

# EPIDEMIOLOGIA WYBRANYCH PODGATUNKÓW BAKTERII *CLAVIBACTER MICHIGANENSIS* ORAZ METODY ICH IDENTYFIKACJI I ZWALCZANIA

Małgorzata Waleron<sup>1\*</sup>, Maria Skrzypkowska<sup>1</sup>, Krzysztof Waleron<sup>1</sup>, Ewa Łojkowska<sup>1</sup>

<sup>1</sup>Zakład Ochrony i Biotechnologii Roślin, Katedra Biotechnologii,  
Międzyuczelniany Wydział Biotechnologii UG i AMG, ul. Kładki 24, 80-822 Gdańsk

Wpłynęło w maju 2010 r.

1. Wprowadzenie. 2. Choroby wywoływane przez bakterie z gatunku *C. michiganensis*. 2.1. Bakterioza pierścieniowa ziemniaka. 2.2. Rak bakteryjny pomidora. 3. Czynniki warunkujące patogeniczność. 4. Odpowiedź roślin na infekcję. 4.1. Odpowiedź indukowana przez infekcję powodowaną przez *C. m. subsp. sepedonicus*. 4.2. Odpowiedź indukowana przez infekcję powodowaną przez *C. m. subsp. michiganensis*. 5. Metody identyfikacji *C. michiganensis*. 5.1. Wykrywanie *C. m. subsp. sepedonicus*. 5.2. Wykrywanie *C. m. subsp. michiganensis*. 6. Nowe możliwości ochrony roślin przed patogenami z gatunku *C. michiganensis*. 7. Podsumowanie

## Epidemiology of the selected subspecies of *Clavibacter michiganensis* and methods of its identification and control

**Abstract:** The genus *Clavibacter* belongs to the Gram-positive bacterial phytopathogens, which cause serious diseases that lead to heavy economic losses. The genus *Clavibacter* consists of only one species *Clavibacter michiganensis* (*Cm*) which is subdivided into five subspecies according to their host specificity. *Clavibacter michiganensis* subsp. *michiganensis* (*Cmm*) causes bacterial wilt and canker of tomato, *Clavibacter michiganensis* subsp. *sepedonicus* (*Cms*) is responsible for ring rot of potato, *Clavibacter michiganensis* subsp. *insidiosus* (*Cmi*) causes wilting and stunting in alfalfa, *Clavibacter michiganensis* subsp. *nebraskensis* (*Cmn*) induces wilt and blight of maize, and *Clavibacter michiganensis* subsp. *tessellarius* (*Cmt*) causes spots in wheat. Bacteria from different subspecies are highly specific for their host plants although another plant species can be infected artificially. Latent infection with no or mild symptoms also occur. The bacteria from subspecies *Cmm*, *Cms*, and *Cmi* are quarantine organisms, under strict quarantine control.

The virulence factors typical for *Clavibacter* are, extracellular cellulase, hypersensitive response inducing proteins, exopolysaccharides, and secreted enzymes such as xylanase, polygalacturonase and serine protease. For *Cmm* it was shown that the essential pathogenicity determinants are located on plasmid while all the gene functions required for infection, successful colonization, and suppression of plant defenses are carried on the chromosome. In case of *Cms* it is similar but more determinants have chromosomal origin.

The detection and identification of these Gram-positive pathogens are based on biochemical and physiological characteristics, as well as pathogenicity assays. For immunological tests, diagnostic kits are available for some subspecies, but these kits have experimental limitations because of serological cross-reactivity. Recently several PCR based techniques have been proposed for *Cmm* and *Cms* detection and identification.

1. Introduction. 2. Diseases caused by bacteria belonging into *C. michiganensis* species. 2.1. Ring Rot. 2.2. Bacterial canker. 3. Pathogenicity factors. 4. Plant response induced by *C. michiganensis* infection. 5. Detection and identification of bacteria from *C. michiganensis* species. 6. New methods of elimination of pathogens belonging into *C. michiganensis* species. 7. Summary

**Słowa kluczowe:** *Clavibacter michiganensis* subsp. *michiganensis*, *Clavibacter michiganensis* subsp. *sepedonicus*, metody wykrywania, identyfikacja, metoda biologiczna zwalczania

**Key words:** *Clavibacter michiganensis* subsp. *michiganensis*, *Clavibacter michiganensis* subsp. *sepedonicus*, detection, identification, biological control method

## 1. Wprowadzenie

Rodzaj *Clavibacter*, należący do rodziny *Microbacteriaceae*, ustanowiony został dla wąskiej grupy Gram-dodatnich patogenów roślin charakteryzujących się wysoką zawartością par GC w genomowym DNA. Cechy wyróżniające i charakteryzujące cały gatunek to obecność w ścianie komórkowej kwasu 2,4-diaminomasłowego [26], powolny wzrost kolonii bakteryjnych (od pięciu do nawet trzydziestu dni) oraz układ komórek w obrębie kolonii w kształcie litery V [48].

Pozycja taksonomiczna rodzaju *Clavibacter* ulegała zmianom [21]. Z dawnego rodzaju *Clavibacter* w obrębie którego wyróżniano 5 gatunków: *C. michiganensis*, *C. iranicum*, *C. rathayi*, *C. tritici* i *C. xyli* (wraz z podgatunkami *xyli* i *cynodontis*) [14] wyodrębniono nowe rodzaje *Rathayibacter* [56, 67] i *Leifsonia* [22]. Bakterie należące do wyżej wymienionych rodzajów różnią się zakresem gospodarzy, rodzajem powodowanych objawów chorobowych, a co za tym idzie, także metodami zwalczania [46]. Do rodzaju *Rathayibacter* zalicza się gatunki *R. iranicus*, *R. rathayi*, *R. tritici*

\* Autor korespondencyjny: Zakład Ochrony i Biotechnologii Roślin, Katedra Biotechnologii, Międzyuczelniany Wydział Biotechnologii UG i AMG, ul. Kładki 24, 80-822 Gdańsk; fax: +48 58 5236426, tel.: +48 58 5236360, +48 58 5236343; e-mail: goniawu@biotech.ug.gda.pl

[67] i *R. toxicus* [56]. Natomiast do rodzaju *Leifsonia* należy gatunek *L. xyli*, w obrębie którego wyodrębnia się dwa podgatunki *L. xyli* subsp. *cynodontis* i *L. xyli* subsp. *xyli* [22].

Do rodzaju *Clavibacter* zawierającego najgroźniejsze, podlegające obowiązkowemu zwalczaniu patogeny roślin, zalicza się tylko jeden gatunek *C. michiganensis*, w obrębie którego wyróżnia się pięć podgatunków:

- *C. m.* subsp. *insidiosus* (*Cmi*), będący przyczyną wędnięcia lucerny siewnej (*Medicago sativa*) i innych pastewnych roślin strączkowych;
- *C. m.* subsp. *michiganensis* (*Cmm*), powodujący wędnięcie i raka bakteryjnego pomidora (*Lycopersicon esculentum*), poraża także inne rośliny z rodziny *Solanaceae*;
- *C. m.* subsp. *nebraskensis* (*Cmn*), wywołujący plamistość, gnicie i wędnięcie kukurydzy zwyczajnej (*Zea mays*);
- *C. m.* subsp. *sepedonicus* (*Cms*), powodujący wędnięcie i bakteriozę pierścieniową bulw ziemniaka (*Solanum tuberosum*); inni przedstawiciele psiankowatych, jak pomidor czy oberżyna, mogą ulec zakażeniu w wyniku sztucznej inokulacji;
- *C. m.* subsp. *tessellarius* (*Cmt*), wywołujący plamistość liści – objawy podobne do objawów powodowanych przez wirusa mozaiki na pszenicy zwyczajnej (*Triticum aestivum*).

Obowiązkowemu zwalczaniu podlegają bakterie należące do 3 podgatunków: *Cmi*, *Cmm* i *Cms*. Symptomy w postaci wędnięcia oraz brak wektorów owadzich stanowią cechy wspólne dla bakterii należących do gatunku *C. michiganensis* [46]. Mimo, iż wszystkie bakterie należące do tego gatunku są patogenami ważnych gospodarczo roślin, najwięcej uwagi poświęca się identyfikacji i eliminacji ze środowiska bakterii należących do dwóch podgatunków: *Cmm*, *Cms*.

Wystąpienie *Cms* na polach uprawnych powoduje znaczne straty gospodarcze. Bezpośrednie straty wynikają z wędnięcia części nadziemnych ziemniaka i gnicia wtórnego bulw, zarówno podczas wzrostu roślin na polu, jak i w czasie ich późniejszego przechowywania. Nawet w przypadku infekcji bezobjawowych (latentnych) może dojść do redukcji plonów. Straty pośrednie związane są z przepisami krajowymi i wymogami Unii Europejskiej, podjętymi w celu ograniczenia rozprzestrzeniania *Cms*. Należą do nich: obowiązkowe przeprowadzanie badań na obecność patogena w materiale siewnym i eksportowym oraz zakaz eksportu materiału z terenów, na których stwierdzono obecność patogena [49]. Występowanie bakterii z podgatunku *Cms* ogranicza się do terenów o klimacie umiarkowanym, gdyż optymalna temperatura ich wzrostu jest stosunkowo niska. Zwalczanie tych mikroorganizmów jest trudne; istnieje niebezpieczeństwo długotrwałej obecności bakterii na materiałach i sprzę-

cie używanym podczas uprawy ziemniaka, a choroba może przebiegać w sposób bezobjawowy [49].

Podgatunek *Cmm* wywołuje raka bakteryjnego pomidora. Choroba ta została po raz pierwszy opisana w USA, w roku 1910. Obecnie, na całym świecie, powoduje ogromne straty gospodarcze, zarówno w uprawach polowych, jak i szklarniowych. Infekcja może prowadzić do wystąpienia plamistości owoców i liści lub zamierania młodych roślin, które są bardziej podatne na zakażenie [20]. *Cmm* rozprzestrzeniany jest głównie przez wodę, wiatr oraz zakażone nasiona, w których zachowuje żywotność nawet do 8 miesięcy [20]. Bakterie mają zdolność wnikania do tkanek roślinnych poprzez rany, powstające w obrębie korzeni oraz naturalne otwory takie jak: szparki, hydatory, znamiona słupków [20]. Źródłem infekcji roślin uprawianych w szklarniach są bakterie przeżywające na szczątkach roślinnych oraz sprzęcie stosowanym do pielęgnacji [20]. W przypadku wykrycia raka bakteryjnego uprawa podlega całkowitemu zniszczeniu [48].

## 2. Choroby wywoływane przez bakterie z gatunku *C. michiganensis*

### 2.1. Bakterioza pierścieniowa ziemniaka (*Cms*)

#### Czynnik etiologiczny

Bakterie należące do podgatunku *Cms* tworzą na podłożach laboratoryjnych kremowe lub jasno żółte kolonie, gładkie, często śluzowate. Komórki bakterii pobranych bezpośrednio z materiału roślinnego mają kształt kulisty, w przeciwieństwie do cylindrycznych form uzyskanych z hodowli na podłożach mikrobiologicznych [49]. W obu przypadkach wzrost jest powolny. *Cms* nie tworzy spor i jest wrażliwa na wysokie temperatury [63, 65]. W komórkach bakterii z tego podgatunku wykazano aktywność takich enzymów jak katalaza czy celulaza, enzymów hydrolizujących skrobię, rozkładających eskulinę oraz katalizujących syntezę kwasów z laktozy. *Cms* jako źródło węgla może wykorzystywać m.in.: L-arabinozę, D-xylozę, galaktozę, D-glukozę, D-fruktozę, D-mannozę, mannitol, arbutynę, eskulinę, celobiozę, maltozę, laktozę, sacharozę, trehalozę, D-rafinozę i D-turanozę [49].

*Cms* jest podgatunkiem słabo zróżnicowanym zarówno pod względem genetycznym, biochemicznym, jak i serologicznym. Badania genomu bakterii *Cms* z zastosowaniem amplifikacji sekwencji powtarzalnych takich jak REP (Repetitive Extragenic Element) czy BOX, potwierdziły wysoki stopień podobieństwa genetycznego pomiędzy szczepami należącymi do tego podgatunku [8, 43, 58]. Niewielkie zróżnicowanie w obrębie badanych szczepów wykazano także analizując skład polisacharydów zewnątrzkomórkowych (extracellular polysaccharides, EPS) [63, 65].

### Źródła zakażenia

Głównym źródłem zakażenia *Cms* są porażone sadzeniaki. Rozmnażając się w tkankach młodych roślin, bakterie migrują w wiążkach naczyniowych do łodyg i ogonków liściowych. Następnie kolonizacji ulegają tkanki w obrębie korzeni i rozwijających się bulw potomnych. Zakażenie tych ostatnich odgrywa dużą rolę w dalszym rozprzestrzenianiu się choroby. Zdrowe bulwy mogą ulec infekcji w efekcie wnikania bakterii przez uszkodzone tkanki. Komórki patogena są odporne na wysychanie, istnieje więc możliwość zachowania jego żywotności nawet podczas długotrwałego spadku wilgotności. Fakt ten powoduje, iż kolejnym źródłem zakażenia stają się materiały i narzędzia używane podczas uprawy i przechowywania ziemniaków [19].

Częstą praktyką, wykorzystywaną przez rolników, w celu zwiększenia ilości materiału siewnego jest krojenie sadzoniaków. Procedura ta, wykonywana nie odkażanym nożem, może prowadzić do rozprzestrzeniania się infekcji; według różnych źródeł, zainfekowana bulwa może być źródłem zakażenia od 10 do nawet 30 krojonych kolejno bulw [63]. Przenoszenie komórek bakteryjnych poprzez system korzeniowy roślin nie odgrywa znaczącej roli w epidemiologii bakteriozy pierścieniowej. W przypadku wysadzenia mieszanki zdrowych oraz porażonych bulw zaobserwowano jedynie nieznaczne przenoszenie patogena poprzez system korzeniowy. Po zastosowaniu barier glebowych transfer *Cms* został całkowicie zatrzymany [44, 63, 65].

Bakterie z podgatunku *Cms* zdolne są do przeżycia w wodach powierzchniowych przez okres do około 21 dni, w zależności od warunków środowiskowych. Czas ten może się zwiększyć nawet do 35 dni, jeżeli komórki będą zawieszane w sterylnej wodzie i przechowywane w temp. 20°C. Natomiast w temp. około 10°C czas przeżycia spada do 7 dni [63, 65]. Mimo, iż patogen zachowuje żywotność w wodach powierzchniowych przez okres od 1 do 3 tygodni, zakażenie tą drogą wydaje się być mało prawdopodobne. Związane jest to zwykle ze zbyt małą liczbą komórek bakterii (poniżej 10<sup>4</sup> jtk/ml). Jeżeli w zbiornikach wodnych znajdują się rośliny (żywiciele pośredni) umożliwiające rozmnażanie się bakterii do wysokiej gęstości, istnieje zagrożenie rozprzestrzenienia się mikroorganizmów na nawadniane uprawy. Ryzyko rozprzestrzeniania się choroby na tej drodze jest jednak stosunkowo niewielkie, ponieważ *Cms* ma ograniczony zakres potencjalnych roślin żywicielskich. Nie rozmnaża się na przykład w tkankach *Solanum dulcamara* – przedstawicieli wodnych roślin psiankowatych, obecnych na kontynencie europejskim [64]. Ponadto zaobserwowano, iż przechowywanie *Cms* w wodzie często powodowało utratę wirulencji [66].

Istnieją doniesienia mówiące, iż także owady mogą być wektorami *Cms*. Dotyczą one nielicznych ga-

tunków chrząszczy, skoczaków i mszyc. Taki sposób przenoszenia bakterii z podgatunku *Cms* występuje rzadko, gdyż najczęściej liczba przenoszonych komórek patogena jest niewystarczająca do zapoczątkowania infekcji [63].

### Objawy i przebieg choroby

Bakterioza pierścieniowa ziemniaka, powodowana przez *Cms*, jest chorobą wiązek przewodzących, zarówno bulw, łodyg, jak i liści [49]. We wczesnej fazie infekcji, po przekrojeniu bulwy w części przystolonowej, obserwuje się charakterystyczne przebarwienie stref otaczających naczynia. Obszar ten, wraz z rozwojem bakteriozy, staje się miękki, ulega rozpadowi, uwalniając kremowy, bezwonny śluz zawierający komórki bakteryjne. Dalsze przebarwienie i gnicie jest wynikiem zarówno aktywności produkowanych przez *Cms* celulaz [49], jak i infekcji wtórnych, powodowanych na przykład przez bakterie z rodzaju *Pectobacterium* wywołujące mokrą zgniliznę.

Objawy na części nadziemnej roślin ziemniaka ujawniają się późno, czasami dopiero pod koniec okresu wegetacji. Prowadzi to do mylenia symptomów bakteriozy z symptomami innych chorób lub skutkami suszy czy starzenia. Wędnięcie następuje w sposób powolny, początkowo ogranicza się do krawędzi niżej położonych liści. Jeżeli zakażenie dotyczy młodej części fyllosfery, możliwy jest jej dalszy wzrost, jednakże w efekcie często powstają źle ukształtowane, zdeformowane rośliny. Z powodu zablokowania wiązek przewodzących przez bakterie i wytwarzane przez nie EPS liście odbarwiają się, żółkną, a ostatecznie, wraz z łodygami, obumierają. Niekiedy jednak na roślinach jest całkowicie brak śladów porażenia lub jedynym symptomem bakteriozy jest redukcja wielkości bulw [49]. Objawy na roślinach, jeżeli występują, obserwuje się od czerwca do sierpnia [49].

### Czynniki wpływające na rozwój choroby

Rodzaj objawów oraz ich nasilenie zależne jest od takich czynników jak wielkość i rodzaj inokulum bakteryjnego oraz odmiana ziemniaka. Jednak największe znaczenie zdają się mieć warunki środowiskowe takie jak temperatura, wilgotność, nasłonecznienie i skład gleby [63, 65]. Optymalna temperatura wzrostu dla *Cms* wynosi około 20–23°C. Jest, więc stosunkowo niska, co ogranicza zasięg występowania choroby do chłodniejszych rejonów świata, takich jak północna, północno-zachodnia oraz Europa Środkowa i Ameryka. Mimo to rozwój symptomów bakteriozy pierścieniowej zachodzi szybciej w wysokich temperaturach, zwykle powyżej 24°C. Prawdopodobnie ta dotyczy tak temperatur powietrza, jak i gleby [63, 65]. Temperatura wpływa także na rodzaj obserwowanych objawów. Rozmnażanie się bakterii w glebie o temp. 25°C stymuluje defoliację,

temp. 21°C stwarza optymalne warunki do rozwoju typowych objawów bakteriozy pierścieniowej, natomiast w temp. 15°C rośliny wykazują nietypowe oznaki zakażenia *Cms* [40].

W celu wyhodowania odmian ziemniaka odpornych na bakteriozę pierścieniową, tworzono mieszańce somatyczne pomiędzy dzikim gatunkiem – *Solanum acaule* subsp. *acaule*, który wykazywał wysoką odporność na infekcję *Cms* a ziemniakiem zwyczajnym (*S. tuberosum*). Nie uzyskano jednak mieszańców odpornych na *Cms*. Stwierdzono natomiast, iż w roślinach z wyższą zawartością materiału genetycznego *S. acaule* subsp. *acaule* namnażanie komórek bakteryjnych zachodziło mniej efektywnie. Zaobserwowano, że niska podatność roślin z gatunku *S. acaule* subsp. *acaule* na *Cms* jest ściśle uzależniona od temperatury. W temp. 21°C indukowana była odporność roślin na zakażenie *Cms*, natomiast w temp. 15°C rośliny były podatne na infekcję. Przeprowadzone przez L a u r i l a i wsp. [40] badania wykazały, iż *S. acaule* subsp. *acaule* jest raczej podgatunkiem tolerancyjnym, niż odpornym na *Cms*.

W glebie komórki *Cms* mogą przetrwać stosunkowo krótko. Dłuższy niż kilka tygodni okres przeżywalności (do 3 lat) obserwowano jedynie wówczas, gdy w glebie obecne były resztki roślin żywicielskich [19]. Obniżenie temp. gleby do 4°C oraz niska zawartość wody sprzyjają zachowaniu żywotności *Cms* [64]. Istnieją jednak sprzeczne dane na temat wpływu wilgocci na rozwój symptomów choroby. Niektóre źródła podają, że nadmiar wody hamuje wystąpienie objawów [53]; inne podają przykłady silniejszego porażenia roślin ziemniaka, w przypadku intensywnego nawadniania pól [63, 65].

Istnieje także zależność między rozwojem bakteriozy, a natężeniem światła słonecznego [63, 65]. Rośliny rosnące na podłożu bogatym w fosfor i związki azotu wykazują zwiększoną podatność na kontaminację *Cms* [63].

#### Inne rośliny zakażane przez *Cms*

Lista roślin żywicielskich dla *Cms* ogranicza się przede wszystkim do ziemniaka, oberżyny i pomidora, należących do rodziny psiankowatych. Jednak znaczenie gospodarcze ma tylko infekcja ziemniaka. Wy tłumaczeniem takiego stanu rzeczy może być fakt, iż przenoszenie patogena zachodzi znacznie efektywniej poprzez bulwy, niż nasiona. Badając rolę gatunków roślin uprawnych w rozprzestrzenianiu *Cms*, przeprowadzono sztuczną inokulację takich roślin jak: kukurydza (*Zea mays*), pszenica (*Triticum* sp.), jęczmień (*Hordeum* sp.), owies (*Avena* sp.), fasola (*Phaseolus* sp.), groszek (*Lathyrus* sp.), rzepak (*Brassica napus*), cebula (*Allium cepa*) oraz pięć odmian buraka cukrowego (*Beta vulgaris* subsp. *vulgaris*). Patogena wykryto we wszystkich roślinach, za wyjątkiem cebuli i bura-

ka. Ponowna izolacja komórek bakteryjnych możliwa była jedynie z tkanek: kukurydzy, fasoli, groszku i rzepaku, przy czym na tym ostatnim obserwowano nawet symptomy porażenia. Żadna z roślin inokulowanych poprzez system korzeniowy nie wykazywała obecności *Cms* w teście immunofluorescencyjnym (IF). Analizując prawdopodobieństwo rozmnażania lub choćby przeżywania bakterii w chwastach, sztucznie zainokulowano trzynaście gatunków chwastów, najczęściej występujących w uprawach ziemniaka. W tkankach większości roślin *Cms* zachowywała żywotność przez okres 4 do 8 tygodni. Badania wykazywały jednak obecność niewielkiej liczby bakterii w 1 g tkanki. Na tej podstawie wysunięto wniosek, iż rośliny uprawne i chwasty nie odgrywają większej roli w epidemiologii bakteriozy pierścieniowej [63, 65].

## 2.2. Rak bakteryjny pomidora (*Cmm*)

### Czynnik etiologiczny

Podobnie jak wszystkie podgatunki *C. michiganensis*, *Cmm* patogen pomidora nie posiada zdolności do ruchu ani wytwarzania przetrwalników. Do hodowli bakterii *Cmm* wymagana jest pożywka zawierająca agar odżywczy z glukozą lub podłoże zawierające dodatek peptonu i wyciągu drożdżowego. Uzyskiwane kolonie są gładkie, lśniąco, okrągłe, zazwyczaj żółte. Niekiedy izoluje się szczepy wytwarzające różowe, czerwone, pomarańczowe barwniki lub nie wytwarzające żadnych barwników [20]. Wśród cech biochemicznych, niejednokrotnie wykorzystywanych do identyfikacji patogena, najważniejszymi są: tlenowy metabolizm glukozy, produkcja kwasu z mannozy w warunkach tlenowych, hydroliza skrobi, żelatyny, eskuliny i kazeiny oraz wydzielanie siarkowodoru. *Cmm* wytwarza katalazę, ale nie wykazuje aktywności oksydazy. Komórki *Cmm* mogą wykorzystywać octan lub bursztynian sodu jako jedyne źródło węgla; są odporne na zasolenie i rosną na podłożu zawierającym 6% NaCl. Do ważniejszych enzymów wytwarzanych przez tego patogena należą także celulazy i lipazy [61, 48].

Komórki *Cmm* wykazują zmienną morfologię, fakt ten utrudnia ich prawidłową identyfikację [63, 65]. Na podstawie analizy polimorfizmu rejonu nie kodującego występującego między genami 16S i 23S rRNA [11], a także różnych innych technik określanych jako fingerprinting t.j. RAPD PCR [12, 17] rep PCR [17, 36, 38, 43], AFLP [17] zaobserwowano zróżnicowanie genetyczne szczepów *Cmm*.

### Źródło zakażenia

*Cmm* kolonizuje roślinę – gospodarza za pomocą dwóch mechanizmów determinujących późniejsze objawy chorobowe. Rezultatem infekcji systemicznej jest zablokowanie przez bakterie wiązek przewodzących,

a co za tym idzie, więdnienie rośliny. Rzadziej dochodzi do wzrostu bakterii na powierzchni rośliny, w ranach powstałych w wyniku uszkodzeń mechanicznych lub w aparatach szparkowych [20]. Najpoważniejszym źródłem raka bakteryjnego w uprawach polowych jest stosowanie niecertyfikowanych, skażonych nasion [26]. Ich kontaminacja ma zazwyczaj charakter powierzchniowy i wynika z kontaktu z zainfekowanym mięszem owoców [48]. Siła kiełkowania i dojrzewanie takiego materiału siewnego jest zredukowana, a uzyskane rośliny są mniej żywotne i słabiej plonują. Największym zagrożeniem jest wprowadzanie patogena na tereny wolne od choroby. Jeżeli pogoda sprzyja rozwojowi raka, nawet niewielka liczba komórek bakteryjnych może stać się przyczyną rozległych zakażeń [61].

Uprawy szklarniowe są zagrożone głównie ze względu na możliwość przetrwania *Cmm* w porażonych resztkach organicznych [48]. Okres zachowania żywotności może wynosić nawet do kilkunastu miesięcy, ale dotyczy to przede wszystkim bakterii zasiedlających resztki roślinne pozostające w glebie [48]. Istnieją doniesienia o wykryciu komórek *Cmm* w resztkach roślinnych pozostawionych na powierzchni gleby przez 26 miesięcy, a w materiale roślinnym zakopanym, przez 18 miesięcy [24]. Potwierdza to przypuszczenie, iż stosowanie sprawdzonych, czystych pod względem obecności *Cmm* nasion, nie zapewnia likwidacji ognisk raka bakteryjnego [28]. Jeżeli skażeniu uległa gleba, bakterie wnikają do tkanki przewodzącej poprzez uszkodzenia mechaniczne łodyg lub korzeni i rozprzestrzeniają się poprzez system naczyń; rozmnażają się do gęstości nawet  $10^9$  jtk/gram tkanki [27]. Przeprowadzając analizę przeżywalności *Clavibacter* w glebie, zanotowano obecność żywych komórek w temp.  $-20^{\circ}\text{C}$ , po okresie dziewięciu miesięcy. Wzrost w temp. do  $5^{\circ}\text{C}$  powodował skrócenie tego okresu do 3 tygodni [4]. Ponieważ *Cmm* może przeżywać na powierzchni narządzi i pojemników, zabiegi takie jak defoliacja czy cięcie roślin, mogą prowadzić do rozprzestrzenienia się choroby wywoływanej przez te bakterie [48].

### Objawy i przebieg choroby

W warunkach szklarniowych chorobę we wczesnym etapie można rozpoznać dzięki matowo-zielonym lub oleistym plamom, pomiędzy wiązkami naczyniowymi liści. Zmiany z czasem przybierają postać nekrotyczną, nadając roślinie wygląd jakby porażonej słońcem [48]. Do pierwszych symptomów infekcji spowodowanej przez *Cmm* należy odwracalne więdnienie roślin podczas upalnych dni, w kolejnym etapie więdnienie powodowane przez zatykanie wiązek naczyniowych staje się trwałym i prowadzi do odwodnienia roślin [20]. Jeżeli warunki środowiskowe nie sprzyjają podziałom komórkowym bakterii, objawy w postaci odwracalnego więdnienia mogą pozostać niezauważone,

ze względu na prowadzoną podczas uprawy defoliację [48]. Po przekrojeniu łodyg lub ogonków liściowych, obserwuje się obecność żółtych lub czerwono-brązowych przebarwień wiązek przewodzących. W przypadku silnej infekcji naczyniowej łodygi łatwo tracą tkankę okrywającą oraz wykazują nadmierną lepkość z powodu obecności śluzu bakteryjnego [48].

Owoce roślin zakażonych systemicznie opadają nierozwinięte bądź stają się marmurkowane [48]. Podczas upraw polowych pierwszym symptomem raka jest wysychanie i zwijanie się krawędzi dojrzałych liści [20]. W przypadku wnikania *Cmm* poprzez hydatory pierwszym objawem jest żółknięcie brzegów blaszki liściowej, prowadzące do powstawania nekroz [48]. Zakażone rośliny charakteryzuje słaby wzrost i powolne usychanie, często bez objawów więdnienia. W stadium zaawansowanej choroby, na liściach i szypułkach pojawiają się białe brodawki [48, 20]. Rodzaj i nasilenie symptomów zależy od odmiany pomidora i wieku uprawy w momencie zakażenia [48]. Jeżeli infekcja nastąpiła w późnej fazie wegetacji, rośliny mogą przeżyć cały cykl wegetacyjny i plonować. W takim przypadku istnieje jednak duże prawdopodobieństwo kontaminacji nasion [27]. Owoce roślin pomidora, porażonych *Cmm*, wykazują niekiedy charakterystyczne plamistości zwane „ptasimi oczkami”. Początkowo przybierają one postać małych wybrzuszeń, systematycznie zwiększając swoją średnicę do kilku milimetrów, stają się brązowe, chropowate i otoczone białawą obwódką [48]. Ponieważ sezon upraw szklarniowych trwa cały rok, objawy raka bakteryjnego pomidora mogą być obserwowane od stycznia do grudnia [48].

### Inne rośliny zakżane przez *Cmm*

Pomimo, iż największe znaczenie ekonomiczne ma infekcja pomidora, zakażenie bakteriami z gatunku *Cmm* zostało potwierdzone w przypadku takich roślin z rodziny psiankowatych jak: *Solanum douglasii*, *Solanum nigrum*, *Solanum triflorum*. Istnieją także doniesienia o możliwości infekowania: fasoli (*Phaseolus* sp.), groszku (*Lathyrus* sp.), ogórka (*Cucumis* sp.), kukurydzy (*Zea mays*), melona (*Cucumis melo*), a także najczęściej uprawianych zbóż: pszenicy (*Triticum* sp.), żyta (*Secale* sp.), jęczmienia (*Hordeum* sp.) oraz owsa (*Avena* sp.) [20].

Źródłem zakażenia bakteriami z rodzaju *Clavibacter* są przede wszystkim zainfekowane tkanki roślin zarówno z widocznymi objawami chorobowymi jak i bez objawów. Ponadto źródłem infekcji mogą być bakterie zasiedlające powierzchnie liści wielu, wymienionych wcześniej gatunków roślin bez ich zakażenia [19]. O tym, iż bakterie z rodzaju *Clavibacter* mogą być epifitami, świadczyć może obecność w ich komórkach licznych barwników chroniących komórki przed promieniowaniem UV [34].

### 3. Czynniki warunkujące patogeniczność

Procesami o najistotniejszym znaczeniu dla rozwoju są: kolonizacja przez bakterie komórek i tkanek gospodarza, namnożenie się bakterii oraz dalsze rozprzestrzenianie się choroby. Syntetyzowane podczas infekcji czynniki wirulencji wpływają na powiększenie się symptomów, czym pośrednio przyczyniają się do dalszego rozprzestrzeniania choroby. W rozwoju infekcji wywołanej przez *Cms* najważniejszą rolę odgrywają zewnątrzkomórkowe celulazy oraz białka indukujące odpowiedź nadwrażliwości (hypersensitive response, HR) [63, 65] a także egzopolisacharydy (EPS) produkowane w postaci kompleksów, o różnym składzie i masie cząsteczkowej. Wykazują one powinowactwo do glikoprotein zawartych w ścianie komórek ziemniaka i biorą udział w rozpoznaniu patogena oraz inicjacji transdukcji sygnału, prowadzącego do ekspresji genów warunkujących reakcję odpornościową [54, 65]. *Cms* wytwarza także amyłazy, jednak ich rola w rozwoju procesu chorobowego jest mniejsza [39].

Natomiast bakterie z gatunku *Cmm* oprócz celulaz i EPS wytwarzają: poligalakturonazy, pektynometylosterazy oraz ksylanazy. Badania przeprowadzone przez badaczy z kilku niezależnych laboratoriów dowodzą, iż to właśnie białka zaangażowane w degradację składników ścian komórkowych, odgrywają najważniejszą rolę w rozwoju choroby [27].

#### Celulazy

Celulazy są jednymi z najważniejszych czynników wirulencji *C. michiganensis*. Degradacja polisacharydów ścian komórkowych roślin nie tylko warunkuje przenikanie patogena do tkanek roślinnych, ale także umożliwia wykorzystanie celulozy jako źródła węgla [39]. Celulaza jest wydzielanym zewnątrzkomórkowo białkiem o wielkości 78 kDa, składającym się z trzech domen. N-terminalna domena katalityczna połączona jest poprzez łącznik z domeną wiążącą celulozę (Cellulose Binding Domain, CBD). Budowa części katalitycznej, pozwala na zakwalifikowanie enzymu do rodziny celulaz A, określanych także mianem hydrolaz glikozylowych. Domena ta wykazuje odpowiednio 51% i 50% podobieństwa do endo- $\beta$ -1,4-glukonaz wytwarzanych przez bakterie z gatunków *Paenibacillus (Bacillus) polymyxa* i *Acidothermus cellulolyticus* [39]. Domena C-terminalna celulazy *C. michiganensis* zwana także Dom3, charakteryzuje się wyjątkową, jeśli chodzi o bakteryjne enzymy celulolityczne budową; przypomina domeny roślinnych białek –  $\alpha$ -ekspasyn. Białka te, zlokalizowane w ścianie komórkowej, pozwalają na wydłużanie się komórek podczas wzrostu nawet do 50%; indukują one wzrost komórkowy poprzez degradację wiązań pomiędzy glikanami [27].

Obecność domeny Dom3 ma istotny sens biologiczny, jako że enzym ten umożliwia degradację celulozy, tym samym rozluźnia strukturę ściany komórkowej. O istotności trzeciej domeny celulazy świadczy brak wirulencji szczepów nie zdolnych do jej wytwarzania. Pełną aktywność celulazy zapewnia tylko obecność wszystkich trzech domen, chociaż produkty białkowe nie zawierające CBD lub analogu ekspasyny, także katalizują degradację rozpuszczalnej karboksymetylocelulozy [39, 65].

Aktywność celulazy nie wpływa na proces kolonizacji rośliny, ale jest niezbędna do wywołania objawów chrobowych. Często spotykane podczas uprawy ziemniaków infekcje latentne, stanowiące poważny problem diagnostyczny, mogą być związane z obniżeniem poziomu ekspresji genu *celA* zlokalizowanego w obrębie plazmidu pCS1 i kodującego celulazę [47]. Bezpośrednim wynikiem działania enzymu, kodowanego przez ten gen, jest zmniejszenie grubości kanałów w ksylemie oraz brak integralności ścian komórek budujących ksylem. Fakt ten powoduje blokowanie naczyń przewodzących, upośledzenie transportu wody, czego konsekwencją jest wędnięcie i zamieranie zainfekowanej rośliny [47].

Celulazy wytwarzane przez obydwa podgatunki bakterii: *Cmm* i *Cms* wykazują wysoki poziom podobieństwa sekwencji (ponad 84% identyczności); w obu przypadkach obecne są trzy domeny, połączone sekwencjami łącznikowymi [39]. Ponadto, w przypadku obydwu omawianych podgatunków, gen *celA* kodujący typową celulazę zlokalizowany jest w obrębie plazmidu a nie DNA genomowego. Natomiast na chromosomie *Cmm* zlokalizowany jest gen *celB*. Kodowany przez niego enzym posiada tylko dwie domeny: katalityczną oraz wiążącą substrat. Pozbawiony jest C-terminalnej domeny Dom3. Ponieważ pozbawiony plazmidu szczep *CMM100* nie wykazuje aktywności celulolitycznej wydaje się, iż ekspresja genu zlokalizowanego na chromosomie nie następuje lub może zachodzić na niskim poziomie. W komórkach *Cmm* zidentyfikowano także zlokalizowaną na chromosomie sekwencję genu *expA*, która warunkuje biosyntezę białka odpowiadającego budową roślinnym ekspasynom. Gen *expA* zlokalizowany jest w znacznym oddaleniu od genu *celB* [27].

W komórkach *Cms* gen *celA* zlokalizowany jest na plazmidzie pCS1 (50,5 kpz) [37]. Natomiast w przypadku patogena pomidora (*Cmm*) sekwencję genu *celA* kodującą endo- $\beta$ -1,4-glukonazę, zawiera plazmid o nazwie pCM1 (27,5 kpz), analogiczny do plazmidu CS1 *Cms* [35]. Mutanty *Cmm* pozbawione plazmidu pCM1 nie wywołują symptomów wędnięcia na zainfekowanych roślinach pomidora, a wprowadzenie plazmidu zawierającego wymienione geny, w wyniku komplementacji, przywraca bakteriom zdolność do

wywoływania objawów chorobowych [9, 27]. Brak genu *celA* nie wpływa na intensywność podziałów komórkowych bakterii z obu podgatunków [47].

#### Białka indukujące odpowiedź nadwrażliwości (HR)

Podczas kolonizacji organizmu roślinnego bakterie rozprzestrzeniają się w tkankach gospodarza poprzez wiązki przewodzące i w kolejnych etapach wywołują objawy chorobowe. Jeżeli jednak infekcja nie dotyczy typowego gospodarza, może powodować indukcję reakcji oporności w tkance roślinnej, w efekcie czego obserwowana jest reakcja nadwrażliwości [65]. Geny związane z indukcją reakcji nadwrażliwości (*hrp*) i patogennością, będące istotnymi czynnikami wirulencji fitopatogenów Gram-ujemnych, kodują: białka strukturalne systemu sekrecyjnego typu III, białka efektorowe, wydzielane za sprawą tego mechanizmu oraz białka regulatorowe kontrolujące ekspresję genów. Mutanty *hrp*<sup>-</sup> bakterii Gram-ujemnych nie są w stanie wywołać HR w roślinach opornych ani symptomów chorobowych w podatnych. Przeprowadzone badania wykazały, iż jest to wynik zbyt wolnego rozmnażania się komórek patogena, a w efekcie obniżonej efektywności kolonizacji [47]. Mimo, iż do tej pory nie znaleziono homologów genów *hrp* nie tylko w komórkach *Clavibacter*, ale także innych Gram-dodatnich patogenów, niektóre podgatunki *C. michiganensis* indukują HR w gatunkach roślin, nie będących ich typowymi gospodarzami [47]. W przypadku infekcji wywołanej przez *Cm* istotny jest fakt, iż zainfekowane komórki podlegają programowanej śmierci. Prowadzi to do wystąpienia na powierzchni tkanek roślinnych zmian nekrotycznych, które świadczą o ograniczeniu infekcji i zwalczaniu patogena. Nekrozy chronią roślinę przed dalszym rozprzestrzenianiem się bakterii [63, 65]. Liczne szczepy *Cms* powodują odpowiedź nadwrażliwości na roślinach tytoniu. Syntetyzują one białka przypominające harpiny bakterii Gram-ujemnych. Tylko izolaty zdolne do indukcji HR wywołują symptomy bakteriozy na ziemniaku lub oberżynie. Szczepy HR<sup>-</sup> są niewirulentne także wobec roślin ulegających infekcji. Również w tym wypadku niezdolność do efektywnego zakażenia wynika z niewystarczającej intensywności podziałów komórek bakteryjnych i w efekcie niewielkiej populacji bakterii, chociaż zdolność do przeżywania komórek *Cms* wydaje się pozostawać bez zmian [47]. Wyjątek stanowi szczep *Cms* P45, pozbawiony plazmidu pSC1, w obrębie którego zlokalizowany jest gen kodujący celulazę. Nie wywołuje on wyraźnych symptomów porażenia w testach biologicznych, natomiast indukuje reakcję nadwrażliwości na tytoniu [39].

Hipoteza tłumacząca odporność na infekcję zakłada interakcję pomiędzy receptorami roślin, kodowa-

nymi przez geny *R*, a elicytorami mikroorganizmów, będącymi produktami genu *avr*. Odporność polega na nekrotyzacji zakażonych obszarów, w efekcie ograniczone jest dalsze rozprzestrzenianie się bakterii [1]. *Cmm* wywołuje reakcję nadwrażliwości na roślinach tytoniu oraz dziwaczka (*Mirabilis jalapa*). Do zainicjowania całego procesu wymagana jest odpowiednia gęstość zawiesiny komórek bakteryjnych. Obserwacja symptomów HR na *M. jalapa*, po inokulacji tkanki roślinnej płynem pochodowlanym (cell-free culture supernatant, CFCS), dowodzi, iż odpowiedź rośliny powoduje wydzielany zewnątrzkomórkowo elicytor, przy czym wykluczono, iż funkcję tę miałby pełnić EPS. Szczep *Cmm* 100, pozbawiony dwóch plazmidów (pCM1 i pCM2), jest zdolny do indukcji lokalnej nekrozy, stąd wniosek, iż determinanty genetyczne białek indukujących HR zlokalizowane są w obrębie chromosomu [1]. Analiza SDS-PAGE wykazała, iż *Cmm* syntetyzuje co najmniej kilka czynników indukujących HR, których wielkości oszacowano na 12–16 kDa oraz 35–50 kDa [1]. Białka wytwarzane przez *Cmm* wykazują analogię w stosunku do białek *Cms* indukujących odpowiedź nadwrażliwości, jednakże białka *Cms* wywołują reakcję HR jedynie na roślinach tytoniu [1].

#### Egzopolisacharydy (EPS)

Tak jak większość fitopatogenów *Cms* produkuje egzopolisacharydy. Warunkują one wiele istotnych biologicznie funkcji, między innymi takie jak: oddziaływanie z komórkami gospodarza, ochronę bakterii przed niekorzystnymi warunkami środowiskowymi. Otaczając komórki bakterii EPS chronią je przed nadmierną utratą wody. Ponieważ większość składników EPS wykazuje charakter kwasowy, mogą one brać udział w wymianie jonów czy wiązaniu substancji toksycznych. Ponadto EPS umożliwiają adhezję komórek do powierzchni różnych tkanek roślinnych, istotną przede wszystkim w procesach inicjacji i rozprzestrzenianiu się choroby [35]. Egzopolisacharydy stanowią mieszaninę heterogennych polimerów o kwasowej lub rzadziej obojętnej naturze [42]. Zawartość komponentów białkowych jest niska [46]. Obecność EPS w postaci gęstych śluzów, w połączeniu z dużą liczbą komórek bakteryjnych, prowadzi do zablokowania ksylemu, a tym samym do zaburzenia transportu wody [35]. Biologiczna aktywność EPS wiąże się także z ich odczynem, a co za tym idzie, zmianą pH gleby podczas infekcji [55]. Egzopolisacharydy wytwarzane przez *Cms* składem przypominają te wydzielane przez *Cmm* oraz *Cmi*, ponieważ zawierają fukozę, galaktozę i glukozę. Dodatkowym cukrem, nieobecnym w wydzielinach bakterii z pozostałych podgatunków *C. michiganensis*, jest mannoza [35]. *Cms* wydzielają zazwyczaj znaczne ilości

egzopolisacharydów. Mimo, iż ich rola w indukcji bakteriozy zdaje się być ugruntowana, nie istnieje prosta zależność pomiędzy ich ilością, a wirulencją szczepów. Istnieją doniesienia o wyizolowaniu szczepów całkowicie pozbawionych EPS, a mimo to wysoco wirulentnych [63, 65].

Wpływ EPS na rozwój chorób wywoływanych przez bakterie z gatunku *C. michiganensis* nie został jeszcze ostatecznie ustalony. Stwierdzono, iż spełniają one szereg funkcji, m. in. chronią komórki bakteryjne przed odpowiedzią zainfekowanych komórek roślinnych, inaktywując aglutyniny czy fitoaleksyny [267]. Wśród związków wchodzących w skład EPS są także fitotoksyny; oczyszczony EPS wytwarzany przez komórki bakterii *C. michiganensis* powoduje m. in. niszczenie błon tylakoidów izolowanych chloroplastów [27]. Zmiana składu cukrowego kompleksu EPS skutkuje często brakiem zdolności do wywołania objawów chorobowych. Fakt ten sugeruje, iż budowa chemiczna EPS warunkuje „rozpoznanie się” komórek patogena i gospodarza, a tym samym wczesne stadia rozwoju choroby [35].

#### Czynnik Pat-1

W komórkach bakterii *Cmm* obecne są dwa plazmidy pCM1 i pCM2, w obrębie których zlokalizowane są swoiste determinanty genetyczne warunkujące patogeniczność, przy czym nie każdy szczep posiada oba plazmidy. Plazmid pCM1 zawiera sekwencję *celA* kodującą endo- $\beta$ -1,4-glukonazę, natomiast w obrębie plazmidu pCM2 (72 kbp) obecny jest gen kodujący czynnik Pat-1 przypominający swoją aktywnością proteazę serynową [27]. Jest to białko, o masie molekularnej 29,7 kDa, prawdopodobnie wiążące się ze ścianą komórkową. Jego budowa wykazuje wysoką homologię do proteaz serynowych, zwłaszcza  $\alpha$ -litycznej proteazy *Lizobacter enzymogenes*. Zmiana w obrębie kodonu startowego genu kodującego Pat-1 powoduje, iż rośliny inokulowane mutantem nie wykazują żadnych symptomów chorobowych. Poniżej sekwencji genu strukturalnego *pat-1* znajduje się motyw zawierający wielokrotne powtórzenia (*pat-1 rep*). Stwierdzono obecność licznych homologów *pat-1 rep*. Delecja tego regionu prowadzi do znaczącej redukcji wirulencji, nigdy jednak do jej całkowitej utraty [27].

W szczepie *Cmm* NCPPB382, znaleziono sekwencje homologiczne do genu *pat-1* zarówno na plazmidzie pCM2 jak i w obrębie chromosomu. Na plazmidzie znajdują się dwa, homologiczne fragmenty, zorientowane przeciwnie względem siebie, nazwane odpowiednio *phpA* i *phpB*. Wykazano, iż produkty genów *php* nie indukują symptomów raka pomidora [9]. Homologiczna względem *pat-1* sekwencja chromosomalna *phpA* jest pseudogenem [9].

## 4. Odpowiedź roślin na infekcję

### 4.1. Odpowiedź indukowana przez infekcję powodowaną przez *Cms*

Interakcja pomiędzy komórkami patogena a komórkami gospodarza rozpoczyna się od wzajemnego rozpoznania. Jest ono możliwe dzięki oddziaływaniom pomiędzy receptorami komórek roślinnych i czynnikami wytwarzanymi przez bakterie, indukującymi bądź hamującymi roślinne reakcje obronne [54]. W przypadku komórek *Cms* i *Cmm* funkcję tę spełniają EPS, jako że wykazują powinowactwo do glikoprotein budujących ściany komórek ziemniaka [57]. Transdukcja sygnału prowadząca do ekspresji genów roślinnych wymaga obecności receptorów zlokalizowanych w błonach komórkowych. Wykazano, iż błony komórkowe, wyizolowane z odmian ziemniaków podatnych na bakterie z gatunku *C. michiganensis*, posiadają liczne receptory wiążące EPS wytwarzane przez *Cms*. W przypadku roślin odpornych na infekcję, liczba receptorów jest znacznie mniejsza [54, 57].

Odporność na bakteriozę pierścieniową może wynikać z wysokiego powinowactwa receptorów błonowych do tych składników EPS bakteryjnych, które indukują reakcje obronne. Wiązanie czynników blokujących transdukcję sygnału do genomu komórek roślinnych skutkowałoby podatnością tkanki roślinnej na kolonizację przez *Cms* [54].

#### Zmiana aktywności peroksydazy

Egzopolisacharydy produkowane przez *Cms* stymulują wiele zmian w obrębie komórek ziemniaka. W przypadku inokulacji mało podatnych odmian odpowiednio wysokim inokulum bakterii, można obserwować lokalne zmiany nekrotyczne, przypominające odpowiedź HR w tkankach roślin nie będących żywicielami. Mogą być one wynikiem działania reaktywnych form tlenu, generowanych przez peroksydazę. Zmiana aktywności tego właśnie enzymu należy do najważniejszych, spośród opisanych do tej pory, skutków obecności EPS w zainfekowanych tkankach roślinnych [54]. Składniki kompleksu EPS, wiążąc się do zewnętrznej domeny receptorów błonowych, powodują zmianę ich konformacji. Jest ona wynikiem reakcji fosforylacji, w wyniku której następuje przeniesienie grup fosforanowych na domenę cytoplazmatyczną. To z kolei aktywuje peroksydazę sprzężoną z receptorem. Aktywność peroksydazy ma kluczowe znaczenie dla ekspresji genów warunkujących odporność oraz produkcję reaktywnych form tlenu (reactive oxygen species, ROS), odgrywających istotną rolę w reakcjach obronnych rośliny [29]. Peroksydaza bierze udział także w procesach prowadzących do lignifikacji ścian komórkowych, fotosyntezie, oddychaniu czy



regulacji wzrostu [29]. Aniony ponadtlenkowe, powstające w efekcie utleniania NADPH, przez dysmutazę ponadtlenkową, są przekształcane w nadtlenek wodoru. Wysokie stężenie rodników tlenowych oraz nadtlenku wodoru hamuje wzrost i podziały komórek patogena [29].

W komórkach bulw ziemniaka odmian podatnych na bakteriozę pierścieniową, wykazano podwyższenie poziomu peroksydazy wyniku infekcji. Istnieje kilka izoform peroksydazy, przy czym ich poziom waha się w zależności od podatności rośliny oraz rodzaju infekowanej tkanki. Komórki odporniejszych na *Cms* odmian ziemniaka, poddane działaniu EPS, nie wykazywały żadnych zmian liczby izoform peroksydaz wewnątrzkomórkowych i tych wydzielanych na zewnątrz komórek. Analogiczne działanie w przypadku odmian podatnych prowadziło do syntezy nowych izoenzymów wewnątrzkomórkowych oraz wydzielanych na zewnątrz komórek. Zwiększeniem aktywności peroksydazy charakteryzowała się przede wszystkim frakcja wewnątrzkomórkowa. Podczas infekcji komórek odpornych odmian ziemniaka następuje aktywacja peroksydaz zewnątrzkomórkowych, głównie izoformy Rf 15, która indukuje reakcję nadwrażliwości. Mechanizm tego procesu polega na indukcji aktywacji peroksydazy oraz indukcji produkcji ROS. Działanie tych ostatnich skutkuje degradacją struktur komórkowych patogena i zainfekowanych tkanek. Ponieważ aktywacja peroksydazy wywoływana przez *Cms* w podatnych komórkach roślinnych jest uwarunkowana intensywną syntezą białek enzymatycznych *de novo*, proces ten jest długotrwały. W tym czasie może dojść do efektywnej kolonizacji rośliny przez bakterie. W tym przypadku nie ma możliwości indukcji powstawania lokalnych nekroz gdyż podatne na patogena komórki roślinne nie produkują izoformy Rf 15 [30].

#### Zmiana pH środowiska

Jak już wspomniano wcześniej EPS stanowią mieszaninę związków o charakterze kwasowym bądź obojętnym [42]. Podczas infekcji powodują one obniżenie pH w tkankach roślinnych, co z kolei indukuje wędnięcie roślin i degradację komórek. Badając związek pomiędzy obecnością polisacharydów a odczynem podłoża, ustalono, że zmiana jest tym większa, im bardziej badana odmiana jest podatna na porażenie. Należy jednak zaznaczyć, iż wzrost stężenia jonów wodorowych nie wynika jedynie z bezpośredniego działania patogena. *Cms* podczas hodowli na podłożu laboratoryjnym powoduje obniżenie pH pożywki z 6,3 do 4,5. Natomiast, podczas infekcji roślin rosnących w kulturach *in vitro*, pH podłoża w przypadku roślin podatnych obniżało się do wartości 2,5. Tak duże zakwaszenie środowiska spowodowane było wydzielaniem do podłoża, także przez rośliny, niskocząstecz-

kowych kwasów. Proces ten może być efektem uwalniania do podłoża zawartości rozpadających się w wyniku infekcji komórek. Powiązanie rozwoju bakteriozy pierścieniowej z odczynem EPS potwierdzają badania, w których wyizolowane wydzieliny bakteryjne zastąpiono kwasem octowym. Jego obecność promowała analogiczne do EPS symptomy porażenia [55]. Warto wspomnieć, iż rośliny wykształciły mechanizmy ochronne pozwalające na przywrócenie odpowiedniego pH w środowisku. Badając możliwości buforujące wydzielin korzeniowych stwierdzono, iż odporne na *Cms* odmiany ziemniaka szybciej i efektywniej neutralizują kwaśne wydzieliny bakteryjne. Również doświadczenia na komórkach roślinnych, poddanych działaniu roztworu EPS, potwierdziły słabsze możliwości adaptacyjne komórek podatnych roślin ziemniaka [55].

#### Synteza białek o działaniu przeciwbakteryjnym

Rośliny, stale pozostając w kontakcie z patogenami, mogą produkować liczne substancje o działaniu przeciwbakteryjnym i przeciwwgrzybowym. Należą do nich: glukanazy, inhibitory  $\alpha$ -amylaz, peptydy inaktywujące rybosomy czy tioniny. Te ostatnie należą do amfipatycznych białek, zwiększających przepuszczalność błon komórkowych. Syntetyzowana przez *S. tuberosum* pseudotionina, Pth-St1, hamuje rozwój m. in. *Cms* oraz *Ralstonia solanacearum*. Białko to, wielkości 5 kDa, produkowane jest w ilości około 1,5 mg na kilogram masy rośliny. Ekspresja genu warunkującego biosyntezę pseudotioniny jest tkankowo specyficzna i ogranicza się do komórek łodyg, bulw oraz płatków korony. Niższe stężenia pseudotioniny mogą występować także w liściach. Białko to wykazuje silniejsze działanie antibakteryjne niż tioniny. Różnica w poziomie aktywności antibakteryjnej pseudotioniny i tioniny sugeruje, iż mechanizm działania obu związków jest odmienny, natomiast w trakcie infekcji wymienione związki mogą działać komplementarnie [37].

#### 4.2. Odpowiedź indukowana przez infekcję powodowaną przez *C. m. subsp. ichiganensis*

Mechanizm interakcji między komórkami roślin pomidora i bakterii z podgatunku *Cmm* nie został dokładnie poznany, a dotychczasowe badania, mające na celu uzyskanie odmian odpornych na bakterie powodujące raka bakteryjnego, zakończyły się niepowodzeniem [27]. Stosowanie klasycznych metod hodowlanych pozwoliło na uzyskanie odmian mniej wrażliwych bądź tolerancyjnych. Trzeba jednak podkreślić, iż żadna z uzyskanych linii hodowlanych nie wykazywała odporności na *Cmm*, pozwalającej na jej wykorzystanie w uprawach komercyjnych [18]. Częściowy

lub nawet całkowity brak symptomów chorobowych, charakterystycznych dla raka bakteryjnego nie świadczą o zmniejszeniu podatności roślin na infekcję, ponieważ nadal dochodziło do kolonizacji tkanek gospodarza. Naturalnie występująca, w różnych odmianach pomidora, tolerancja na tego patogena, wynika z produkcji związków hamujących podziały komórkowe *Cmm* [18].

### Produkcja tomatyny

Rośliny pomidora produkują znaczne ilości fitoaleksyn alkaloidowych. Niedojrzałe owoce zawierają  $\alpha$ -tomatynę, glikozylowany alkaloid o silnej aktywności przeciwgrzybowej i przeciwbakteryjnej. Podczas infekcji następuje indukcja produkcji tomatyny i jej akumulacja do poziomu hamującego podziały komórkowe bakterii. W efekcie dochodzi do aktywnej obrony rośliny przed zakażeniem. Dzięki poznaniu sekwencji genomu *Cmm*, zidentyfikowano gen *tomA*, kodujący tomatynazę. Enzym ten katalizuje reakcję deglikozylacji  $\alpha$ -tomatyny, do nietoksycznej tomatydy [27, 37]. Znaczenie tomatynazy dla zahamowania infekcji zostało potwierdzone w badaniach, w których wykorzystywano mutanty *Cmm tomA*; tomatyna hamowała wzrost mutantów nie wytwarzających enzymu umożliwiającego deglikozylację tomatyny, znacznie silniej, niż wzrost szczepów bakterii typu dzikiego [37].

## 5. Metody identyfikacji *C. michiganensis*

### 5.1. Wykrywanie *C. m. subsp. sepedonicus*

Wykrywanie *Cms* nastęrcza dużych trudności, ponieważ wczesne objawy bakteriozy mogą być maskowane przez naturalne procesy fizjologiczne, takie jak starzenie czy też aktywność innych mikroorganizmów patogennych. Coraz częściej występujące infekcje latentne, charakteryzują się brakiem jakichkolwiek symptomów chorobowych nawet przez 2–3 sezony wegetacyjne. W efekcie dochodzi do rozprzestrzeniania się bakterii na coraz to większych obszarach. Z tego względu, na terenie Stanów Zjednoczonych, nie hoduje się odmian ziemniaka wykazujących zwiększoną tolerancję na *Cms*. Bezobjawowe zakażenia powodują, iż wizualna ocena plantacji jest niewystarczająca, zwłaszcza, jeśli dotyczy rozwijających się roślin, a nie dojrzałych bulw. Badania laboratoryjne, z wykorzystaniem np. metod serologicznych, są niezbędne, także dlatego, iż postać symptomów zależy od wielu czynników i może ograniczać się jedynie do spadku biomasy roślin [63].

W laboratoriach diagnostycznych najczęściej stosowanymi są testy serologiczne: immunofluorescencji

pośredniej (IF) oraz immunoenzymatyczny (ELISA), analiza profilu estrów metylowych kwasów tłuszczowych (Fatty Acids Metyl Esters), łańcuchowa reakcja polimerazy (PCR), fluorescencyjna hybrydyzacja *in situ* (FISH), a dodatkowo testy biochemiczne oraz testy biologiczne [58, 59, 65]. Testy serologiczne mają niestety pewne wady. Test ELISA jest nieprzydatny w wykrywaniu szczepów bakteryjnych pozbawionych EPS, gdyż stanowią one główny antygen do produkcji przeciwciał stosowanych w komercyjnie dostępnym teście ELISA. Ponadto podczas testów serologicznych uzyskiwane są wyniki fałszywie pozytywne, których przyczyną są niespecyficzne oddziaływania przeciwciał z bakteriami saprotroficznymi [63]. Technika FISH pozwala na szybką identyfikację patogena i jednocześnie weryfikację wyników testów serologicznych. W przypadku zastosowania hybrydyzacji *in situ* do wykrywania bakterii Gram-dodatnich, a do takich należy *Cms*, w etapie wstępnym przeprowadza się preinkubację próby z lizozymem degradującym mukopeptyd obecny w ścianie komórkowej bakterii, w efekcie ułatwiona jest penetracja oligonukleotydów do komórek.

Wykrywanie *Cms* metodą PCR polega na amplifikacji fragmentów DNA plazmidowego, jednak istnieją także testy, wykorzystujące specyficzność innych elementów genomu [52]. W literaturze opisanych zostało wiele różnych starterów, których użyteczność została poddana weryfikacji [2]. Testowana jest również użyteczność mikromacierzy umożliwiających wykrycie i identyfikację bakterii na podstawie obecności w tkankach roślin, mRNA kodowanego przez różne geny [25, 62].

W Polsce obowiązujące procedury wykrywania, zwalczania i zapobiegania rozprzestrzenianiu się bakterii z rodzaju *Clavibacter* zawarte są w kilku aktach prawnych. Obowiązujące jest Rozporządzenie Ministra Rolnictwa i Rozwoju Wsi z dnia 6 kwietnia 2007 r. w sprawie szczegółowych sposobów postępowania przy zwalczaniu i zapobieganiu rozprzestrzenianiu się bakterii *C. m. subsp. sepedonicus* [Dz.U. Nr 70 poz. 427 z 19 kwietnia 2007] na podstawie art. 10 ust. 1 pkt 1–4 i art. 15 ust. 3 ustawy z dnia 18 grudnia 2003 r. o ochronie roślin [Dz. U. z 2004 r. Nr 11, poz. 94, z późn. zm.]. Przepisy rozporządzenia wdrażają postanowienia dyrektywy Rady 93/85/EWG z dnia 4 października 1993 r. w sprawie zwalczania bakteriozy pierścieniowej ziemniaka [Dz. Urz. WE L 259 z 18.10.1993, str. 1, z późn. zm.; Dz. Urz. UE Polskie wydanie specjalne, rozdz. 3, t. 15, str. 131, z późn. zm.] oraz Dyrektywa Komisji 2006/56/WE z dnia 12 czerwca 2006 r., zmieniająca załączniki do dyrektywy Rady 93/85/EWG w sprawie zwalczania bakteriozy pierścieniowej ziemniaka [Dziennik Urzędowy L 182, 04/07/2006 P. 0001–0002].

Najnowsze metody wykrywania *Cms*

Ponieważ zwalczanie *Cms* polega przede wszystkim na nakładaniu kwarantanny na obszarach jej występowania, niezwykle istotnym jest szybkie i wiarygodne wykrywanie tego fitopatogena. Opracowano wiele metod spełniających te założenia.

Do identyfikacji *Cms* za pomocą techniki PCR wykorzystuje się oligonukleotydowe sekwencje starterowe homologiczne do genu kodującego 16S rRNA oraz sekwencji insercyjnej IS1121, obecnej w wielu powtórzeniach zarówno na plazmidzie, jak i genomie. Ten drugi rodzaj starterów pozwala na specyficzne wykrywanie i identyfikację bakterii z podgatunku *Cms*, także w przypadku bezplazmidowego szczepu *Cms* P45.

Zastosowanie analizy restrykcyjnej RFLP (Restriction Fragment Length Polymorphisms) amplifikowanego w reakcji PCR fragmentu genu 16S rRNA, pozwala na identyfikację patogena ziemniaka wśród pozostałych podgatunków *C. michiganensis*. Niestety nawet tak czuła metoda jaką jest reakcja PCR nie zawsze pozwala na wykrycie niewielkiej liczby komórek patogena. Zastosowanie metody Nested – PCR i dwóch par starterów pozwala na zwiększenie czułości analizy, w efekcie możliwe jest wykrywanie *Cms* na roślinach niewykazujących objawów infekcji. Taka modyfikacja klasycznej procedury PCR, pozwala na tysiąckrotne zwiększenie czułości testu; możliwe jest wykrycie patogena w przypadku obecności w mieszaninie reakcyjnej 100 komórek [41].

W przypadku wykrywania komórek patogena w tkance roślinnej pojawiają się jednak dodatkowe trudności związane z hamowaniem aktywności polimerazy DNA przez niektóre składniki homogenatu komórek ziemniaka. W efekcie można uzyskać wyniki fałszywie negatywne. Problem ten można rozwiązać przy pomocy wewnętrznej kontroli. W tym przypadku oprócz specyficznych starterów warunkujących amplifikację fragmentów materiału genetycznego patogena, wprowadza się także oligonukleotydy pozwalające na powielenie sekwencji homologicznych do fragmentów genomu ziemniaka (Multiplex PCR). Nie uzyskanie produktów amplifikacji DNA ziemniaka wskazuje na obecność w mieszaninie reakcyjnej inhibitorów reakcji PCR [51].

Znacznie szersze możliwości zastosowania reakcji PCR, bez późniejszej identyfikacji produktów amplifikacji w żelu agarozowym, daje zastosowanie amplifikacji DNA w czasie rzeczywistym (Real-Time PCR). W tym przypadku do przeprowadzenia reakcji amplifikacji i wykrycia jej produktów niezbędny jest termocyklery sprzęgnięty z fluorometrem. Produkty reakcji mogą być wykrywane dzięki zastosowaniu barwników takich jak bromek etydyliny lub barwników fluorescencyjnych (np. SYBR Green) interkalujących z amplifikowanym, dwuniciowym DNA. W innych modyfikacjach

Real-Time PCR wykorzystuje się różnego rodzaju sondy znakowane barwnikami fluorescencyjnymi (np. sondy TaqMan PCR, Molecular Beacon). Ogólna zasada polega na wykrywaniu obecności znakowanej sondy, a nie produktu reakcji PCR. Sondy typu TaqMan PCR, Molecular Beacon (tzw. latarnia molekularna) znakowane są dwoma barwnikami; pierwszy zwykle fluorescencyjny pełni funkcję „sygnalizatora” (reporter), drugi „wyciszacza” (quencher). Jeżeli znajdujące się w mieszaninie reakcyjnej DNA matrycowy hybryduje ze znakowaną sondą TaqMan PCR to polimeraza DNA mająca równocześnie właściwości nukleazy dobudowując komplementarny łańcuch DNA degraduje sondę. W efekcie degradacji sondy następuje odłączenie „sygnalizatora” od „wyciszacza”. Obecność „sygnalizatora” rejestrowana jest za pomocą fluorometru. W przypadku mającej kształt spinki sondy Molecular Beacon, w której sygnalizator i wyciszacz zlokalizowane są na przeciwległych, komplementarnych do siebie końcach sondy, hybrydyzacja sondy z produktami reakcji PCR powoduje „rozwiniecie” spinki i świecenie sygnalizatora. Real-Time PCR pozwala na skrócenie czasu analizy (nie ma potrzeby wykonywania elektroforezy) ale także na monitorowanie przebiegu reakcji oraz ilościowe oznaczenie produktu amplifikacji. Dodatkową zaletą tego typu testu jest możliwość prowadzenia całego procesu amplifikacji w jednej, zamkniętej od momentu dodania wszystkich składników mieszaniny reakcyjnej, próbówce. Ten sposób prowadzenia testu pozwala w zasadzie wyeliminować fałszywie pozytywne wyniki, których przyczyną w teście PCR jest kontaminacja próby przez DNA niewiadomego pochodzenia.

W ostatnich latach opracowane zostały systemy tzw. Smart Real-Time PCR, pozwalające na prowadzenie wykrywania i identyfikacji *Cms*, bezpośrednio na polu, lub w laboratoriach zlokalizowanych w punktach kontroli granicznej (Port Check 5th FP Project).

Jedną z najnowszych metod, opartych na amplifikacji kwasów nukleinowych w czasie rzeczywistym, jest AmpliDet RNA. Jest to połączenie izotermalnej amplifikacji nukleotydów NASBA (Nucleic Acid Sequence Based Amplification) oraz detekcji tego procesu przy pomocy sond Molecular Beacon). Synteza RNA jest możliwa przy zastosowaniu trzech enzymów: odwrotnej transkryptazy AMV, RNazy H oraz polimerazy RNA bakteriofaga T7 i dotyczy obszaru 16S rRNA. Amplifikowany jest specyficzny dla podgatunku *Cms* fragment 16S rRNA, w efekcie metoda ta pozwala na wykrywanie *Cms* w homogenizowanej tkance bulw ziemniaka. Powielanie RNA zamiast DNA, powoduje, iż metoda ta może być wykorzystana nie tylko w celach diagnostycznych, ale także do badania żywotności komórek. Teoretycznie, AmpliDet RNA pozwala na wykrycie takich ilości 16S rRNA,

które odpowiadają obecności w mieszaninie reakcyjnej jednej komórki bakteryjnej. W praktyce jednak wymagana jest obecność 10 komórek zdolnych do tworzenia kolonii, gdyż część RNA ulega degradacji podczas izolacji [62].

Nie tylko metody biologii molekularnej okazują się wartościowymi, jeśli chodzi o diagnostykę *Cms*. Nadal prowadzone są doświadczenia nad wykorzystaniem testów biochemicznych, pozwalających na wykrywanie charakterystycznej dla patogena aktywności enzymatycznej. Testy API 50CH zawierają podłoża z dodatkiem wielu węglowodanów, rekomendowanych do wykrywania *Cms*. Test API ZYM pozwala na identyfikację 20 egzoenzymów. Zastosowanie API 50CH wymaga przygotowania zmodyfikowanego podłoża YMA (Yeast Mannitol Agar) ponieważ bakterie z gatunku *C. michiganensis* nie rosną na wielu standardowych pożywkach. Testy typu API, stosuje się w przypadku wykrywania wielu gatunków mikroorganizmów. Jednak, ze względu na bardzo wolne podziały komórkowe w przypadku *Cms* metoda ta nie jest użyteczna. Rozwiązaniem jest wprowadzanie indykatorów zmian pH. Test API 50CH pozwala na rozróżnienie bakterii z podgatunku *Cms* od innych bakterii z gatunku *C. michiganensis* oraz patogenów ziemniaka, z rodzaju *Pectobacterium* i *Ralstonia*. Identyfikację można wykonać także stosując API ZYM, w teście tym bakterie z podgatunku *Cms* różnią się co najmniej jedną aktywnością enzymatyczną od bakterii z pozostałych podgatunków *C. michiganensis* [50].

## 5.2. Wykrywanie *C. m. subsp. michiganensis*

Patogen pomidora należy do organizmów podlegających obowiązkowemu zwalczaniu. O każdym podejrzeniu wystąpienia *Cmm* należy powiadomić organy Państwowej Inspekcji Ochrony Roślin i Nasiennictwa. Podobnie jak w przypadku *Cms*, nie ma metod zwalczania choroby po wystąpieniu symptomów. Ochrona roślin ogranicza się do wysiewania sprawdzonego, wolnego od patogena materiału, dezynfekcji sprzętu, stosowania płodozmianu oraz usuwaniu resztek roślinnych pozostałych w glebie po uprawach. Jeżeli potwierdzona zostanie obecność *Cmm*, miejsce uprawy podlega izolacji, a uzyskane plony – zniszczeniu [48].

Procedura diagnostyczna dotyczy: izolacji mikroorganizmu z porażonych tkanek, zidentyfikowania gatunku patogena i określenia stopnia wirulencji. Istnieją odrębne metodyki wykrywania patogena w roślinach i nasionach [48]. Jeżeli wynik przynajmniej jednego testu wstępnego jest pozytywny musi zostać zweryfikowany w testach patogeniczności prowadzonych z wykorzystaniem roślin wskaźnikowych i w testach serologicznych: aglutynacja, IF lub ELISA [48].

Najnowsze metody wykrywania *Cmm*

Wykrywanie i identyfikacja *Cmm* stanowi poważny problem, w szczególności jeżeli komórki patogena występują w małej liczbie. Dlatego też, prowadzone są intensywne badania pozwalające na opracowanie efektywnych metod jego wykrywania [16]. Posiewy na specyficzne podłoża mikrobiologiczne, zalecane jako jedna z metod identyfikacji, charakteryzują się stosunkowo niską czułością, ze względu na wolny wzrost *Cmm* i możliwość zaciemnienia obrazu przez bakterie saprotroficzne [20].

Sortowanie immunomagnetyczne komórek bakterii IMS (Immunomagnetic Separation) pozwala na ominięcie tego problemu. Kulki magnetyczne opłaszczane specyficznymi przeciwciałami, pozwalają na wybiórczą izolację komórek *Cmm* z badanej próby. Wyizolowane w ten sposób komórki wysiewane są na podłoża selektywne. IMS może być także techniką poprzedzającą przeprowadzenie reakcji PCR ze starterami specyficznymi dla *Cmm* [16]. Połączenie IMS i reakcji PCR jest metodą czułą, ponieważ umożliwia specyficzne wykrywanie 10 j.t.k. patogena w 1 ml zawiesiny. Zastosowanie IMS pozwala na wyizolowanie 90% komórek *Cmm* z mieszaniny, w której obecne jest jest tysiącrotnie więcej komórek bakterii z rodzaju *Pseudomonas* sp. Stosowanie w procedurze IMS przeciwciał poliklonalnych daje bardzo dobre rezultaty. Najprawdopodobniej ich niższa specyficzność, prowadząca do tworzenia mniej stabilnych kompleksów z antygenem, ułatwia uwalnianie komórek z kompleksów, które tworzą z mikrokulkami [16].

Zastosowanie do wykrywania *Cmm* w tkance roślinnej, metody PCR ograniczone jest obecnością inhibitorów polimerazy w homogenatach tkanek roślinnych. Efektywność testu PCR można zwiększyć poprzez zastosowanie tzw. BIO-PCR, w którym w pierwszym etapie badania rozmnaża się bakterie na specyficznym, optymalnym dla *Cmm* podłożu mikrobiologicznym [10]. W rezultacie nawet jeżeli w oryginalnej próbce były tylko pojedyncze komórki bakterii po etapie „wzbogacenia” można je łatwo wykrywać. Tak więc Bio-PCR, pozwala na obniżenie poziomu wykrywalności komórek mikroorganizmów. BIO-PCR pozwala na wykrycie jednego zakażonego nasiona w partii 10000 nasion. Jest to bardzo ważne, gdyż nawet bardzo niski procent zainfekowanego materiału siewnego może prowadzić do epidemii raka bakteryjnego w sprzyjających warunkach środowiskowych [31].

Mimo licznych zalet opisanych powyżej innowacyjnych technologii wykrywania i identyfikacji *Cmm* i *Cms* nie mogą być one stosowane w oderwaniu od tradycyjnych metod diagnostycznych. Nie można także zapominać o fakcie, iż bardzo istotny jest sposób pobierania prób materiału roślinnego do oznaczeń, czyli jego reprezentatywność. Uwaga ta dotyczy szczególnie

materiału roślinnego nie wykazującego objawów chorobowych, a podejrzanego o zainfekowanie mikroorganizmami podlegającymi obowiązkowemu zwalczaniu. Niezależnie od czułości metody, którą zastosujemy do wykrywania *Cms*, pobierając 200 bulw ziemniaka z partii zawierającej 25 ton, mamy tylko 96% szans na wykrycie patogena jeżeli 1% bulw jest nim zainfekowana. Właściwa strategia wykrywania i identyfikacji czynników chorobotwórczych i ochrony roślin wymaga zintegrowanego działania opartego o właściwe pobieranie prób, testy biologiczne i immunologiczne oraz nowoczesne technologie molekularne.

## 6. Nowe możliwości ochrony roślin przed patogenami z gatunku *C. michiganensis*

Zwalczanie bakteryjnych patogenów roślin środkami takimi jak antybiotyki czy związki miedzi, nie tylko nie przynosi pożądanych rezultatów, ale stanowi także źródło zagrożenia dla środowiska. Dlatego też stale prowadzone są prace nad opracowaniem efektywnych metod i preparatów. U ich podstawy leży zrozumienie czynników warunkujących wirulencję [35].

### Zwalczanie bakteriozy pierścieniowej ziemniaka

Jedną z metod ochrony roślin przed chorobami opiera się na wykorzystaniu czynników biologicznych. Wykorzystując antagonizm szczepów bakteryjnych, zapobiega się rozwojowi i rozprzestrzenianiu patogenów. Podstawą tego zjawiska może być produkcja przez bakterie antagonistyczne antybiotyków, toksyn, sideroforów, konkurencja o niszę ekologiczną także pasożytnictwo [15]. Chcąc określić wpływ wybranych gatunków mikroorganizmów na *Cms*, wyizolowano z ryzosfery ziemniaka antagonistyczne szczepy *Pseudomonas aureofaciens* oraz *Pseudomonas fluorescences*. Wszystkie szczepy *Pseudomonas* silnie hamowały wzrost komórek *Cms*. Na dalszym etapie badań sprawdzano możliwość wykorzystania wyizolowanych szczepów do ochrony upraw szklarniowych. Podobnie, jak w przypadku testu *in vitro*, wszystkie badane izolaty, choć w różnym stopniu, ograniczały rozmnażanie się komórek *Cms* w tkankach roślin. Zastosowanie mieszaniny bakterii antagonistycznych nie wpłynęło znacząco na podwyższenie skuteczności metody [15]. W wyniku przeprowadzonych badań stwierdzono, iż czynnikiem ograniczającym wzrost *Cms* może być konkurencja o żelazo i szybszy wzrost szczepu antagonistycznego zdolnego do efektywniejszej niż *Cms* kolonizacji roślin [15].

Istotną rolę mogą odgrywać także wytwarzane przez bakterie antagonistyczne bakteriocyny, będące związkami białkowymi o aktywności bakteriobójczej

lub bakteriostatycznej. Mechanizm ich aktywności jest różny, począwszy od indukcji lizy komórek patogena do zakłócenia procesu translacji. Najczęstszym wynikiem działania bakteriocyn jest indukcja tworzenia por w błonie komórkowej [32]. Bakterie z podgatunku *Cmm* wytwarzają liczne substancje o działaniu przeciwbakteryjnym, niektóre działają antagonistycznie względem *Cms* [33]. Ze szczepów *Cmm* wyizolowano metabolity, które scharakteryzowano jako białka bogate w reszty glicyny, alaniny i izoleucyny, o masie molekularnej 13,7 kDa, których działanie polega na zakłóceniu syntezy lipidów i peptydoglikanu [33].

Wśród produkowanych przez *Cmm* metabolitów, wykryto peptyd określony mianem michiganiny A, będący przedstawicielem lantybiotyków B [32, 33]. Lantybiotyki stanowią grupę bakteriocyn z licznymi modyfikacjami potranslacyjnymi. Michiganina A wykazuje silne działanie przeciwbakteryjne względem *Cms*. Swoją budową michiganina A przypomina bakteriocynę wytwarzaną przez promieniowce *Actinoplanes liguriae*. Minimalne stężenie hamujące (Minimum Inhibitory Concentration, MIC) michiganiny A, w stosunku do szczepu *Cmm* 2136 wynosiło 30 pmol/ml, co odpowiada 30 nM [32].

### Zwalczanie raka bakteryjnego pomidora

Bakterie z podgatunku *Cmm* mogą, jak przedstawiono powyżej, być antagonistyczne względem *Cms*. Są jednak przede wszystkim organizmami podlegającymi obowiązkowemu zwalczaniu, a ich rozprzestrzenianie próbuje się ograniczać w oparciu o metodę biologiczną [6]. W trakcie badań, mających na celu identyfikację szczepów potencjalnie antagonistycznych, w stosunku do *Cmm* wyróżniono bakterie należące do czterech grup: fluorescencyjne *Pseudomonas*, promieniowce z rodzaju *Actinomycetes*, bakterie z rodzaju *Bacillus* sp. oraz niezidentyfikowane bakterie Gram-ujemne. Wyselekcjonowane szczepy były odporne na kwas nalidyksowy, ampicylinę oraz chloramfenikol a ich rozprzestrzenianie w obrębie korzeni sadzonek pomidora zachodziło z różną intensywnością [6]. Wykorzystanie zawiesiny wyizolowanych mikroorganizmów do ochrony nasion i korzeni sztucznie inokulowanych roślin pomidora skutkowało opóźnieniem rozwoju choroby, fakt ten ma istotne znaczenie, gdyż starsze rośliny są mniej podatne na raka [6].

Zastosowanie do ochrony roślin mogą także znaleźć olejki roślinne, znane z przeciwbakteryjnych i przeciwgrzybiczych właściwości. W przeciwieństwie do środków chemicznych, ich stosowanie jest bezpieczne, zarówno dla konsumenta jak i środowiska. Możliwość tworzenia kolonii przez *Cmm* została całkowicie zatrzymana przez olejki wytwarzane przez oregano (*Origanum vulgare*), tymianek (*Thymus capitatus*) i lebidkę kreteńską (*Origanum dictamnus*) zastosowane

odpowiednio w stężeniach: 100, 85 oraz 100 µg/ml. Majeranek (*Origanum majorana*) czy mięta polej (*Mentha pulegium*) wywoływały 80% redukcję wzrostu komórek *Cmm* przy stężeniu 200 µg/ml; lawenda (*Lavandula angustifolia*) całkowicie hamowała rozwój komórek bakteryjnych w stężeniu 600 µg/ml. Oprócz mniejszej toksyczności, stosowanie olejków roślinnych nie prowadzi do selekcji patogenów odpornych na stosowany środek [13].

Niektóre odmiany papryki rocznej (*Capsicum annuum*) charakteryzują się wysoką odpornością na choroby bakteryjne, a jednym z elementów ich mechanizmu obronnego są peptydy występujące w tkance liściowej. Przeprowadzono badania wpływu tych molekuł na wzrost komórek *Cmm*. Ekstrakty uzyskane ze ścian komórkowych odpornych na patogeny bakteryjne odmian papryki hamowały rozwój *Cmm*, a skuteczność wahała się od 61% do 87%, w zależności od odmiany [60].

## 7. Podsumowanie

Mimo licznych prowadzonych w wielu krajach badań bakterie z gatunku *Clavibacter michiganensis* ciągle stanowią bardzo poważne zagrożenie dla roślin ziemniaka i pomidora. Zakończenie sekwencjonowania genomu *Cmm* (AM711867) oraz *Cms* (AM849034) oraz analiza uzyskanych wyników powinny dostarczyć informacji o genach warunkujących biosyntezę czynników determinujących wirulencję oraz zaangażowanych w interakcję patogen – roślina [5, 26]. Z całą pewnością wyniki tych badań dostarczą informacji o różnicach sekwencji DNA w obrębie genomu bakterii obydwu omawianych podgatunków. Tym samym pojawiają się nowe możliwości opracowania skutecznych metod wykrywania, identyfikacji i zwalczania tych patogenów. Uzyskana wiedza może także doprowadzić do opracowania metod prowadzących do uzyskania roślin odpornych na infekcje wywoływane przez *Cmm* i *Cms*.

## Piśmiennictwo

- Alarcón C., Castro J., Muñoz F., Arce-Johnson P., Delgado J.: Protein(s) from the Gram-positive bacterium *Clavibacter michiganensis* ssp. *michiganensis* induces a hypersensitive response in plants. *Phytopathology*, **4**, 306–310 (1998)
- Arahal D.R., Llop P., Alonso M.P., Lopez M.M.: *In silico* evaluation of molecular probes for detection of *Ralstonia solanacearum* and *Clavibacter michiganensis* ssp. *sepedonicus*. *Syst. Appl. Microbiol.* **27**, 581–591 (2004)
- Bach H.J., Jessen I., Schloter M., Munch J.C.: A TaqMan-PCR protocol for quantification and differentiation of the phytopathogenic *Clavibacter michiganensis* subspecies. *J. Microbiol. Methods*, **52**, 85–91 (2003)
- Basu P.: Temperature an important factor determining survival of *Corynebacterium michiganense* in soil. *Phytopathology*, **60**, 825–827 (1970)
- Bentley S.D., Ishimaru C.A. i wsp.: Genome of the actinomycete plant pathogen *Clavibacter michiganensis* ssp. *sepedonicus* suggests recent niche adaptation. *J. Bacteriol.* **19**, 2150–2160 (2008)
- Boudyach E.H., Fatmi M., Akhayat O., Benizri E., Ait Ben Aoumar A.: Selection of antagonistic bacteria of *Clavibacter michiganensis* ssp. *michiganensis* and evaluation of their efficiency against bacterial canker of tomato. *Biocontrol. Sci. Technol.* **11**, 141–149 (2001)
- Brown S.E., Knudson D.L., Ishimaru C.A.: Linear plasmid in the genome of *Clavibacter michiganensis* ssp. *sepedonicus*. *J. Bacteriol.* **184**, 2841–2844 (2002)
- Brown S.E., Reilley A.A., Knudson D.L., Ishimaru C.A.: Genomic fingerprinting of virulent and avirulent strains of *Clavibacter michiganensis* ssp. *sepedonicus*. *Curr. Microbiol.* **44**, 112–119 (2002)
- Burger A., Gräfen I., Engemann J., Niermann E., Pieper M., Kirchner O., Gartemann K.-H., Eichenlaub R.: Identification of homologues to the pathogenicity factor *Pat-1*, a putative serine protease of *Clavibacter michiganensis* ssp. *michiganensis*. *Microbiol. Res.* **160**, 417–427 (2005)
- Burokienė D.: Early detection of *Clavibacter michiganensis* ssp. *michiganensis* in tomato seedlings. *Agron. Res.* **4**, 151–154 (2006)
- Burokienė D., Sobiczewski P., Berczyński S.: Phenotypic characterization of *Clavibacter michiganensis* ssp. *michiganensis* isolates from Lithuania. *Phytopathol. Polonica*, **38**, 63–77 (2005)
- Burokienė D., Puławska J., Sobiczewski P.: Genetic diversity of *Clavibacter michiganensis* ssp. *michiganensis* isolates from Lithuania. *Phytopathol. Polonica*, **38**, 79–90 (2005)
- Daferera D.J., Ziogas B.N., Polissiou M.G.: The effectiveness of plant essential oils on the growth of *Botrytis cinerea*, *Fusarium* sp. and *Clavibacter michiganensis* ssp. *michiganensis*. *Crop. Prot.* **22**, 39–44 (2003)
- Davis M.J., Gillaspie A.G., Vidaver A.K., Harris R.W.: *Clavibacter*: a new genus containing some phytopathogenic coryneform bacteria, including *Clavibacter xyli* ssp. *xyli* sp. nov., ssp. nov. and *Clavibacter xyli* ssp. *cynodontis* ssp. nov., pathogens that cause ratoon stunting disease of sugarcane and Bermudagrass stunting disease. *Int. J. Syst. Bacteriol.* **34**, 107–117 (1984)
- De La Cruz A., Popławski A., Wiese M.: Biological suppression of potato ring rot by fluorescent *Pseudomonads*. *Appl. Environ. Microbiol.* **58**, 1986–1991 (1992)
- De León L., Sivero F., Rodriguez A.: Detection of *Clavibacter michiganensis* ssp. *michiganensis* in tomato seeds using immunomagnetic separation. *J. Microbiol. Methods*, **67**, 141–149 (2006)
- De León L., Rodríguez A., Llop P., López M.M., Siverio F.: Comparative study of genetic diversity of *Clavibacter michiganensis* ssp. *michiganensis* isolates from the Canary Islands by RAPD-PCR, BOX-PCR and AFLP. *Plant Pathol.* **58**, 862–871 (2009)
- De Vries R.M., Stephens C.T.: Response of first tomato somaclone progeny to *Clavibacter michiganensis* subsp. *michiganensis*. *Plant Sci.* **126**, 69–77 (1997)
- Eichenlaub R., Gartemann K.-H., Burger A. *Clavibacter michiganensis*, a group of Gram-positive phytopathogenic bacteria. In S. S. Gnanamanickam (ed.), *Plant-associated bacteria*. Springer, Dordrecht, The Netherlands 2006, p. 385–422.

20. EPPO/CABI *Clavibacter michiganensis* ssp. *michiganensis*. Quarantine Pests for Europe, 2nd edn, 980–985. CAB International, Wallingford (GB). 1997
21. Euzéby J.P.: List of Prokaryotic names with Standing in Nomenclature – Genus *Clavibacter*: a folder available on the Internet. *Int. J. Syst. Bacteriol.* **47**, 590–592 (1997)
22. Evtushenko, L.I., Dorofeeva L.V., Subbotin S.A., Cole J.R., Tiedje J.M.: *Leifsonia poae* gen. nov., sp. nov., isolated from nematode galls on *Poa annua*, and reclassification of '*Corynebacterium aquaticum*' Leifson 1962 as *Leifsonia aquatica* (ex Leifson 1962) gen. nov., nom. rev., comb. nov. and *Clavibacter xyli* Davis et al. 1984 with two subspecies as *Leifsonia xyli* (Davis et al. 1984) gen. nov., comb. nov. *Int. J. Syst. Evol. Microbiol.* **50**, 371–380 (2000)
23. Fatmi M., Damsteegt V.D., Schaad N.W.: A combined agar-absorption and BIO-PCR assay for rapid, sensitive detection of *Xylella fastidiosa* in grape and citrus. *Plant Pathol.* **54**, 1–7 (2005)
24. Fatmi M., Schaad N.W.: Survival of *Clavibacter michiganensis* ssp. *michiganensis* in infected tomato stems under natural field conditions California, Ohio and Morocco. *Plant Pathol.* **51**, 149–154 (2002)
25. Fessehaie A., De Boer S.H., Levesque C.A.: New diagnostic assay based on DNA array for identification and detection of five bacterial pathogens of potato. *Phytopathology*, **92**, S25 (2002)
26. Gartemann K.H., Bartels D. i wsp.: The genome sequence of the tomato-pathogenic actinomycete *Clavibacter michiganensis* ssp. *michiganensis* NCPPB382 reveals a large island involved in pathogenicity. *J. Bacteriol.* **190**, 2138–2149 (2008)
27. Gartemann K.H., Kirchner O., Engemann J., Gräfen I., Eichenlaub R., Burger A.: *Clavibacter michiganensis* ssp. *michiganensis*: first steps in the understanding of virulence of Gram-positive phytopathogenic bacterium. *J. Biotechnol.* **106**, 179–191 (2003)
28. Gleason M., Braun E., Carlton W., Peterson R.: Survival and dissemination of *Clavibacter michiganensis* ssp. *michiganensis* in tomatoes. *Phytopathology*, **81**, 1519–1523 (1991)
29. Graskova I.A., Borovskii G.B., Kolesnichenko A.V., Voinikov V.K.: Peroxidase as a component of the signaling pathway in potato cells during ring rot infection. *Russ. J. Plant Physiol.* **51**, 621–626 (2004)
30. Graskova I.A., Romanenko A.S., Vladimirova S.V., Kolesnichenko A.V.: Changes in peroxidase activity during potato ring rot infection. *Russ. J. Plant Physiol.* **51**, 476–479 (2004)
31. Hadas R., Kritzman G., Kletman F., Gefer T., Manulis S.: Comparison of extraction procedures and determination of the detection threshold for *Clavibacter michiganensis* ssp. *michiganensis* in tomato seeds. *Plant Pathol.* **54**, 643–649 (2005)
32. Holtsmark I., Mantzilas D., Eijsink V.G.H., Brurberg M.B.: Purification, characterization, and gene sequence of michiganin a, an actagardine – like lantibiotic produced by the tomato pathogen *Clavibacter michiganensis* ssp. *michiganensis*. *Appl. Environ. Microbiol.* **72**, 5814–5821 (2006)
33. Holtsmark I., Mantzilas D., Eijsink V.G.H., Brurberg M.B.: The tomato pathogen *Clavibacter michiganensis* ssp. *michiganensis*: producer of several antimicrobial substances. *J. Appl. Microbiol.* **102**, 416–423 (2007)
34. Jacobs J.L., Carroll T.L., Sundin G.W.: The role of pigmentation, ultraviolet radiation tolerance, and leaf colonization strategies in the epiphytic survival of phyllosphere bacteria. *Microb. Ecol.* **49**, 104–113 (2005)
35. Jahr H., Bahro R., Burger A., Ahlemeyer J., Eichenlaub R.: Interactions between *Clavibacter michiganensis* and its host plants. *Environ. Microbiol.* **1**, 113–118 (1999)
36. Kamasa J.: Charakterystyka, diagnostyka i ograniczanie występowania bakteryjnego raka pomidora *Clavibacter michiganensis* ssp. *michiganensis*. Praca doktorska. Zakład Wirusologii i Bakteriologii, Instytut Ochrony Roślin, Poznań 2004
37. Kaup O., Grafen I., Zellermann E.M., Eichenlaub R., Gartemann K.H.: Identification of a tomatinase in the tomato-pathogenic actinomycete *Clavibacter michiganensis* subsp. *michiganensis* NCPPB382. *Mol. Plant Microbe Interact.* **18**, 1090–1098 (2005)
38. Kawaguchi A., Tanina K., Inoue K.: Molecular typing and spread of *Clavibacter michiganensis* ssp. *michiganensis* in greenhouses in Japan. *Plant Pathol.* **59**, 76–83 (2010)
39. Laine M.J., Haapalainen M., Wahloors T., Kankare K., Nissinen R., Kassuwi S., Metzler M.C.: Cellulase encoded by the native plasmid of *Clavibacter michiganensis* ssp. *sepedonicus* plays a role in virulence and contains an expansin – like domain. *Physiol. Mol. Plant Pathol.* **57**, 221–233 (2000)
40. Laurila J., Metzler M.C., Ishimaru C.A., Rokka V.M.: Infection of plant material derived from *Solanum acaule* with *Clavibacter michiganensis* ssp. *sepedonicus*: temperature as a determining factor in immunity of *S. acaule* to bacterial ring rot. *Plant Pathol.* **52**, 496–504 (2003)
41. Lee I.M., Bartoszyk I.M., Gundersen D.E., Mogen B., Davis R.E.: Nested PCR for ultrasensitive detection of the potato ring rot bacterium, *Clavibacter michiganensis* ssp. *sepedonicus*. *Appl. Environ. Microbiol.* **63**, 2625–2630 (1997)
42. Lomovatskaya L.A., Romanenko A.S., Krivolapova N.V.: Identification of potato cells plasma membrane receptors to ring rot pathogen extra cellular polysaccharides. *Academic Open Internet Journal* ([www.acadjournal.com](http://www.acadjournal.com)) **7** (2002)
43. Louws F.J., Bell J., Medina-Mora C.M., Smart C.D., Opgenorth D., Ishimaru C.A., Hausbeck M.K., de Bruijn F.J., Fulbright D.W.: rep-PCR-mediated genomic fingerprinting: a rapid and effective method to identify *Clavibacter michiganensis*. *Phytopathology*, **88**, 8862–8868 (1998)
44. Mansfeld-Giese K.: Plant-to-plant transmission of the bacterial ring rot pathogen *Clavibacter michiganensis* ssp. *sepedonicus*. *Potato Res.* **40**, 229–235 (1997)
45. Meletzus D., Bermphohl A., Dreier J., Eichenlaub R.: Evidence for plasmid-encoded virulence factors in the phytopathogenic bacterium *Clavibacter michiganensis* ssp. *michiganensis* NCPPB382. *J. Bacteriol.* **175**, 2131–2136 (1993)
46. Metzler M.C., Laine M.J., De Boer S.H.: The status of molecular biological research on the plant pathogenic genus *Clavibacter*. *FEMS Microbiol. Lett.* **150**, 1–8 (1997)
47. Nissinen R., Kassuwi S., Peltola R., Metzler M.C.: In planta – complementation of *Clavibacter michiganensis* ssp. *sepedonicus* strains deficient in cellulase production or HR induction restores virulence. *Eur. J. Plant Pathol.* **107**, 175–182 (2001)
48. OEPP/EPPO: *Clavibacter michiganensis* ssp. *michiganensis*. *Bull. OEPP/EPPO Bull.* **35**, 275–283 (2005)
49. OEPP/EPPO: *Clavibacter michiganensis* ssp. *sepedonicus*. *Bull. OEPP/EPPO Bull.* **36**, 99–109 (2006)
50. Palomo J.L., Lopez M.M., Garcia-Benavides P., Velázquez E., Martinez-Molina E.: Evaluation of the API 50CH and API ZYM systems for rapid characterization of *Clavibacter michiganensis* subsp. *sepedonicus*, causal agent of potato ring rot. *Eur. J. Plant Pathol.* **115**, 443–451 (2006)
51. Pstrik K.-H.: Detection of *Clavibacter michiganensis* ssp. *sepedonicus* in potato tubers by multiplex PCR with

- coamplification of host DNA. *Eur. J. Plant Pathol.* **106**, 155–165 (2000)
52. Pastrik K.H., Rainey F.A.: Identification and differentiation of *Clavibacter michiganensis* subspecies by polymerase chain reaction-based techniques. *J. Phytopathol.* **147**, 687–693 (1999)
53. Pastuszewska T.: Bakterioza pierścieniowa ziemniaka – światowy problem w uprawie ziemniaka. Materiały z III Konferencji „Bakteryjne choroby roślin”, Skierniewice 2002
54. Romanenko A.S., Lomovatskaya L.A., Shafikova T.N., Borovskii G.B., Krivolapova N.: Potato cell plasma membrane receptors to ring rot pathogen extracellular polysaccharides. *Phytopathology*, **151**, 1–6 (2003)
55. Romanenko A.S., Riffel A.A., Graskova I.A., Rachenko M.A.: The role of extracellular pH-homeostasis in potato resistance to ring rot pathogen. *Phytopathology*, **147**, 679–686 (1999)
56. Sasaki J., Chijimatsu M., Suzuki K.-I.: Taxonomic significance of 2,4-diaminobutyric acid isomers in the cell wall peptidoglycan of actinomycetes and reclassification of *Clavibacter toxicus* as *Rathayibacter toxicus* comb. nov. *Int. J. Syst. Evol. Microbiol.* **48**, 403–410 (1998)
57. Shafikova T.N., Romanenko A.S., Borovskii G.B.: Plasma membrane receptors for exopolysaccharides of the ring rot causal agent in potato cells. *Russ. J. Plant Physiol.* **50**, 220–223 (2003)
58. Smith N.C., Judy Hennessy J., Stead D.E.: Repetitive sequence-derived PCR profiling using the BOX-A1R primer for rapid identification of the plant pathogen *Clavibacter michiganensis* ssp. *sepedonicus*. *Eur. J. Plant Pathol.* **107**, 739–748 (2001)
59. Stead D., Janse J.D.: Protocol for the diagnosis of quarantine organism *Clavibacter michiganensis* ssp. *sepedonicus*. ([www.fera.defra.gov.uk/plants/plantHealth/pestsDiseases/documents/protocols/clavibacter.pdf](http://www.fera.defra.gov.uk/plants/plantHealth/pestsDiseases/documents/protocols/clavibacter.pdf))
60. Teixeira F., Lima M., Almeida H., Romeiro R., Silva D., Pereira P., Fotes E., Baracat-Pereira M.: Bioprospection of cationic and anionic antimicrobial peptides from Bell pepper leaves for inhibition of *Ralstonia solanacearum* and *Clavibacter michiganensis* ssp. *michiganensis* growth. *J. Phytopathol.* **154**, 418–421 (2006)
61. Umesha S.: Occurrence of bacterial cancer in tomato fields of Karnataka and effect of biological seed treatment on disease incidence. *Crop Prot.* **25**, 375–381 (2006)
62. Van Beckhoven J.R.C.M., Stead D.E., Van der Wolf J.M.: Detection of *Clavibacter michiganensis* ssp. *sepedonicus* by AmpliDet RNA, a new technology based on real time monitoring of NASBA amplicons with a molecular beacon. *J. Appl. Microbiol.* **92**, 840–849 (2002)
63. Van der Wolf J.M., Elphinstone J.G., Stead D.E., Metzler M., Müller P., Hukkanen A., Karjalainen R.: *Epidemiology of Clavibacter michiganensis* ssp. *sepedonicus* in relation to control of bacterial ring rot. Plant Research International B.V., February 2005
64. Van der Wolf J.M., Van Beckhoven J.R.C.M.: Factors affecting survival of *Clavibacter michiganensis* ssp. *sepedonicus* in water. *J. Phytopathol.* **152**, 161–168 (2004)
65. Van der Wolf J.M., Van Beckhoven J.R.C.M., Hukkanen A., Karjalainen R., Müller P.: Fate of *Clavibacter michiganensis* ssp. *sepedonicus*, the causal organism of bacterial ring rot of potato, in weeds and field crops. *J. Phytopathol.* **153**, 358–365 (2005)
66. Vidaver A.K.: Maintenance of viability and virulence of *Corynebacterium nebraskense*. *Phytopathology*, **6**, 825–827 (1977)
67. Zgurskaya H.I., Evtushenko L.I., Akimov V.N., Kalakoutskii L.V.: *Rathayibacter* gen. nov., including the species *Rathayibacter rathayi* comb. nov., *Rathayibacter tritici* comb. nov., *Rathayibacter iranicus* comb. nov., and six strains from annual grasses. *Int. J. Syst. Bacteriol.* **43**, 143–149 (1993)