**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 inż. W. Przewodowski

**Cel zadania:**

Celem realizowanego projektu było opracowanie materiałów i procedur do selektywnej izolacji kwarantannowej bakterii - *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:**

W ramach pierwszego z tematów kontynuowano badania nad uzyskaniem specyficznych przeciwciał skierowanych na komórki bakterii Cms. W tym celu na bazie mieszanin 3 szczepów bakterii Cms opracowano antygeny, które posłużyły do opracowania przeciwciał poliklonalnych skierowanych na komórki bakterii Cms. Po oczyszczeniu i ocenie jakości badanych przeciwciał, wybrane IgG anty-Cms posłużyły do opracowania immunopodłoża, którego działanie oceniano w obecności ekstraktów z bulw różnych odmian ziemniaka.

Badania wykonane w ramach kolejnego zadania skupiały się na ocenie efektywności izolacji DNA zróżnicowanych mukoidalnie szczepów bakterii Cms. Stosując opracowane w poprzednim roku warunki izolacji DNA, oceniano wpływ obecności śluzów bakteryjnych badanych szczepów Cms na czułość klasycznego testu PCR. Badania wykonywano w obecności komponentów z soku ziemniaka stosując dla każdego z ocenianych szczepów serię 7-miu 10-krotnych rozcieńczeń zawiesin oraz dwie różne metody izolacji DNA. Jako kontrole stosowano wodę molekularnie czystą. Jakość wyizolowanego DNA oceniano przy pomocy analizy spektrofotometrycznej oraz oceny elektroforegramów uzyskanych przed i po wykonaniu testu PCR.

W temacie trzecim oceniano podatność badanych odmian ziemniaka na sztuczną inokulację dwoma zróżnicowanymi mukoidalnie szczepami bakteriiCms. Badania wykonano z udziałem 6-ciu odmian ziemniaka podzielonych na dwie grupy zróżnicowane na porażenie bakteriami Cms oraz przy zastosowaniu dwóch zróżnicowanych mukoidalnie, patogenicznych szczepów bakterii Cms. Próby analizowano zarówno na roślinach podczas okresu wegetacyjnego, jak i na bulwach po zbiorze. Stopień porażenia Cms badanych odmian oceniano na podstawie takich parametrów, jak terminy wschodów, kwitnienia i zasychania roślin oraz objawów porażenia części nadziemnej roślin oraz bulw ziemniaka. W celu ustalenia dokładnych warunków środowiskowych, w których pozyskano próby do badań, w trakcie wegetacji cyklicznie mierzono temperaturę i wilgotność stosowanych profili glebowych oraz temperaturę powietrza.

W celu określenia zdolności zróżnicowanych mukoidalnie bakterii Cms do infekowania roślin *in vitro*, badania w ramach kolejnego zadania wykonano przy udziale sześciu 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 na podstawie wyniku testu PCR przeprowadzonego po uprzedniej izolacji DNA z badanych prób.

W ramach tematu dotyczącego opracowania warunków pozwalających zapobiegać kontaminacjom bakteriami Cms podłoży stosowanych do hodowli roślin *in vitro* ziemniaka, oceniano wpływ mieszaniny 3 koloidów 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:**

Wyniki uzyskane w temacie 1 pozwoliły na opracowanie materiałów do konstrukcji immunopodłoża do izolacji bakterii Cms z badanych prób. Na podstawie opracowanych antygenów, w procesie immunizacji królików uzyskano 3 surowice z IgG anty-Cms, które po oczyszczeniu badano pod kątem czułości i specyficzności względem stosowanych szczepów bakteryjnych. Do opracowania immunopodłoża użyto przeciwciał dających najlepszy stosunek miana do specyficzności. Opracowane materiały pozwoliły na opracowanie funkcjonalnego immunopodłoża do izolacji bakterii Cms z soku ziemniaka w warunkach laboratoryjnych oraz polowych.

Badania związane z weryfikacją metody izolacji DNA z zawiesin Cms o różnej zawartości śluzów bakteryjnych, potwierdziły skuteczność opracowanej metody zarówno w obecności wody, jak i komponentów soku ziemniaka. Jakość wyizolowanego DNA oceniano na podstawie pomiaru spektrofotometrycznego oraz analizy elektroforegramów zawierających produkty amplifikacji DNA po przeprowadzeniu testu PCR. W porównaniu do zalecanej obecnie metody izolacji DNA, którą stosowano jako odnośną, opracowana metoda pozwalała na uzyskanie wyższej czułości w przypadku prób z wody, ale była jednocześnie bardziej wrażliwa na komponenty soku ziemniaka. Wprowadzenie modyfikacji w opracowanej metodyce w trakcie izolacji DNA z ekstraktów roślinnych pozwoliło na uzyskanie czułości adekwatnej do metody odnośnej.

Wyniki uzyskane w ramach tematu 3 związane z porównaniem stopnia porażenia badanych roślin oraz bulw potomnych pozwoliły potwierdzić funkcjonalność opracowanych materiałów oraz metodyki izolacji DNA. Badane odmiany wykazały podobnie jak w poprzednim roku zróżnicowaną podatność na sztuczną inokulację bakteriami Cms obu szczepów. Pomimo odmiennych do poprzednich lat warunków pogodowych, stopień porażenia bakteriami Cms zależał zarówno od stosowanego profilu glebowego, jak i użytego do inokulacji szczepu Cms. Wyniki wskazały na większą efektywność szczepu silnie mukoidalnego. Najmniejszą podatność uzyskano dla odmian Courage i Ikar, natomiast największe porażenie bulw zanotowano u odmian Gwiazda i Sagitta. Stosowanie profilu glebowego miało wpływ na wysokość plonu i liczbę bulw potomnych. Metody IFAS i PCR w znacznym stopniu korelowały ze sobą potwierdzając wyższy indeks porażenia prób z bulw, niezależnie od wykrywanego szczepu Cms.

Wyniki badań uzyskane w ramach tematu 4, pozwoliły ocenić wpływ obecności zróżnicowanych mukoidalnie szczepów bakterii Cms na poziom ekspresji objawów chorobowych oraz czułość testu molekularnego w badanych tkankach roślin *in vitro*. Badane odmiany wykazały zróżnicowaną wrażliwość na obecność poszczególnych szczepów bakterii Cms. W porównaniu do wcześniejszych badań z użyciem mieszaniny 3 szczepów Cms, przy zastosowaniu pojedynczych szczepów i analogicznych koncentracji komórek bakterii w mieszaninie inokulacyjnej, oddziaływanie fitotoksyczne było znacznie słabsze. Obecność bakterii Cms 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 Cms.

Badania dotyczące zapobiegania kontaminacjom bakteriami Cms podłoży stosowanych do hodowli roślin *in vitro* ziemniaka, pozwoliły na ocenę wpływu obecności koloidu złota na działanie mieszaniny dwóch innych koloidów o działaniu antymikrobiologicznym. Obserwowano różną wrażliwość badanych odmian ziemniaka na mieszaninę koloidów, zależnie od stosowanej koncentracji. Niższe stężenia badanych koloidów powodowały lepszy wzrost i namnażanie się badanych roślin w porównaniu z roślinami kontrolnymi, natomiast zwiększenie koncentracji nanocząsteczek w mieszaninie powodowało wyższą aktywność antymikrobiologiczną w stosunku do Cms.