**Lp. w zał. do Rozporządzenia MRiRW:** 57.

**Tytuł zadania**: Badania nad opracowaniem metod selektywnej izolacji oraz czułej identyfikacji bakterii *Clavibacter michiganensis* ssp. *sepedonicus* w trudnych diagnostycznie próbach środowiskowych.

**Kierownik zadania:** dr hab. inż. W. Przewodowski

**Cel zadania:**

Celem realizowanego projektu było opracowanie materiałów i procedur do selektywnej izolacji kwarantannowej bakterii - *Clavibacter sepedonicus* comb. nov. (Cs) (Uprzednio *Clavibacter michiganensis* ssp. *sepedonicus* (Cms) z różnych prób środowiskowych oraz opracowanie i weryfikacja wysoce czułych i specyficznych metod identyfikacji tej bakterii.

Założony cel osiągnięto poprzez realizację założeń poszczególnych tematów badawczych projektu.

**Materiały i metody:**

Celem pierwszego tematu badawczego było opracowanie przeciwciał anty-Cms oraz materiałów pozwalających na selektywną i specyficzną izolację bakterii Cms z różnych tkanek roślinnych. Aby zrealizować powyższy cel, wykonano badania nad pozyskaniem przeciwciał skierowanych na komórki bakterii Cms. Przeciwciała opracowano na bazie 3 szczepów bakterii Cms, które posłużyły do opracowania mieszanin do immunizacji badanych zwierząt. Surowicę z uzyskanymi przeciwciałami poliklonalnymi skierowanymi na komórki bakterii Cms poddano oczyszczeniu, a następnie oceniano ich jakość. Do opracowania immunopodłoża wybrano przeciwciała, które charakteryzowały się najlepszym mianem i specyficznością.

Celem kolejnego tematu badawczego była ocena efektywności izolacji DNA zróżnicowanych mukoidalnie szczepów bakterii Cms na czułość testu molekularnego PCR. Wykonane badania skupiały się na weryfikacji efektywności opracowanych warunków izolacji DNA w obecności różnych szczepów bakterii Cms. Doświadczenia przeprowadzono z udziałem wysokosolnej metody izolacji DNA, pozwalającej na uzyskanie w ramach dotychczasowych badań najwyższej czułości w teście PCR. Badania wykonano z udziałem 9-ciu wyselekcjonowanych, zróżnicowanych mukoidalnie szczepów Cms na bazie których sporządzone zostaną wystandaryzowane zawiesiny bakteryjne. Zawiesiny te posłużyły do wykonania 7, 10-krotnych rozcieńczeń Cms oraz próby kontrolnej (bez bakterii). W celu określenia wpływu różnych warunków na skuteczność izolacji i jakość wyizolowanego DNA oraz wpływ na czułość testu PCR badania wykonano w obecności wody oraz zbuforowanego soku z ziemniaka.

W ramach tematu trzeciego oceniano podatność 6-ciu badanych odmian ziemniaka na sztuczną inokulację różnicowanych mukoidalnie szczepów bakterii Cms. Tuż przed wysadzeniem, sadzeniaki impregnowano zawiesinami dwóch patogenicznych szczepów Cms i wysadzono na przygotowanych do tego celu mikropoletkach doświadczalnych. Ocenę przydatności opracowanych procedur izolacji i identyfikacji komórek Cms wykonano na podstawie oceny stopnia porażenia badanych odmian ziemniaka. Analizę przeprowadzono na podstawie prób z liści/łodyg w okresie wegetacji oraz prób z bulw ziemniaka pobranych po zbiorze bulw ziemniaka. Badanie polegało na analizie makroskopowej objawów bakteriozy pierścieniowej na roślinach oraz bulwach potomnych ziemniaka. Po odrzuceniu prób z roślin i bulw wykazujących objawy, badania przeprowadzono przy pomocy metod i procedur opracowanych w ramach 1 i 2 tematu badawczego. Jako odnośny wykonano klasyczny test IFAS.

W czwartym temacie badawczym realizowano kolejny etap badań podjętych w roku poprzednim, służący określeniu wpływu koncentracji bakterii Cms w mieszaninie inokulacyjnej na poziom ekspresji objawów na badanych roślinach in vitro oraz na uzyskany wynik testu molekularnego. Badania wykonano przy udziale dwóch odmian ziemniaka oraz trzech patogenicznych szczepów bakterii Cms. Rośliny in vitro poddawano działaniu zawiesin bakteryjnych, a następnie umieszczano w podłożach wzrostowych MS i inkubowano w optymalnych dla nich warunkach wzrostu. Stopień porażenia badanych roślin oceniano w trakcie wegetacji na podstawie objawów makroskopowych na roślinach oraz przy pomocy testu PCR przeprowadzonego po uprzedniej izolacji DNA z badanych roślin.

W ramach ostatniego tematu badawczego oceniano warunki pozwalające zapobiegać kontaminacjom bakteriami Cms podłoży stosowanych do hodowli roślin in vitro ziemniaka. W tym celu oceniano wpływ mieszaniny nanocząsteczek koloidów 3 metali szlachetnych na stan roślin in vitro ziemniaka oraz żywotność bakterii Cms. Badania miały na celu uzyskanie działania antymikrobiologicznego badanych koloidów względem stosowanych szczepów Cms oraz zminimalizowanie działania fitotoksycznego stosowanych koloidów na badane kultury in vitro ziemniaka.

**Wyniki i dyskusja:**

Badania przeprowadzone w ramach pierwszego tematu badawczego pozwoliły opracować materiały do konstrukcji immunopodłoża do izolacji bakterii Cms z badanych prób. Surowice z IgG anty-Cms, które uzyskano na podstawie opracowanych antygenów, po izolacji i oczyszczeniu badano pod kątem czułości i specyficzności względem stosowanych szczepów bakteryjnych. Do opracowania immunopodłoża zastosowano przeciwciała, u których stwierdzono najlepszy stosunek miana do specyficzności. Dzięki modyfikacjom matrycy oraz zastosowanym IgG, uzyskano funkcjonalne immunopodłoże do izolacji bakterii Cms z soku ziemniaka w warunkach laboratoryjnych oraz polowych.

Dodatkowe badania mające na celu polepszenie diagnostyki Cms wykonano w ramach kolejnego tematu badawczego, w którym oceniano efektywność izolacji DNA zróżnicowanych mukoidalnie szczepów bakterii Cms na czułość testu molekularnego PCR. Wcześniejsze badania wykazały, że przy badaniu prób pochodzenia roślinnego występowało hamowanie testu molekularnego w wyniku obecności substancji inhibitorowych obecnych w tkankach roślin i bulw ziemniaka. Aby ocenić ewentualny dodatkowy wpływ substancji znajdujących się w śluzach bakteryjnych sprawcy bakteriozy pierścieniowej, w ramach niniejszego tematu badania molekularne wykonano w obecności zróżnicowanych mukoidalnie szczepów Cms. Zarówno przy zastosowaniu klasycznego testu PCR, jak i testu Real-Time PCR z użyciem starterów skierowanych na ten sam badany fragment genomu bakterii, uzyskano dodatni wynik dla wszystkich badanych szczepów. Zarówno dla prób izolowanych z wody, jak i soku ziemniaka uzyskano jednak różną czułość obu testów. Uzyskane wyniki wskazują, że sam poziom zawartości śluzów bakteryjnych nie ma znaczącego wpływu na końcowy wynik uzyskanego testu molekularnego. Wywnioskowano, iż cecha ta związana jest z lepszą lub gorszą wykrywalnością danego szczepu Cms przy pomocy stosowanej pary starterów.

Badania wykonane w ramach tematu 3 wykazały istotny wpływ profilu glebowego na wysokość plonu. Relatywnie wyższy średni plon bulw stwierdzono na glebie lżejszej, piaszczystej, niższy na glebie ciężkiej. Również szczepy Cms, którymi inokulowano sadzeniaki, w większym stopniu różnicowały porażenie latentne łodyg i bulw na profilu lżejszym, przy czym warunki profilu glebowego w większym stopniu determinowały różnice w nasileniu porażenia latentnego bulw niż łodyg ziemniaka. Nie uzyskano natomiast istotnych różnic statystycznych dla średniej masy i liczby bulw uzyskanych z bulw inokulowanych i niezakażanych Cms. Stosując opracowaną w ramach zadania metodykę oraz test IFAS jako odnośny, wykazano, iż rodzaj szczepu Cms stosowanego do inokulacji bulw sadzeniaków nie miał istotnego wpływu na wysokość plonu i liczby bulw, natomiast zarówno w przypadku łodyg, jak i bulw, więcej prób ze stwierdzoną obecnością komórek Cms oraz wyższy indeks porażenia latentnego stwierdzono w preparatach pochodzących z roślin, których sadzeniaki były inokulowane szczepem mukoidalnym.

Wyniki badań uzyskane w ramach kolejnego tematu badawczego pozwoliły ocenić wpływ koncentracji zróżnicowanych mukoidalnie szczepów bakterii Cms na poziom ekspresji objawów chorobowych oraz czułość testu molekularnego w badanych tkankach roślin in vitro. Badane odmiany charakteryzowały się zróżnicowaną wrażliwością na obecność poszczególnych szczepów bakterii Cms. Podobnie jak w ubiegłym roku, bardziej wrażliwą odmianą na porażenie Cms była odmiana Sagitta, natomiast najmniej podatną odmiana Courage. Najsilniejsze działanie patogeniczne badanych szczepów zaobserwowano u odmiany wrażliwej, przy czym nie odnotowano istotnej różnicy statystycznej w oddziaływaniu poszczególnych szczepów Cms. W przypadku odmiany tolerancyjnej oddziaływanie fitotoksyczne Cms było znacznie słabsze. Obecność bakterii Cms oceniana testem PCR potwierdzono praktycznie w większości badanych prób pozytywnych często pomimo braku widocznych objawów makroskopowych na roślinach wskazujących na porażenie bakteriami Cms.

W ramach 5 tematu badawczego oceniano warunki pozwalające zapobiegać kontaminacjom bakteriami Cms podłoży stosowanych do hodowli roślin in vitro ziemniaka. Zastosowanie w roku bieżącym koloidu platyny w mieszaninie koloidalnej pozwoliło na polepszenie działania antymikrobiologicznego nanocząsteczek srebra i miedzi zarówno na podłożach mikrobiologicznych YGM, jak i w obecności tkanki roślinnej w podłożach MS. Zgodnie z założeniami, wprowadzenie dodatkowego koloidu okazało się korzystne i spowodowało złagodzenie oddziaływania fitotoksycznego koloidów miedzi i srebra względem badanych roślin in vitro. W zależności od stosowanej koncentracji zaobserwowano zróżnicowaną wrażliwość kultur in vitro badanych odmian ziemniaka na obecność mieszaniny koloidów. Niższe stężenia badanych koloidów powodowały lepszy wzrost i namnażanie się badanych roślin w porównaniu z roślinami kontrolnymi, wyższe hamowanie wzrostu i współczynnika namnażania. Aby ustalić optymalne warunki należy prowadzić dalsze badania w kierunku optymalizacji działania opracowanej mieszaniny.