

Zadanie nr 57 (Nr w planach IHAR- PIB: 4-3-00-6-01)



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

Okres realizacji: lata 2014 - 2020

Zespół wykonawców projektu:

Projekt w latach 2014-20 realizowało łącznie 30 osób w 4 podzespołach badawczych, w tym:

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

Wykonawcy: dr. T. Pastuszewska³⁾, dr. W. Nowacki⁴⁾, dr inż. A. Przewodowska²⁾, dr. G. Gryń³⁾, dr hab. K. Treder¹⁾, dr inż. M. Łabańska¹⁾, dr inż. P. Dederko-Kantowicz¹⁾, mgr inż. K. Salamońska¹⁾, mgr inż. W. Stochła¹⁾, mgr inż. D. Szarek¹⁾, mgr inż. D. Michałowska²⁾, mgr inż. K. Franke³⁾, mgr inż. M. Nowakowski³⁾ inż. D. Sekrecka²⁾, mgr inż. J. Chołuj¹⁾, Mgr inż. W. Stochła¹⁾, mgr inż. A. Pawłowska¹⁾, mgr inż. M. Pietraszko⁴⁾, mgr inż. Z. Munczkowska³⁾ i mgr inż. A. Trocka⁴⁾.

1) Podzespół 1 w Pracowni Diagnostyki Molekularnej i Biochemii IHAR – PIB O/Bonin. Tematy 1-5. Łącznie 10 osób.

2) Podzespół 2 w Pracowni Zasobów Genowych i Kultur in vitro IHAR – PIB O/Bonin. Tematy 1-5. Łącznie 7 osób (w tym Kierownik).

3) Podzespół 3 w Pracowni Chorób i Szkodników Kwarantannowych Ziemiaka IHAR – PIB O/Bydgoszcz. Temat 3. Łącznie 7 osób.

4) Podzespół 4 w Oddziale IHAR – PIB w Jadwisinie. Temat 3. Łącznie 6 osób.

Cele projektu

Głównym celem projektu było opracowanie materiałów i procedur do selektywnej izolacji kwarantannowej bakterii *Clavibacter michiganensis* comb nov (poprzednia nazwa *Clavibacter michiganensis* ssp. *sepedonicus*, Cms) z różnych prób środowiskowych oraz opracowanie i weryfikacja wysoce czułych i specyficznych metod identyfikacji tej bakterii.

Cel główny osiągnięto poprzez realizację celów poszczególnych tematów badawczych:

- ✓ Opracowanie przeciwciał anti-Cs oraz materiałów pozwalających na selektywną i specyficzną izolację bakterii Cs z prób środowiskowych (Temat 1).
- ✓ Opracowanie wysoce specyficznych metod diagnostycznych pozwalających na ultraczułe wykrycie bakterii Cms (Temat 2).
- ✓ Weryfikacja i optymalizacja procedur pozwalających na izolację i identyfikację bakterii Cs w próbach pobranych z naturalnego źródła występowania tej bakterii (Temat 3).
- ✓ Określenie zdolności Cs do infekowania roślin utrzymywanych w kulturach *in vitro* poprzez opracowanie efektywnego sposobu porażania roślin *in vitro* bakteriami Cs, opracowanie metody izolacji i identyfikacji bakterii Cms z roślin *in vitro* oraz selekcja odmian ziemniaka o największej wrażliwości na porażenie bakteriami Cs (Temat 4).
- ✓ Identyfikacja potencjalnych źródeł zakażeń mikrobiologicznych w pożywkach hodowlanych i opracowanie metodyki zapobiegania tego typu kontaminacjom (Temat 5).

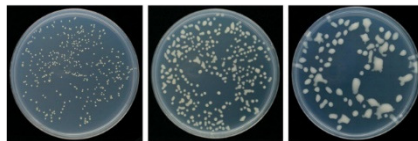
Wszystkie założone cele zostały osiągnięte.

Materiały i metody

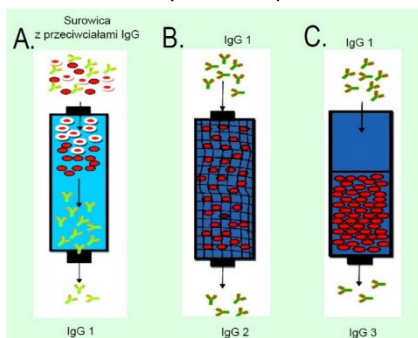
Jako materiał biologiczny w ramach projektu stosowano 16 odmian ziemniaka (w formie roślin/bulw oraz kultur *in vitro*), 1 odmianę bakłażana oraz 15 wzorcowych szczepów bakterii *C. sepedonicus* i 6 innych, referencyjnych patogenicznych szczepów bakterii ziemniaka.

- ✓ Badane odmiany ziemniaka zróżnicowane pod względem wczesności i zawartości skrobi posłużyły w tematach 1 i 3 do opracowania i oceny działania immunopodłoża, w temacie 2 do opracowania i oceny skuteczności metody izolacji DNA, w temacie 3 do oceny wrażliwości na bakterie Cs, w tematach 4 i 5 odpowiednio do oceny zdolności bakterii Cs do infekowania kultur *in vitro* oraz oceny fitotoksyczności koloidów metali szlachetnych.
- ✓ Bakterie Cs w temacie 1 posłużyły do opracowania i oceny jakości przeciwciał anti-Cs, w temacie 2 do opracowania metody izolacji DNA, w temacie 3 do oceny patogeniczności na bakłażanie oraz inokulacji bulw badanych odmian ziemniaka na różnych profilach glebowych w Jadwisinie i Bydgoszczy, w temacie 4 do określenia zdolności do infekowania roślin *in vitro*, natomiast w temacie 5 do opracowania warunków pozwalających zapobiegać kontaminacjom mikrobiologicznym w podłożach do hodowli roślin *in vitro*.
- ✓ Uzyskane przeciwciała użyto do opracowania podłoża do specyficznej izolacji bakterii *C. sepedonicus* z prób środowiskowych, którego efektywność działania oceniano testem PCR oraz IFAS w 3 zewnętrznych laboratoriach badawczych w obecności komponentów soku zróżnicowanych pod względem wczesności i zawartości skrobi odmian ziemniaka.
- ✓ Przydatność opracowanego testu immuno-PCR oceniano na próbach ekstraktów roślinnych z łodyg oraz bulw potomnych z bulw inokulowanych dwoma skrajnie zróżnicowanymi pod względem mukoidalności szczepami Cs, inkubowanych w różnych warunkach glebowych w ramach tematu 3.
- ✓ Opracowane nanocząsteczki metali koloidalnych posłużyły w ramach zadania 5 do opracowania mieszanin, które oceniano pod względem fitotoksyczności na badane kultury *in vitro* oraz oddziaływania antybakteryjnego na zróżnicowane szczepy bakterii Cs.

Ważniejsze wyniki i wnioski



Rys. 1. Mukoidalność badanych szczepów *C. sepedonicus*



Rys.2. Opracowane sposoby izolacji przeciwciał.

Tabela. 1. Specyficzność opracowanych przeciwciał anti-Cs.

Bakterie	Badane szczepy	IgG komercyjne	IgG I	IgG II	IgG III	
Badane szczepy Cms	KN	Bufor	-	-	-	-
	Cms 1	+	+	+	-	
	Cms 2	+	+	+	+	
	Cms 3	+	+	+	-	
	Cms 4	-	+	+	+	
	Cms 5	-	+	+	+	
	Cms 6	+	+	+	+	
	Cms 7	+	+	+	+	
	Cms 8	+	+	+	+	
	Cms 9	+	+	+	+	
	Cms 10	-	+	+	+	
	Cms 11	+	+	+	+	
	Cms 12	+	-	+	+	
	Cms 13	+	+	(+)	+	
	Cms 14	+	+	(+)	+	
	Cms 15	+	(+)	+	(+)	



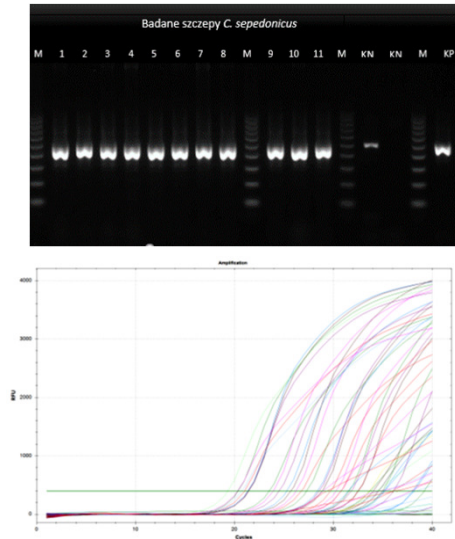
Rys. 3. Schemat opracowanego testu immuno-PCR do identyfikacji bakterii *C. sepedonicus* z prób środowiskowych.

Tabela. 2. Porównanie wyników testów immuno-PCR i IFAS.

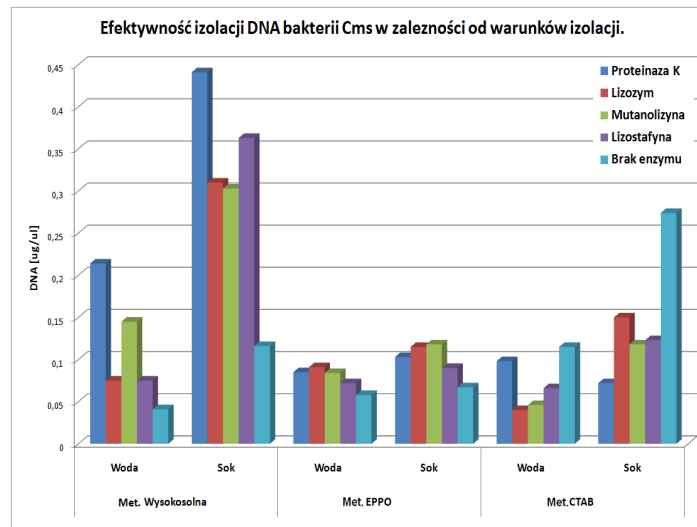
Bakterie [jtk/ml]	Test immuno-PCR				Klasyczny IFAS			
	Odmiana 1 12% skrobi	Odmiana 2 20% skrobi	Odmiana 3 22% skrobi	KN	Odmiana 1 12% skrobi	Odmiana 2 20% skrobi	Odmiana 3 22% skrobi	KN
0	-	-	-	-	0	0	0	0
10 ⁷	+	+	+	+	44,0	50,0	33,0	76,0
10 ⁸	+	+	+	+	12,0	9,0	6,0	23,0
10 ⁹	+	(+)	+	+	1,2	2,0	0	9,0
10 ⁴	(+)	(+)	(+)	(+)	0	0	0	1,0
10 ³	(+)	-	-	(+)	0	0	0	0

- ✓ Stosując odpowiednie metody mikrobiologiczne, molekularne oraz immunologiczne potwierdzono tożsamość, scharakteryzowano i zróżnicowano mukoidalnie szczepy badanych bakterii *C. sepedonicus* oraz szczepy innych badanych patogennych bakterii ziemniaka.
- ✓ Dzięki opracowaniu antygenów i mieszanin do immunizacji królików, jak również metodyki oczyszczania IgG uzyskano specyficzne, poliklonalne przeciwciała królicze skierowane na komórki bakterii *C. sepedonicus*.
- ✓ Selekcja i modyfikacja chemiczna powierzchni materiałów do opracowania matryc oraz zastosowanie opracowanych IgG anti-Cs pozwoliły na opracowanie immunopodłoża do selektywnej izolacji bakterii Cs z prób środowiskowych.
- ✓ Wysoką skuteczność opracowanego immunopodłoża potwierdzono w zewnętrznych laboratoriach badawczych w obecności komponentów soku różnych odmian ziemniaka zróżnicowanych pod względem wczesności i zawartości skrobi oraz zalecanego przez EPPO klasycznego testu IFAS jako odnośnego.
- ✓ Opracowane immunopodłoże oceniono jako proste w użyciu, trwałe i niewrażliwe na komponenty tkankowe oraz dużą zawartość skrobi. Z kolei ocena preparatów zalecanym przez EPPO testem IFAS była utrudniona z powodu obecności skrobi i komponentów soku ziemniaczanego utrudniających obserwację i zliczanie bakterii pod mikroskopem.
- ✓ Skuteczność opracowanego testu immuno-PCR potwierdzono na próbach uzyskanych w warunkach polowych w ramach tematu 3.

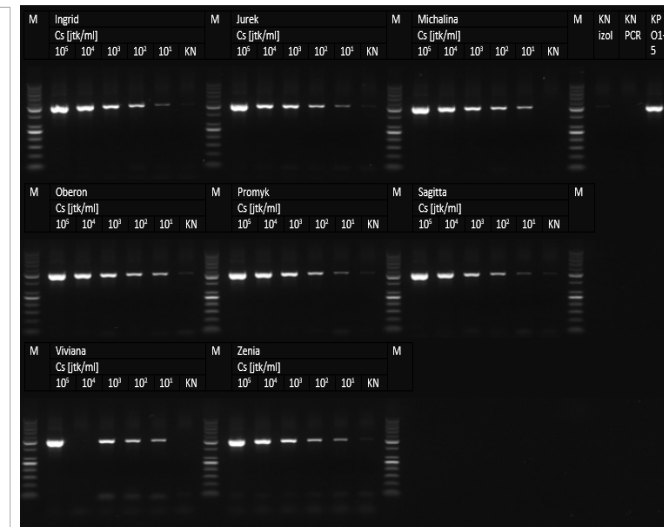
Ważniejsze wyniki i wnioski



Rys. 4. Potwierdzenie tożsamości badanych szczepów Cs w testach PCR i Real-Time PCR.



Rys. 5 Efektywność izolacji DNA bakterii *C. sepedonicus* w zależności od stosowanych metod izolacji, enzymów litycznych oraz medium.



Rys. 6 Wykrywalność DNA bakterii *C. sepedonicus* w soku różnych odmian ziemniaka molekularnym testem PCR.

- ✓ Wykonane badania molekularne testem PCR i Real-Time PCR potwierdziły tożsamość badanych szczepów *C. sepedonicus*,
- ✓ Wykazano przydatność działania różnych starterów molekularnych względem zróżnicowanych mukoidalnie szczepów Cs,
- ✓ Opracowano metodykę izolacji bakterii Cs z różnych mediów, w tym z H₂O oraz roślinnych ekstraktów tkankowych z bulw i roślin ziemniaka. Oceniono m.in. przydatność 4 enzymów litycznych oraz 4 metod izolacji DNA bakterii Cms z wody i soku bulw ziemniaka.
- ✓ Najwyższą ilość DNA bakterii Cs uzyskano w metodzie wysokosolnej i soku ziemniaka. Niższe ilości uzyskano metodami CTAB i EPPO.
- ✓ Wysoki stopień degradacji DNA uzyskanego metodą wysokosolną nie skutkowało obniżeniem czułości testu PCR.
- ✓ Największą czułość testu PCR przy izolacji DNA badanych bakterii *C. sepedonicus* z soku roślin i bulw uzyskano metodą wysokosolną z użyciem enzymu proteiny K. Przy zawiesinach wodnych nie stwierdzono wpływu obecności enzymów na czułość reakcji.
- ✓ Z reguły dodatek enzymów litycznych w izolacji DNA bakteryjnego poprawiał wydajność metod izolacji DNA. Wyjątek stanowiła metoda CTAB stosowana standardowo do izolacji DNA z tkanek roślinnych, w której enzymy wykazały relatywnie niższą przydatność.
- ✓ Dobranie odpowiednich warunków izolacji DNA pozwoliło na zwiększenie efektywności testu immuno-PCR do identyfikacji prób środowiskowych z roślin i bulw ziemniaka w zadaniu 3.

Ważniejsze wyniki i wnioski



Rys.7. Widok badanych roślin bakłażana inokulowanych i zawieszonych badanych szczepów Cs w teście patogeniczności.



Rys.8 Postać objawowa a) i latentna b) bakteriozy pierścieniowej na roślinach i bulwach badanych odmian ziemniaka badanych w - i po okresie wegetacji.

Tabela 3. Ocena badanych szczepów Cs pod kątem patogeniczności.

Lp.	Badane szczepy	Mukoidalność	Patogeniczność
1.	Cms 1	Niemukoidalny	+
2.	Cms 2	Mukoidalny	+
3.	Cms 3	Średnio- mukoidalny	+
4.	Cms 4	Niemukoidalny	+
5.	Cms 5	Niemukoidalny	-
6.	Cms 6	Mukoidalny	+
7.	Cms 7	Mukoidalny	+
8.	Cms 8	Mukoidalny	+
9.	Cms 9	Mukoidalny	+
10.	Cms 10	Niemukoidalny	-
11.	Cms 11	Mukoidalny	-
12.	Cms 12	Mukoidalny	-
13.	Cms 13	Mukoidalny	-
14.	Cms 14	Mukoidalny	+
15.	Cms 15	Średnio-mukoidalny	-

Tabela 4. Indeks porażenia latentnie roślin i bulw ziemniaka, których sadzeniaki sztucznie inokulowano szczepem Cs i wysadzano na różnych profilach glebowych.

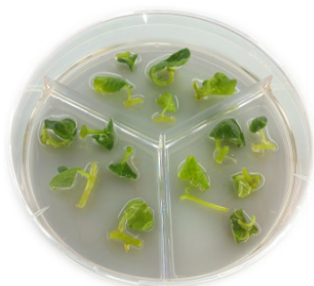
Profil glebowy	Indeks porażenia latentnie roślin ziemniaka (%)	Indeks porażenia latentnie bulw ziemniaka (%)
II	38,6	58,3
III	30,6	54,4
IV	30,4	59,8

Tabela 5. Średnia liczba bulw potomnych porażonych latentnie, z objawami porażenia przez Cs i liczba bulw zgniłych.

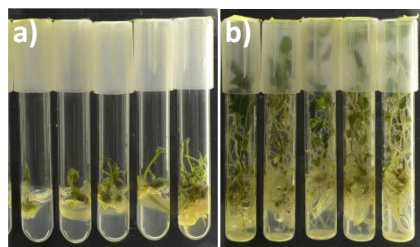
Profil glebowy	Liczba bulw			
	Rośliny inokulowane Cs			Kontrola negatywna
	średnia	objawy	zgniłe	
II	10,3	x	15,9	18,4
III	9,3	x	12,3	16,5
VI	8,7	x	8,9	15,8

- ✓ Określono patogeniczność badanych szczepów *C. sepedonicus* i wyselekcjonowano najbardziej zjadliwe szczepy do badań.
- ✓ Stwierdzono, że z punktu widzenia identyfikacji bakterii w próbach środowiskowych, jak również weryfikacji i optymalizacji procedur diagnostycznych, ważna jest ocena wpływu czynników środowiskowych na stopień porażenia się roślin ziemniaka.
- ✓ Badane odmiany wykazały zróżnicowaną podatność na sztuczną inokulację bakteriami Cs. Najmniejszą podatność uzyskano dla odmian Courage, Annabelle i Ikar, natomiast największe porażenie bulw zanotowano u odmian Gwiazda, Jurek i Sagitta.
- ✓ Ogólnie większą ekspresję objawów chorobowych badanych roślin i bulw potomnych obserwowano w Jadwisinie. Tam też uzyskiwano wyższe indeksy porażenia latentnego roślin i bulw potomnych, przy czym indeks porażenia latentnego bulw był z reguły 2-krotnie wyższy niż roślin.
- ✓ Indeks porażenia Cs badanych odmian zależał od profilu glebowego, ale większe znaczenie miała wrażliwość samej odmiany, jak również patogeniczność użytego do inokulacji szczepu Cs.
- ✓ Masa bulw badanych prób była z reguły wyższa u roślin niezakażanych, niezależnie od stopnia wrażliwości danej odmiany na Cs.
- ✓ Najwyższy plon uzyskały rośliny uprawiane na glebie najlżejszej, ale jednocześnie wykazano tu największe różnice w plonowaniu między roślinami zakażanymi Cs i kontrolą, stwierdzono najwięcej objawów i bulw zgniłych oraz najwyższe porażenie pędów.
- ✓ Wykazano wysoką przydatność opracowanego testu immuno-PCR. Wyniki w dużej mierze korelowały z wynikami testu IFAS.

Ważniejsze wyniki i wnioski



Rys. 9. Widok roślin *in vitro* podczas inokulacji bakteriami *C. sepedonicus*.



Rys.10. Widok roślin *in vitro* dwóch odmian wrażliwej a) i tolerancyjnej b) na obecność bakterii *C. sepedonicus*.

Tabela. 6. Porównanie średniego wzrostu i wykrywalności Cs w badanych roślinach *in vitro*. „+” wynik dodatni testu PCR, „-” wynik ujemny testu PCR

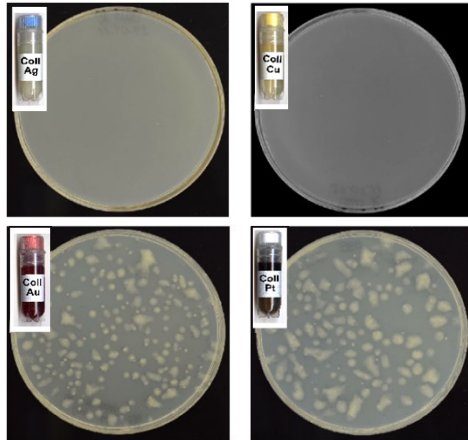
Lp.	Odmiana	Rośliny inokulowane zawiesiną bakterii Cs (KP)			Rośliny bez Cms (KN)		
		Wzrost roślin [cm]		Test PCR	Wzrost roślin [cm]		Test PCR
		Średnia	OD		Średnia	OD	
1	Oberon	4,3	0,1	+	6,00	0,4	-
2	Zenia	4,4	2,4	+	8,00	0,4	-
3	Ikar	3,0	3,6	+	8,13	0,3	-
4	Cyprian	0,9	1,0	+	8,00	0,0	-
5	Michalina	2,3	3,2	+	6,50	0,4	-
6	Gwiazda	1,0	1,4	+	7,50	1,0	-
7	Anabelle	3,0	3,2	+	8,00	0,0	-
8	Viviana	0,3	0,3	+	5,75	1,7	-
9	Sagitta	4,3	2,4	+	7,33	1,2	-
10	Ingrid	1,0	2,0	+	3,00	1,4	-
11	Adam	1,3	2,3	+	6,25	2,2	-
12	Jurek	3,4	2,4	+	7,50	1,0	-
13	Berber	0,3	0,3	+	6,88	1,3	-
14	Bosman	2,0	1,4	+	6,25	0,9	-
15	Promyk	2,5	2,9	+	6,00	0,5	-
16	Courage	2,1	3,1	+	6,25	1,3	-

Tabela. 7. Wpływ zróżnicowanych bakterii *C. sepedonicus* na kultury *in vitro* ziemniaka.

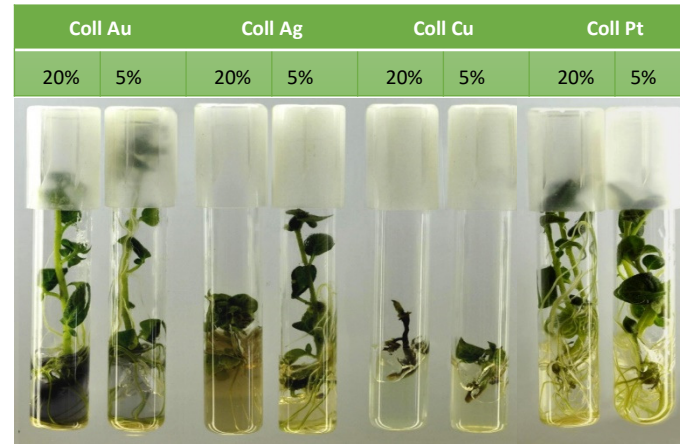
Badane szczepy <i>C. sepedonicus</i>	Badane odmiany ziemniaka roślin <i>in vitro</i>	
	Odmiana wrażliwa	Odmiana tolerancyjna
Szczep mukoidalny		
Szczep średniomukoidalny		
Szczep niemukoidalny		
KN (bez Cms)		

- ✓ Opracowano efektywny sposób porażania roślin *in vitro* bakteriami oraz metodę izolacji i identyfikacji bakterii Cs z tkanek tych roślin.
- ✓ Badane odmiany kultur *in vitro* wykazały zróżnicowaną wrażliwość na obecność bakterii Cs.
- ✓ Badając kultury *in vitro* nie zaobserwowano odmian całkowicie tolerancyjnych na porażenie badanymi szczepami bakterii.
- ✓ Wykazano przydatność opracowanej metodyki molekularnej w diagnostyce kontaminacji kultur *in vitro*. Obecność bakterii testem molekularnym potwierdzono praktycznie w większości badanych prób pozytywnych, często pomimo braku objawów makroskopowych na badanych roślinach.
- ✓ Stosowanie mieszanin patogenicznych szczepów *C. sepedonicus* powodowało znacznie silniejsze oddziaływanie fitotoksyczne u badanych odmian niż stosowanie pojedynczych szczepów tej mieszaniny przy analogicznej koncentracji komórek bakterii w próbce.
- ✓ Zauważono jednak, że stopień oddziaływania na kultury *in vitro* danego szczepu zależy przede wszystkim od wrażliwości badanej odmiany oraz patogeniczności szczepu, natomiast w mniejszym stopniu od koncentracji bakterii w badanej próbce.

Ważniejsze wyniki i wnioski



Rys.11. Oddziaływanie nanocząsteczek metali koloidalnych Ag, Cu, Au i Pt na patogeniczny szczep *C. sepedonicus* na impregnowanych tymi koloidami podłożach mikrobiologicznych YGM.



Rys.12. Oddziaływanie nanocząsteczek metali koloidalnych na badane kultury *in vitro* ziemniaka.

Tabela. 8. Oddziaływanie mieszaniny koloidów względem kultur *in vitro* i bakterii *C. sepedonicus*.

Próba Nr	Koncentracja nanocząsteczek w podłożu wzrostowym [%]	Zdrowotność roślin <i>in vitro</i>		Wynik testu mikrobiol.
		KP (Inkubacja z Cms)	KN (bez Cms)	
1.	1,0 % Ag/Cu + Pt			-
2.	0,5 % Ag/Cu + Pt			-
3.	0,1 % Ag/Cu + Pt			-
4.	KN (Pt)			+

- ✓ Zidentyfikowano potencjalne źródła zakażeń mikrobiologicznych w podłożach wzrostowych kultur *in vitro*.
- ✓ Opracowano metodykę wytwarzania i standaryzacji nanocząsteczek metali koloidalnych złota, srebra, miedzi i platyny, która pozwoliła uzyskiwać w sposób powtarzalny jednorodne zawiesiny poszczególnych koloidów, jak i ich mieszanin.
- ✓ Zaobserwowano zróżnicowany wpływ opracowanych koloidów na badane szczepy bakterii *C. sepedonicus*, jak i kultury *in vitro* badanych odmian ziemniaka.
- ✓ Silne oddziaływanie antybakteryjne w stosunku do *C. sepedonicus* zaobserwowano przy zastosowaniu nanocząsteczek miedzi i srebra, natomiast pośrednie i neutralne działanie wykazywały odpowiednio koloidy platyny i złota. Wyższą efektywność działania nanokoloidów obserwowano u szczepów silnie mukoidalnych i przy zastosowaniu wyższych koncentracji nanocząsteczek.
- ✓ Badane odmiany kultur *in vitro* z różną wrażliwością reagowały na koloidy, natomiast w podobny sposób na te same koncentracje. Działanie stymulujące zaobserwowano przy zastosowaniu nanocząsteczek złota i platyny, natomiast fitotoksyczne srebra i miedzi, przy czym niższe stężenia toksycznych koloidów powodowały lepszy wzrost i namnażanie się badanych roślin.
- ✓ Synergizm działania kilku koloidów w mieszaninach pozwalał uzyskać lepszą efektywność antymikrobiologiczną oraz niższą fitotoksyczność przy relatywnie niższej koncentracji.

Ważniejsze osiągnięcia projektu

- ✓ Opracowanie i ocena metodyki oczyszczania przeciwciał poliklonalnych,
- ✓ Opracowanie i ocena jakości nowych przeciwciał anti-Cs,
- ✓ Opracowanie nowych materiałów diagnostycznych do identyfikacji bakterii Cs oraz materiałów do budowy matrycy do izolacji bakterii z tkanki roślinnej w warunkach środowiskowych,
- ✓ Opracowanie immunopodłoża z IgG anti-Cs oraz potwierdzenie jego skuteczności jako narzędzia diagnostycznego w zewnętrznych laboratoriach badawczych w obecności komponentów soku różnych odmian ziemniaka zróżnicowanych pod względem wczesności i zawartości skrobi.
- ✓ Opracowanie i potwierdzenie skuteczności nowej procedury izolacji DNA bakteryjnego z tkanki roślin i bulw ziemniaka w obecności zróżnicowanych mukoidalnie szczepów bakterii Cs,
- ✓ Opracowanie i potwierdzenie skuteczności metody immunokoncentracji w diagnostyce molekularnej łodyg i bulw ziemniaków, których sadzeniaki sztucznie inokulowano zróżnicowanymi mukoidalnie szczepami bakterii Cs,
- ✓ Określenie zdolności zróżnicowanych mukoidalnie bakterii Cs do infekowania roślin utrzymywanych w kulturach *in vitro*, poprzez opracowanie efektywnego sposobu porażania roślin *in vitro* bakteriami Cs, opracowanie metody izolacji i identyfikacji bakterii Cs z kultur *in vitro* oraz selekcja odmian ziemniaka o największej wrażliwości na porażenie bakteriami Cs.
- ✓ Opracowanie mieszanin nanocząsteczek metali koloidalnych i ocena ich wpływu na zróżnicowane mukoidalnie szczepy bakterii Cs oraz badane kultury *in vitro*.

Uzyskane wyniki projektu stały się podstawą opracowania nowego projektu PBwPR MRiRW.

Publikacje

1. Stochła W., Przewodowski W., Przewodowska A. 2014. Wybrane metody otrzymywania przeciwciał służących do wykrywania i identyfikacji patogenów ziemniaka. *Ziemn. Pol.* 3:46-49.
2. Chołuj J., Przewodowski W. 2014. Technika PCR i jej modyfikacje w identyfikacji patogenów ziemniaka. *Ziemn. Pol.* 2: 40-45.
3. Pietraszko M., Gryń G., Pastuszewska T., Przewodowski W., Przewodowska A. 2015. Podatność wybranych odmian ziemniaka na porażenie bakteriami *Clavibacter michiganensis* subsp. *sepedonicus* w zróżnicowanych warunkach glebowych. *Biul. IHAR-PIB (277)*: 97-108.
4. Stochła W., Przewodowska A., Przewodowski W. 2015. Wykrywanie bakterii *Clavibacter michiganensis* subsp. *sepedonicus* przy użyciu przeciwciał króliczych uzyskiwanych dwoma różnymi sposobami. *Prog. Plant Prot.* 55, 3: 352-357.
5. Chołuj J., Przewodowski W., Przewodowska A. 2015. Wpływ różnych sposobów izolacji kwasów nukleinowych z bakterii na czułość testu PCR. *Prog. Plant Prot.* 55, 3: 321-326.
6. Gryń G., Pastuszewska T., Przewodowski W. 2016. Ocena patogeniczności wybranych szczepów *Clavibacter michiganensis* subsp. *sepedonicus* pochodzących z kolekcji NCPPB w Wielkiej Brytanii. *Postępy w Ochronie Roślin/ Prog. Plant Prot.* 56 (1): 73-78. DOI:10.14199/ppp-2016-013.
7. Pietraszko M., Gryń G., Przewodowski W. 2018. An Effect of Weather and Soil Conditions and Their Interaction on Infection of Leaves and Tubers of Potato with Bacteria *Clavibacter michiganensis* subsp. *sepedonicus*. *Am. J. Potato Res.* (2018) 95: 278–285. <https://doi.org/10.1007/s12230-017-9629-6>.
8. Przewodowski W., Salamońska K., Szarek, Michałowska D., Stochła W., Przewodowska A., Gryń G., Pietraszko M., Franke K. 2019. Badania nad opracowaniem metod selektywnej izolacji oraz czulej identyfikacji bakterii *Clavibacter michiganensis* ssp. *sepedonicus* w trudnych diagnostycznie próbach środowiskowych. *Biuletyn IHAR (286)*: 265-269.
9. Gryń G., Pietraszko M., Przewodowski W., Franke K., Nowakowski M., Nowakowski M. Reaction of the selected potato varieties to *Clavibacter sepedonicus* infestation under changing weather conditions. Praca w recenzji w *European Journal of Plant Pathology*.

Doniesienia konferencyjne

1. Chołuj J., Przewodowski W. 2014. Wpływ sposobu izolacji kwasów nukleinowych bakterii Cms na czułość testu PCR. (poster) (W:) Nasiennictwo i ochrona ziemniaka. Konferencja naukowo-szkoleniowa. Dźwirzyno, 15-16 maja, IHAR-PIB ZNiOZ, Bonin, Streszczenia: 59.
2. Stocha W., Przewodowska A., Przewodowski W. 2014. Wpływ sposobu izolacji przeciwciał króliczych na ich jakość. (poster) (W:) Nasiennictwo i ochrona ziemniaka. Konferencja naukowo-szkoleniowa. Dźwirzyno, 15-16 maja, IHAR-PIB ZNiOZ, Bonin, Streszczenia: 60.
3. Przewodowski W., Przewodowska A. 2014. Interaction between potato proteins and quarantine bacteria *Clavibacter michiganensis* subsp. *sepedonicus*. (208 poster) Molecular Plant-Microbe Interactions. International Society of Molecular Plant-Microbe Interactions.6 - 11.06.2014 Rodos, Grecja.
4. Pastuszewska T., Gryń G. 2015. Charakterystyka patogeniczności wybranych szczepów *Clavibacter michiganensis* subsp. *sepedonicus* z kolekcji zagranicznych. Dźwirzyno, 13-15 maja, IHAR-PIB ZNiOZ, Bonin, Streszczenia: 83-85.
5. Pietraszko M., Przewodowski W., Pastuszewska T., Gryń G. 2015. Podatność wybranych odmian ziemniaka na porażenie bakteriami *Clavibacter michiganensis* subsp. *sepedonicus* w zróżnicowanych warunkach glebowych. Dźwirzyno, 13-15 maja, IHAR-PIB ZNiOZ, Bonin, Streszczenia: 85-87.
6. Przewodowski W., Stochła W. 2015. Oczyszczanie przeciwciał króliczych metodą powinowactwa. Dźwirzyno, 13-15 maja, IHAR-PIB ZNiOZ, Bonin, Streszczenia: 87.
7. Przewodowska A., Przewodowski W. 2015. Rapid diagnostic assay for detection of bacteria using colloidal gold nanoparticles. 15 International Conference on Nanotechnology – IEEE NANO 2015, Rzym, Włochy 27 – 30 lipca 2015 r. Poster nr 629.
8. Salamońska K., Przewodowski W., Przewodowska A., Stochła W. 2016. Wpływ enzymów litycznych na izolację DNA oraz czułość testu PCR w diagnostyce kwarantannowych bakterii ziemniaka. Konferencja naukowo – szkoleniowa. Dźwirzyno, 11-13 maja, IHAR-PIB ZNiOZ, Bonin, Streszczenia: 72-73.
9. Przewodowski W., Przewodowska A. 2016. The Effect of Colloidal Metals Nanoparticles on Quarantine Bacterium – *Clavibacter michiganensis* ssp. *sepedonicus*. 18th International Conference on Biotechnology and Nanotechnology - ICBN 2016, WASET, Wenecja, Włochy 13-14 czerwca 2016r. 18 (6) Part IX. Streszczenia: 1329.
10. Przewodowski W., Przewodowska A. Sekrecka D., Michałowska D. 2016. The Influence of Colloidal Metal Nanoparticles on Growth and Proliferation of In vitro Cultures of Potato. 18th International Conference on Biotechnology and Nanotechnology - ICBN 2016, WASET, Wenecja, Włochy 13-14 czerwca 2016r. 18 (6) Part IX. Streszczenia: 1330.
11. Przewodowski W., Przewodowska A. 2017. Opracowanie nowej jakości przeciwciał poliklonalnych wykrywających kwarantannowe bakterie *Clavibacter michiganensis* subsp. *sepedonicus* (Prezentacja) [W:] 50 Konferencja naukowo-szkoleniowa "Nasiennictwo i ochrona ziemniaka", Dźwirzyno, 7-9 czerwca, IHAR-PIB ZNiOZ, Bonin, Streszczenia: 37.

Doniesienia konferencyjne

12. Salamońska K., Przewodowski W. 2017. Wpływ warunków izolacji DNA na czułość testu molekularnego w diagnostyce sprawcy bakteriozy pierścieniowej ziemniaka. (Prezentacja) [W:] 50 Konferencja naukowo-szkoleniowa "Nasiennictwo i ochrona ziemniaka", Dźwirzyno, 7-9 czerwca, IHAR-PIB ZNiOZ, Bonin, Streszczenia: 39.
13. Przewodowski W., Przewodowska A., Michałowska D., Salamońska K., Szarek D., Stochła W., Sekrecka D., 2017. Reduction of *in vitro* plant growth as an effect of pathogenic bacteria interaction. (Poster) [In:] European Biotechnology Congress 2017, EUROBIOTECH, Dubrovnik, Croatia, May 25 – 27. Journal of Biotechnology, Vol 256, Supplement, 2017: 106-107. (doi.org/10.1016/j.jbiotec.2017.06.1165).
14. Przewodowski W., Przewodowska A., Michałowska D., Sekrecka D., Salamońska K., Stochła W., Szarek D. 2017. The influence of colloidal metal nanoparticles on *in vitro* plants of potato. (Short Presentation) [In:] European Biotechnology Congress 2017, EUROBIOTECH, Dubrovnik, Croatia, May 25 – 27. Journal of Biotechnology, Vol 256, Supplement, 2017: 35 (doi.org/10.1016/j.jbiotec.2017.06.667).
15. Salamońska K., Przewodowski W., Szarek D., Stochła W., Przewodowska A. 2018. Ocena obecności śluzów bakteryjnych w diagnostyce molekularnej zróżnicowanych mukoidalnie szczepów bakterii Cms. (Prezentacja) [W:] 51 Konferencja naukowo-szkoleniowa "Nasiennictwo i ochrona ziemniaka", Dźwirzyno, 6-8 czerwca, IHAR-PIB ZNiOZ, Bonin, Streszczenia:32.
16. Stochła W., Przewodowski W., Salamońska K., Szarek D., Przewodowska A. 2018. Oczyszczanie i ocena jakości poliklonalnych przeciwciał króliczych do identyfikacji sprawcy bakteriozy pierścieniowej ziemniaka. (Prezentacja) [W:] 51 Konferencja naukowo-szkoleniowa "Nasiennictwo i ochrona ziemniaka", Dźwirzyno, 6-8 czerwca, IHAR-PIB ZNiOZ, Bonin, Streszczenia: 31.
17. Salamońska K., Przewodowski W., Szarek D., Przewodowska A., Stochła W. 2018. Evaluation of DNA isolation to the sensitivity of molecular diagnostics of Cms bacteria. (Poster) [In:] The 43rd FEBS Congress, Prague, Czech Republic, 7-12 July 2018: P.01080Tue. (https://2018.febscongress.org/abstract_preview.aspx?idAbstractEnc=4424170094092094093099424170)
18. Przewodowski W., Szarek D., Salamońska K., Michałowska D., Przewodowska A., Stochła W. 2018. Determination of the ability of *Clavibacter michiganensis* ssp. *sepedonicus* strains to infect various *in vitro* cultures of potato. (Poster) [In:] The 43rd FEBS Congress, Prague, Czech Republic, 7-12 July 2018: P.08-043-Mon.
19. Salamońska K., Przewodowski W., Szarek D., Stochła W., Przewodowska A. 2019. Diagnostyka molekularna bakterii *Clavibacter sepedonicus* comb. nov. w obecności komponentów tkankowych ziemniaka. (Prezentacja) [W:] Nasiennictwo i Ochrona Ziemniaka, 50 jubileuszowa konferencja naukowo-szkoleniowa, Dźwirzyno, 22-24 maja, Streszczenia: 31.
20. Przewodowski W., Przewodowska A., Salamońska K., Szarek D., Stochła-Potentas W. 2019. Opracowanie nowoczesnych materiałów do diagnostyki kwarantannowych bakterii ziemniaka z prób środowiskowych. (Prezentacja) [W:] Nasiennictwo i Ochrona Ziemniaka, 50 jubileuszowa konferencja naukowo-szkoleniowa, Dźwirzyno, 22-24 maja, Streszczenia: 32.