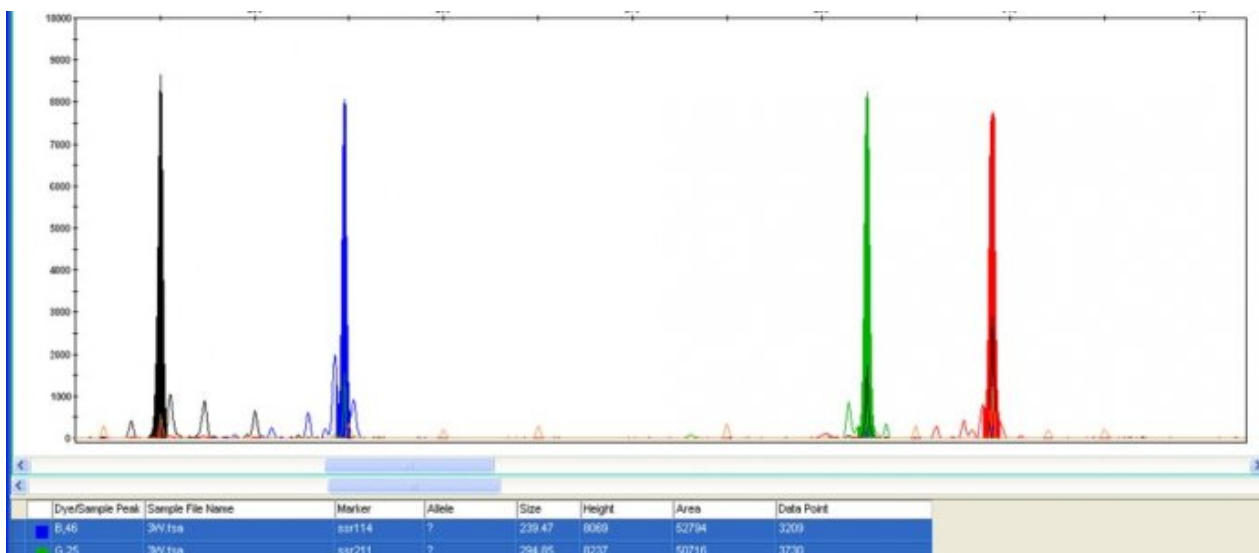




## Opracowanie metodyki oceny molekularnej skrzydlaków jesionu wyniosłego pod kątem obecności patogenu



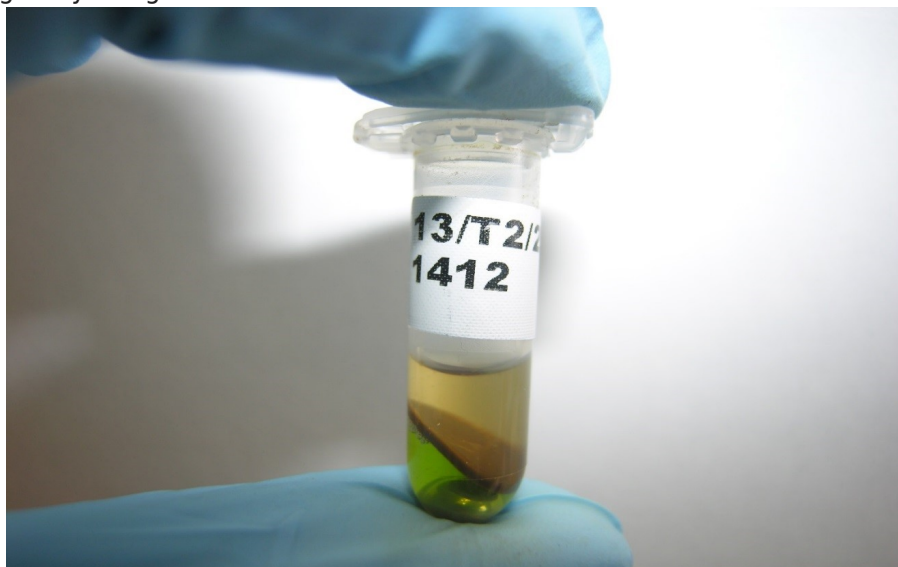
Opracowanie metodyki oceny molekularnej skrzydlaków jesionu wyniosłego pod kątem obecności patogenu *Hymenoscyphus fraxineus*. W celu potwierdzenia efektywności procesu termoterapii i krioterapii w zwalczaniu patogenu *Hymenoscyphus fraxineus* - próbki nasion poddane zostały dwóm ocenom: hodowli *in vitro* na specjalnym podłożu hodowlanym oraz analizie molekularnej pod kątem obecności materiału genetycznego patogenu.

W związku z realizacją projektu „Zachowanie różnorodności biologicznej siedlisk obszarów NATURA 2000, poprzez ochronę *ex situ* jesionu wyniosłego, wiązu górskiego, wiązu pospolitego oraz wiązu szypułkowego na terenie Polski” (FraxUmLBG) w Pracowni Analizy DNA opracowano metodykę, dzięki której możliwa jest szybka identyfikacja patogenu *Hymenoscyphus fraxineus*. Materiałem wyjściowym były fragmenty skrzydlaków jesionu wyniosłego, które wcześniej poddane zostały procesom krioterapii i termoterapii.

W ramach opracowania metodyki wykonano:

1. Izolację DNA;
2. Przegląd literatury fachowej, zakupiono markery molekularne do diagnostyki patogenu;
3. Reakcję PCR z wykorzystaniem markerów molekularnych do wykrycia DNA patogenu;
4. Analizę otrzymanych wyników.

Pierwszym etapem prac była izolacja DNA, do której wykorzystuje się komercyjne zestawy odczynników. Następnie uzyskane DNA amplifikuje się w reakcji PCR (Fot. 1, 2). Podczas tego procesu do nici DNA przyłączane zostają również markery molekularne- znakowane fluorescencyjnie. W końcowym etapie wyniki odczytywane są przy użyciu analizatora genetycznego.



Fot. 1. Izolacja DNA nasion jesionu wyniosłego (fot. A. Paśławska).



Fot. 2. Stanowisko do izolacji DNA (fot. M. Chudzińska).

Z pierwotnej puli dziewięciu markerów molekularnych, ostatecznie wybrano 4 (Ryc.1) . Materiałem, na którym testowano przydatność markerów były: kora pędów jesionu wyniosłego, skrzydlaki oraz pąki zimowe.

Otrzymywane wyniki porównano z wynikami uzyskanymi po wykorzystaniu jako matrycy- laboratoryjnie wyhodowanego szczepu *H.fraxineus* oraz innych grzybów np. włosianki rosistej (*Hebeloma crustuliniforme*) czy pieczarki (*Agaricus L.*).

Ostatecznie- ocena skuteczności krioterapii i termoterapii przeprowadzona zostanie na skrzydlakach jesionu wyniosłego, pochodzących z 17 stanowisk w Polsce.  
Połączenie metody klasycznej z metodą molekularną oceny skuteczności zabiegów eliminujących patogen- pozwoli na wybranie najbardziej optymalnej metody dla bezpiecznego, długotrwałego przechowania materiału nasiennego w LBG Kostrzyca.

Magdalena Chudzińska