
2.	Rs 2	Gujana Fr.	1960	Pomidor zwyczajny	1	I	3
3.	Rs 3	Cypr	1963	Ziemniak	3	IIB	2
4.	Rs 4	Szwecja	1972	Ziemniak	3	IIB	2
5.	Rs 5	Australia	1997	Ziemniak	bd	I	3
6.	Rs 6	Chiny	1997	Morwa	5	I	5
7.	Rs 7	Sri Lanka	1997	Ziemniak	4	I	4
8.	Rs 8	Egipt	1998	Ziemniak	3	IIB	2
9.	Rs 9	Niemcy	1996	Ziemniak	bd	bd	2

Tabela 3 i 4. Wykaz bakterii *C. sepedonicus* i innych wybranych do badań.

Lp.	Szczep	Poch.	Rok izol.	Żywiciel	Lp.	Szczep	Poch.	Rok izol.	Żywiciel
1.	Cs 1	Kanada	1951	Ziemniak	1.	In 1	Dania	1952	Ziemniak
2.	Cs 2	Szwecja	1956	Ziemniak	2.	In 2	UK	1958	Ziemniak
3.	Cs 3	Kanada	1968	Ziemniak	3.	In 1	Dania	1952	Ziemniak
4.	Cs 4	USA	1942	Ziemniak	4.	In 2	Polska	1995	Ziemniak
5.	Cs 5	Bd	1983	Ziemniak	5.	In 1	Polska	1986	Jabłoń
6.	Cs 6	Szocja	1994	Ziemniak	6.	In 2	Australia	1984	Ziemniak
7.	Cs 7	Ukraina	1994	Ziemniak	7.	In 1	UK	1983	Ziemniak
8.	Cs 8	Szwecja	1994	Ziemniak	8.	In 2	UK	1973	Ziemniak
9.	Cs 9	Cypr	2001	Ziemniak	9.	In 1	Holandia	2010	Ziemniak
					10.	In 2	Litwa	Bd	Pomidor

- ✓ Wyselekcjonowano, scharakteryzowano i przebadano 12 odmian ziemniaka.
- ✓ Wyselekcjonowano, scharakteryzowano i przebadano 9 szczepów kwarantannowych bakterii *R. solanacearum* i *C. sepedonicus* oraz 10 innych patogenów ziemniaka.
- ✓ Badanie pod kątem mukoidalności pozwoliło wyróżnić u badanych szczepów *R. solanacearum* i *C. sepedonicus* 3 skrajnie zróżnicowane grupy bakterii, odpowiednio silnie-, średnio i niemukoidalne.
- ✓ Z kolei ocena wirulencji badanych szczepów *R. solanacearum* i *C. sepedonicus* testem biologicznym na bakłażanie, potwierdzona testem IFAS pozwoliła podzielić badane bakterie na silnie -, średnio i awirulentne.
- ✓ Badanie mukoidalności i wirulencji pozwoliło wytypować do opracowania antygeny 3 reprezentatywne dla każdej z grup szczepy *R. solanacearum*, które stały się podstawą do opracowania poliklonalnych przeciwciał anti-Rs.
- ✓ 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 5. Startery typowane do badań molekularnych z *R. solanacearum*.

Lp.	Startery	Region kodowania genomu	Numer filotypu
1	Para 1	16S rRNA	Filotyp I, II i III
2	Para 2	16–23S rRNA	Filotyp I
3	Para 3	16–23S rRNA	Filotyp II
4	Para 4	16–23S rRNA	Filotyp I
5	Para 5	16–23S rRNA	Filotyp II
6	Para 6	16–23S rRNA	Filotyp III
7	Para 7	16–23S rRNA	Filotyp IV

Tabela 6 i 7 Czulość detekcji badanych starterów wzgl. bakt. Rs 8 w teście PCR i Real-Time PCR.

Rs 8 10 ⁰ – 10 ⁷ jtk/ml PCR										
Startery	10 ⁷	10 ⁶	10 ⁵	10 ⁴	10 ³	10 ²	10 ¹	10 ⁰	KN	
Para 1	+++	++	++	++	++	+	-	-	-	
Para 2	-	-	-	-	-	-	-	-	-	
Para 3	+++	+++	++	++	(+)	-	-	-	-	
Para 4	-	-	-	-	-	-	-	-	-	
Para 5	+++	+++	++	++	++	+	-	-	-	
Para 6	-	-	-	-	-	-	-	-	-	
Para 7	-	-	-	-	-	-	-	-	-	

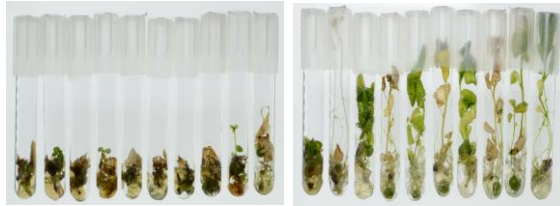
Rs 8 10 ⁰ – 10 ⁷ jtk/ml - Real-time PCR										
Startery	10 ⁷	10 ⁶	10 ⁵	10 ⁴	10 ³	10 ²	10 ¹	10 ⁰	KN	
Para 1	+++	++	+	+	+	+	(+)	-	-	
Para 2	-	-	-	-	-	-	-	-	-	
Para 3	+++	+++	++	++	+	(+)	-	-	-	
Para 4	-	-	-	-	-	-	-	-	-	
Para 5	+++	+++	++	++	+	+	(+)	-	-	
Para 6	-	-	-	-	-	-	-	-	-	
Para 7	-	-	-	-	-	-	-	-	-	

Tabela 8. Specyficzność wybranych starterów w teście PCR oraz Real-Time PCR.

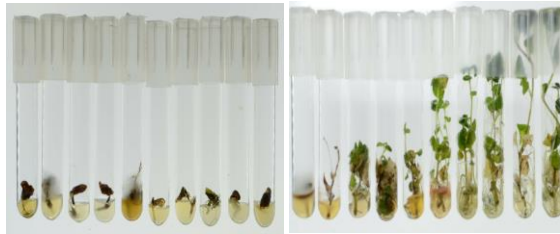
Bakterie	Badane szczepy	Startery Oli1-Y2		Startery NMult	
		PCR	Real-Time PCR	PCR	Real-Time PCR
KN	Bufor	-	-	-	-
	Rs 1	+	+	+	+
	Rs 2	+	+	+	+
	Rs 3	+	+	+	+
	Rs 4	+	+	+	+
	Rs 5	+	+	+	+
	Rs 6	+	+	+	+
	Rs 7	+	+	+	+
	Rs 8	+	+	+	+
	Rs 9	+	+	+	+
Szczepy bakterii <i>Ralstonia solanacearum</i>	Cs 1	-	-	-	-
	Cs 2	-	-	-	-
	Cs 3	-	-	-	-
	Cs 4	-	-	-	-
	Cs 5	-	-	-	-
	Cs 6	-	-	-	-
	Cs 7	-	-	-	-
	Cs 8	-	-	-	-
	Cs 9	-	-	-	-
Szczepy bakterii <i>Clavibacter sepedonicus</i>	In 1	-	-	-	-
	In 2	-	-	-	-
	In 3	-	-	-	-
	In 4	-	-	-	-
	In 5	-	-	-	-
	In 6	-	-	-	-
	In 7	-	-	-	-
	In 8	-	-	-	-
	In 9	-	-	-	-
	In 10	-	-	-	-

- ✓ Wytypowano i oceniono przydatność 7 par starterów molekularnych do identyfikacji bakterii *R. solanacearum*.
- ✓ Optymalizacja temperatury annealingu reakcji PCR i Real-Time PCR pozwoliła na ustalenie progu detekcji i selekcję starterów do dalszych badań w projekcie.
- ✓ Spośród badanych starterów najbardziej przydatnymi były startery Oli1-Y2 oraz Nmult umożliwiające diagnostykę wszystkich filotypów gatunku *Ralstonia* na poziomie 10¹ jtk/ml w teście Real-Time PCR oraz 10² jtk/ml w klasycznym teście PCR.
- ✓ Wybrane startery wykrywały w sposób specyficzny wszystkie badane filotypy gatunku *Ralstonia* i jednocześnie nie reagowały niespecyficznie z innymi badanymi szczepami bakteryjnymi.

Ważniejsze wyniki i wnioski



Rys. 2. Widok roślin *in vitro* dwóch odmian wrażliwej a) i tolerancyjnej b) na obecność koloidu srebra



Rys. 3. Widok roślin *in vitro* dwóch odmian wrażliwej a) i tolerancyjnej b) na obecność detergentu Tween 20

Tabela. 9 i 10. Oddziaływanie zróżnicowanych wirulentnie szczepów bakterii Rs na kultury *in vitro* badanych odmian ziemniaka.

Lp.	Odmiana	KN	Patogeniczny szczep RS 8	Awirulentny szczep Rs 2
1.	Odmiana 1			
2.	Odmiana 2			
3.	Odmiana 3			
4.	Odmiana 4			
5.	Odmiana 5			
6.	Odmiana 6			

Lp.	Odmiana	KN	Patogeniczny szczep RS 8	Awirulentny szczep Rs 2
7.	Odmiana 7			
8.	Odmiana 8			
9.	Odmiana 9			
10.	Odmiana 10			
11.	Odmiana 11			
12.	Odmiana 12			

- ✓ Na podstawie przeprowadzonej analizy zdiagnozowano potencjalne źródła zakażeń mikrobiologicznych w Banku Genów *In vitro* oraz wyszczególniono momenty/punkty krytyczne, w których istnieje ryzyko kontaminacji organizmami kwarantannowymi.
- ✓ Oceniono wrażliwość kultur *in vitro* badanych odmian ziemniaka pod kątem wrażliwości na obecność kwarantannowych bakterii Rs.
- ✓ Toksyczny efekt obecności wirulentnego szczepu Rs 8 zaobserwowano u wszystkich badanych odmian ziemniaka, przy jednoczesnym niewielkim oddziaływaniu na badane kultury awirulentnego szczepu Rs 2.
- ✓ Opracowano i przetestowano na badanych kulturach roślin *in vitro* oraz badanych szczepach *Ralstonia solanacearum* dwie substancje o charakterze antydrobnoustrojowym.
- ✓ Zastosowanie obu substancji spowodowało efekt antymikrobiologiczny w stosunku do badanych szczepów Rs, ale jednocześnie spowodowało silne oddziaływanie toksyczne w stosunku do badanych kultur *in vitro* badanych roślin.
- ✓ Z uwagi na oceniony potencjał antydrobnoustrojowy badanych substancji, dalsze badania z ich udziałem powinny być kontynuowane.

Ważniejsze osiągnięcia projektu w 2021 roku

- ✓ Wytypowano i scharakteryzowano 12 odmian ziemniaka.
- ✓ Wyselekcjonowano, scharakteryzowano i przebadano 9 szczepów kwarantannowych bakterii *R. solanacearum* i *C. sepedonicus* oraz 10 innych patogenów ziemniaka.
- ✓ Badane szczepy *R. solanacearum* i *C. sepedonicus* zróżnicowano pod kątem mukoidalności, co pozwoliło wyróżnić 3 skrajnie zróżnicowane grupy bakterii, odpowiednio silnie-, średnio i niemukoidalne.
- ✓ Z kolei ocena wirulencji badanych szczepów *R. solanacearum* i *C. sepedonicus* testem biologicznym na bakłażanie, potwierdzona testem IFAS pozwoliła podzielić badane bakterie na silnie-, średniopatogeniczne i awirulentne.
- ✓ Opracowano antygen do opracowania poliklonalnych przeciwciał anti-Rs.
- ✓ Opracowano i wyselekcjonowano efektywnie działające 2 pary starterów molekularnych do diagnostyki bakterii *R. solanacearum* testami PCR i Real-Time PCR.
- ✓ Oceniono wrażliwość kultur *in vitro* badanych odmian ziemniaka względem zróżnicowanych wirulentnie bakterii *R. solanacearum* oraz dwóch substancji antymikrobiologicznych.