**Streszczenie zadania za 2020 r. w Programie Badań Podstawowych w Produkcji Roślinnej.**

***Numer zadania (4-3-00-6-01) - 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:** : Głównym celem realizowanego projektu było opracowanie materiałów i procedur do selektywnej izolacji kwarantannowej bakterii *Clavibacter sepedonicus* (Cs) (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 5 tematów badawczych.*

**Wyniki:**

Tegoroczne badania w ramach tematu 1 skupiały się na uzyskaniu lepszej czułości i specyficzności przeciwciał skierowanych na komórki bakterii *C. sepedonicus* oraz poprawieniu właściwości immunomatrycy do selektywnej izolacji komórek bakterii z prób środowiskowych. Uzyskane w ramach badań IgG anty-Cs cechowały się relatywnie wyższym mianem i specyficznością niż ubiegłoroczne, co potwierdziła ocena testami DAS- i PTA-ELISA. Stosując opracowaną w poprzednim roku procedurę polimeryzacji oraz wprowadzone w bieżącym modyfikacje metodyczne, otrzymano wysoką jednorodność i powtarzalność struktury polimeru na powierzchni matryc. Badanie efektywności działania opracowanych immunopodłoży potwierdziły ich przydatność w izolacji komórek Cs z prób z bulw odmian zróżnicowanych pod kątem wczesności i zawartości skrobi.

Wyniki uzyskane w ramach kolejnego tematu badawczego wskazały na wysoką efektywność opracowanej metody izolacji DNA bakterii *C. sepedonicus* z soku bulw różnych odmian ziemniaka. Udowodniono, że oceniana zmienność odmianowa, jak również ciemnienie enzymatyczne nie mają znaczącego wpływu na końcowy wynik uzyskanego testu molekularnego. Uzyskano znaczną wzajemną korelację wyników stosowanych testów molekularnych PCR i Real-Time PCR, natomiast nie zaobserwowano wyraźnej korelacji pomiędzy wczesnością i zawartością skrobi poszczególnych odmian a wynikiem wykonanych testów molekularnych. Uzyskane wyniki obu testów molekularnych mogą świadczyć o wysokim potencjale i przydatności opracowanej metody izolacji DNA w identyfikacji bakterii *C. sepedonicus* z prób pozyskiwanych w warunkach środowiskowych.

W ramach tematu 3 wykazano przydatność opracowanej metody molekularnej w identyfikacji bakterii *C. sepedonicus* w badanych próbach środowiskowych z roślin i bulw ziemniaka. Opracowana metoda pozwalała z reguły na wykrywanie większej niż w IFAS liczby porażonych latentnie prób. Znacznie wyższy indeks porażenia latentnego zanotowano w przypadku prób z bulw potomnych niż z liści i łodyg pozyskanych w okresie wegetacji. Istotny wpływ na stopień porażenia badanych roślin miał rodzaj użytego szczepu Cs, przy czym wyższy % roślin i bulw potomnych uzyskiwano w przypadku prób inokulowanych szczepem mukoidalnym *C. sepedonicus*. Wykazano istotny wpływ stosowanego profilu glebowego na wielkość plonu. Ogólnie porażeniu latentnemu łodyg sprzyjały warunki glebowe występujące na glebie lżejszej charakteryzującej się niższą wilgotnością, natomiast porażeniu bulw sprzyjały warunki gleby ciężkiej, wilgotnej. Warunki profilu glebowego w większym stopniu różnicowały nasilenie porażenia latentnego bulw niż łodyg ziemniaka.

Badania wykonane w ramach tematu 4 pozwoliły ocenić wpływ koncentracji bakterii Cs na poziom ekspresji objawów chorobowych oraz czułość testu molekularnego w badanych tkankach roślin *in vitro*. Badane odmiany wykazały zróżnicowaną wrażliwość na obecność badanych bakterii Cs, przy czym nawet w przypadku odmiany tolerancyjnej poddanej dużej presji bakterii Cs nie obserwowano całkowitej tolerancji na porażenie. Podobnie, jak w przypadku ubiegłorocznego, równoległego działania mieszaniny 3 silnie patogenicznych szczepów Cs, zastosowanie jednego, silnie patogenicznego szczepu pozwoliło uzyskać podobne efekt fitotoksyczności u badanych roślin. Obecność bakterii Cs oceniona testem PCR potwierdzono praktycznie w większości badanych prób pozytywnych często pomimo braku widocznych objawów makroskopowych na roślinach oraz zamgleń w podłożach wskazujących na silne porażenie bakteriami Cs.

Wyniki badań uzyskane w ramach ostatniego tematu badawczego dotyczącego zapobiegania kontaminacjom bakteriami Cs podłoży stosowanych do hodowli roślin *in vitro* ziemniaka, pozwoliły na ocenę wpływu mieszaniny dodatkowej substancji i koloidów metali na komórki *C. sepedonicus* oraz rośliny *in vitro* ziemniaka. Obecność dodatku polepszyła działanie antymikrobiologiczne mieszaniny w stosunku do badanego szczepu Cs zarówno na podłożach YGM, jak i w obecności tkanki roślinnej w podłożach MS. Efekt antymikrobiologiczny w stosunku do Cs odnotowano przy wszystkich stosowanych stężeniach badanej mieszaniny. Wprowadzenie dodatkowej substancji do mieszaniny koloidalnej okazało się korzystne i spowodowało złagodzenie oddziaływania fitotoksycznego tych koloidów względem badanych kultur *in vitro*. W zależności od zastosowanej koncentracji zaobserwowano zróżnicowaną wrażliwość kultur *in vitro* badanych odmian ziemniaka na obecność mieszaniny.

**Wnioski:**

1. W wyniku przeprowadzonych badań uzyskano relatywnie wyższe niż w poprzednich latach miano i specyficzność badanych przeciwciał anty-Cs.
2. Wprowadzone ulepszenia w konstrukcji matrycy pozwoliły na zwiększenie efektywności izolacji komórek bakterii z prób środowiskowych.
3. Przeprowadzona w zewnętrznych laboratoriach badawczych ocena wykazała przydatność opracowanej immunomatrycy w diagnostyce bakterii Cs w obecności komponentów soku różnych odmian ziemniaka zróżnicowanych pod względem wczesności i zawartości skrobi.
4. Opracowana procedura izolacji DNA pozwoliła na identyfikację molekularną zróżnicowanych mukoidalnie szczepów bakterii *C. sepedonicus* w obecności tkanki roślin i bulw różnych odmian ziemniaka.
5. Potwierdzono skuteczność metody immunokoncentracji w diagnostyce molekularnej łodyg i bulw ziemniaków, których sadzeniaki sztucznie inokulowano zróżnicowanymi mukoidalnie szczepami bakterii Cs.
6. Wykazano istotny wpływ stosowanego profilu glebowego na wielkość plonu. Ogólnie porażeniu latentnemu łodyg sprzyjały warunki glebowe występujące na glebie lżejszej charakteryzującej się niższą wilgotnością, natomiast porażeniu bulw sprzyjały warunki gleby ciężkiej, wilgotnej. Warunki profilu glebowego w większym stopniu różnicowały nasilenie porażenia latentnego bulw niż łodyg ziemniaka.
7. Niskie porażenie pędów nie przekładało się na niewielką liczbę komórek w plonie bulw, natomiast wysokie indeksy porażenia pędów i bulw nie miały bezpośredniego przełożenia na występowanie objawów chorobowych na liściach i w bulwach.
8. Oceniając zdolność bakterii Cs do infekowania roślin utrzymywanych w kulturach *in vitro*, stwierdzono, że zastosowanie jednego silnie patogenicznego szczepu pozwala uzyskać podobny efekt fitotoksyczności u badanych roślin jak w przypadku działania mieszaniny 3 patogenicznych szczepów Cs.
9. Obecność bakterii Cs oceniona testem PCR potwierdzono praktycznie w większości badanych prób pozytywnych często pomimo braku widocznych objawów makroskopowych na roślinach oraz zamgleń w podłożach wskazujących na silne porażenie bakteriami Cs.
10. Wzbogacenie mieszaniny koloidalnej o dodatkową substancję spowodowało złagodzenie oddziaływania fitotoksycznego badanych koloidów względem ocenianych kultur *in vitro* oraz polepszenie oddziaływania antymikrobiologicznego w stosunku do badanych bakterii *C. sepedonicus*.