

**Metodyka pobierania prób materiału szkółkarskiego  
do oceny laboratoryjnej na obecność  
*Agrobacterium tumefaciens*.**

**Rośliny testowane:**

**Borówka wysoka – *Vaccinium corymbosum* L.**

Termin *Agrobacterium tumefaciens*, użyty w tym dokumencie odnosi się do starej nomenklatury, zgodnie z którą wszystkie bakterie wywołujące guzowatość były klasyfikowane do gatunku *A. tumefaciens*. Zgodnie z obecną wiedzą bakterie wywołujące guzowatość należą do ok. 15 gatunków w obrębie 2 rodzajów: *Agrobacterium* i *Rhizobium*. Patogeny te są polifagami, wywołującymi guzowatość na ponad 600 gatunkach roślin, z tym, że zakres roślin gospodarzy może się różnić w zależności od szczepu. W przypadku tumorogennych bakterii na borówce wysokiej mogą one wywoływać dwa rodzaje objawów: guzowatość korzeni i guzowatość pędów. W przeciwieństwie np. do drzew owocowych, w przypadku krzewów borówki praktycznie nie obserwuje się guzów na systemie korzeniowym, a to w związku z tym, że środowisko kwaśne, czyli takie jak panuje w glebie pod uprawianymi roślinami, jest niekorzystne dla bakterii tumorogennych. Objawy obserwuje się natomiast u nasady pędów, czyli tuż nad podłożem gdzie warunki dla bytowania bakterii są znacznie bardziej sprzyjające, ze względu na wyższe pH. Guzowate narośle początkowo są obserwowane jako niewielkie nabrzmienia pod tkanką okrywającą powstające głównie w miejscach mechanicznych uszkodzeń. Z czasem guzy rozwijają się osiągając wielkość od kilku milimetrów do kilkunastu centymetrów. Wielkość guzów zależy od podatności rośliny, intensywności jej wzrostu, warunków glebowych oraz szczepu infekującego. Młode guzy mają najczęściej kształt kulisty, są gładkie, miękkie, o jasnokremowym zabarwieniu. W miarę starzenia się drewnieją, zmienia się ich kształt, powierzchnia staje się chropowata i w wyniku zamierania zewnętrznych komórek przybiera barwę ciemnobrunatną do czarnej. Guzy ograniczają funkcje fizjologiczne korzeni, takie jak transport wody i substancji odżywczych. W przypadku guzowatości korzeni do zakażenia dochodzi zazwyczaj w glebie, natomiast w przypadku guzowatości pędów (najczęściej powodowanej przez bakterii z gatunku *Agrobacterium rubi*) patogeny je wywołujące żyją zarówno w glebie, jak i w roślinie, w której są rozprowadzane systemicznie. Często przez wiele lat zakażone rośliny nie

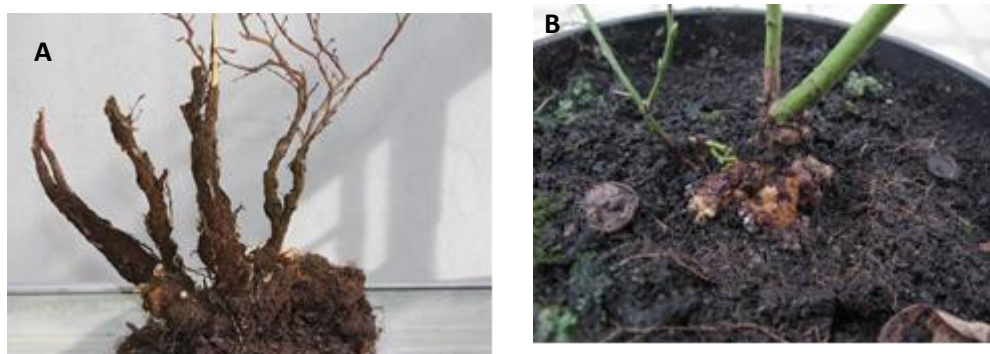
dają objawów chorobowych. Objawy na pędach borówki mogą się pojawić nawet dopiero 2-4 lat po posadzeniu krzewów i w związku z tym nietrudno o rozprzestrzenianie choroby wraz z bezobjawowo zakażonym materiałem roślinnym. Pierwsze pojawiające się guzy można obserwować wiosną lub wczesnym latem, najczęściej w miejscach uszkodzenia, np. mechanicznego lub mrozowego pędów, jako jasne, gąbczaste narośla, które z czasem ciemnieją, brązowieją, aż w końcu czernieją i się rozpadają. Guzy mogą zajmować znaczną powierzchnię pędów, w postaci pojedynczych zgrubień lub szerokiego, okalającego pęd pierścienia. Na chorych pędach owoce są zasuszone, a pędy rosną wolniej i nie pojawiają się na nich nowe przyrosty.

#### Termin pobierania prób

Guzy pojawiają się ok. 1 miesiąca od momentu zakażenia rośliny i rozwijają się w okresie wegetacyjnym roślin i w tym też okresie należy prowadzić obserwacje. Należy obserwować nasadę pędów (na linii powietrze – gleba), a także całe pędy borówki i poszukiwać guzowatych narośli.

#### Wybór tkanki/części rośliny do testowania

Objawy guzowatości są tak charakterystyczne, że właściwie nie wymagają dodatkowej diagnostyki. W przypadkach wątpliwych można wykonać diagnostykę laboratoryjną. W tym celu pobrane próby: pędy z guzami (Fot. 1) luba całe młode rośliny, należy umieszczać w odpowiednio oznakowanych torebkach foliowych. Zaleca się aby próby przechowywać i transportować do laboratorium w niskiej temperaturze np. w tzw. lodówce turystycznej lub pojemniku styropianowym z wkładem chłodzącym. Nie należy dopuścić do zamrożenia prób. Próby można wysłać do laboratorium pocztą/kurierem, tak aby dotarły w ciągu 1-go dnia od wysyłki. Muszą być zabezpieczone przed wyschnięciem. Po dostarczeniu prób do laboratorium, umieścić je w temperaturze (+4°C do +10°C) i przechowywać w warunkach chłodni maksymalnie przez okres 2-3 dni.



Fot. 1. A – objawy guzowatości pędów borówki wysokiej; B - guzowatość korzeni – guz u nasady pędów

Pobrane próby przekazać do badań laboratoryjnych załączając zlecenie na wykonanie badań, którego formularz można pobrać ze strony internetowej Państwowej Inspekcji Ochrony Roślin i Nasiennictwa ([www.gov.pl/piorin](http://www.gov.pl/piorin)). Dodatkowo należy sporządzić i przechowywać przez 3 lata kopię "Zlecenia" oraz informację zawierającą dodatkowe dane, o ile nie zostały podane w "Zleceniu".

Data pobrania próby (dd mm rrrr)	
Dane producenta: <ul style="list-style-type: none"> <li>• imię i nazwisko</li> <li>• adres kontaktowy</li> <li>• telefon</li> <li>• e-mail</li> </ul>	
Adres plantacji	
Rodzaj uprawy (gatunek, odmiana, ew. typ, wiek roślin)	
Rodzaj pobranego materiału (na przykład: liście, kwiaty)	
Plan (szkic) lub opis umożliwiający jednoznaczne odnalezienie roślin w terenie, z których pobierano próby	
Dodatkowe informacje dotyczące m.in. występowania podejrzanych symptomów, chorób, szkodników, lub rozpoznanych źródeł infekcji w pobliżu badanych roślin	

### **Metody laboratoryjne wykrywania infekcji spowodowanej bakteriami tumorogennymi**

W związku z tym, że charakter infekcji polega na genetycznej transformacji DNA roślinnego fragmentem plazmidu bakterii, od momentu transformacji obecność bakterii nie jest konieczna dla rozwoju guzów. Co za tym idzie izolacja patogenicznych bakterii z guzów jest często niemożliwa. Można przeprowadzić test na obecność DNA bakteryjnego w DNA roślinnym. W tym celu ze świeżych fragmentów guzów (o jasnej tkance) należy wyizolować DNA roślinne. Do tego celu można zastosować komercyjny zestaw do izolacji DNA roślinnego. Następnie należy użyć wyizolowany DNA jako matrycy do reakcji PCR ze starterami komplementarnymi do genu *tms2* (Puławska i Sobiczewski, 2005).

Startery:

tms2F1 (5'- TTT CAG CTG CTA GGG CCA CAT CAG-3')

tms2B (5'- GGA GCA CTG CCG GGT GCC TCG GGA-3')

Warunki amplifikacji:

Wstępna denaturacja: 94°C – 1 min;

35 cykli: 94°C – 1 min, 63°C – 1 min, 72°C – 1 min.

Końcowe wydłużanie: 72°C – 10 min

Dla genu *tms2* tumorogennych bakterii uzyskuje się produkt o długości 458 pz

#### Literatura:

Puławska J., Sobiczewski P. (2005) Development of a semi-nested PCR based method for sensitive detection of tumorigenic *Agrobacterium* in soil. *Journal of Applied Microbiology* 98(3): 710-721.

#### Objaśnienia skrótów użytych w tekście:

PCR = Polymerase Chain Reaction = łańcuchowa reakcja polimerazy

---

Opracowanie: prof. dr hab. Joanna Puławska; e-mail: [joanna.pulawska@inhort.pl](mailto:joanna.pulawska@inhort.pl)