

Zadanie 1.6. Diagnostyka oraz zmienność populacyjna bakterii *Erwinia amylovora*, sprawcy zarazy ogniowej

Okres realizacji: 2008-2014

Kierownik zadania: **dr hab. Joanna Pulawska**

Wykonawcy: mgr A. Mikiciński, mgr M. Kałużna, prof. dr hab. P. Sobiczewski, H. Kijańska, H. Kołodziejek, K. Strojny

Celem badań było określenie przydatności różnych wariantów techniki real-time PCR do wykrywania *Erwinia amylovora* w materiale roślinnym w tym również porażonym bezobjawowo, a także opracowanie metody wykrywania szczepów o standardowej i wysokiej wirulencji. Wykonanie analizy wpływu nowego plazmidu na wirulencję *Erwinia amylovora* i możliwości jego rozprzestrzeniania się wśród innych szczepów.

Testowano dwa warianty techniki real-time PCR do wykrywania bakterii *E. amylovora*: i/z zastosowaniem barwnika SYBR Green; ii/ z zastosowaniem sondy TaqMan. Badania specyficzności obu technik wykazały, że real-time PCR z sondą TaqMan reaguje specyficznie tylko i wyłącznie z DNA szczepów *E. amylovora*. Natomiast real-time PCR z barwnikiem SYBR Green dawał wynik pozytywny również dla bakterii *Pseudomonas* i *Xanthomonas*, chociaż o dużo niższej intensywności. Spośród dwóch wariantów techniki real-time PCR do wykrywania i identyfikacji *Erwinia amylovora*, technika z zastosowaniem barwnika SYBR Green wykazała nieco wyższą czułość. Stwierdzono, że obie metody są podobnie czasochłonne i pracochłonne, a koszt real-time PCR z zastosowaniem sondy TaqMan jest nieznacznie wyższy.

Oceniano przydatność technik real-time PCR z SYBR Green i real-time PCR z sondą TaqMan do wykrywania infekcji utajonych. W tym celu pobierano próbki z dwuletnich roślin jabłoni w pięciu sadach w woj. mazowieckim. Każda próba składała się ze 100 fragmentów pędów bocznych o długości 10 cm. We wszystkich próbkach uzyskiwano sygnał fluorescencyjny techniką real-time PCR z SYBR Green, jednak analiza krzywej topnienia produktów wykazała, że w żadnej próbce nie było produktu charakterystycznego dla *E. amylovora*. Technika real-time PCR z sondą TaqMan uzyskiwano sygnał fluorescencyjny dla większości testowanych próbek, jednak pojawiał się on dopiero po 30 cyklu amplifikacji co może wskazywać na niewielką liczbę bakterii w badanych próbkach. Jednocześnie, w trakcie sezonu letniego monitorowano sady, z których pobierano próbki z drzew bez objawów zarazy ogniowej. W żadnym z sadów, nie obserwowano występowania choroby.

Badano za pomocą techniki PCR grupę 60 szczepów *E. amylovora* izolowanych w naszym kraju pod kątem obecności mutacji warunkującej ich wysoką wirulencję. Żaden z testowanych szczepów nie posiadał takiej mutacji.

Analizowano sekwencję nowego plazmidu pEA68 wyizolowanego ze szczepu 692 *Erwinia amylovora*. Wśród 79 rejonów kodujących, zidentyfikowano dwa operony związane z mobilnością: *tra* kodujący geny związane z koniugacją plazmidów – czyli wymianą z przenoszeniem do innych komórek bakteryjnych i region *pil* kodujący system sekrecji typu IV. Plazmid nie posiada jakichkolwiek genów związanych z odpornością na antybiotyki tudzież znanych genów związanych z wirulencją bakterii, ale wykazuje wysoką stabilność w komórkach bakteryjnych. Usunięto plazmid pEA68 z komórek szczepu 692 *Erwinia amylovora* i testowano jego wirulencję w stosunku do szczepu dzikiego. Testy wykazały, że badany plazmid nie ma wpływu na wirulencję bakterii.

Scharakteryzowano nowy plazmid pEA68 u *Erwinia amylovora*, który jest przedstawicielem nowej, jak dotąd nieopisaney rodziny plazmidów bakteryjnych.

Technika real-time PCR z sondą TaqMan może być zastosowana do diagnostyki materiału roślinnego pod kątem infekcji *E. amylovora*.