

INSTYTUT HODOWLI I AKLIMATYZACJI ROŚLIN
PAŃSTWOWY INSTYTUT BADAWCZY



**Analiza zmienności wybranych izolatów z populacji
bakterii *Clavibacter michiganensis* subsp. *sepedonicus*
(Speckermann & Kotthoff) Davis i in.**

Analysis of variability of selected isolates of *Clavibacter michiganensis* subsp. *sepedonicus*
(Speckermann & Kotthoff) Davis et al.

Agnieszka Maciejewska

Autoreferat rozprawy doktorskiej

Praca wykonana pod kierunkiem
Prof. dr hab. Edwarda Arseniuka
Zakład Fitopatologii
Pracownia Organizmów Kwarantannowych
Instytut Hodowli i Aklimatyzacji Roślin-
Państwowy Instytut Badawczy

Promotor Pomocniczy:
Dr hab. Aleksander Masny
Narodowy Instytut Zdrowia Publicznego-
Państwowy Zakład Higieny

Radzików, 2018

WSTĘP

Clavibacter michiganensis subsp. *sepedonicus* (Spieckermann & Kotthoff, 1914) Davis i in. 1984 (*Cms*) jest bakterią chorobotwórczą dla roślin i sprawcą choroby zwanej bakteriozą pierścieniową ziemniaka. Rodzaj *Clavibacter* pierwotnie zaproponowany przez Davisa i in. (1984) zawierał sześć gatunków patogenów roślin: *Clavibacter michiganensis*, *Clavibacter iranicum*, *Clavibacter rathayi*, *Clavibacter toxus*, *Clavibacter tritici* i *Clavibacter xyli*. W styczniu 2018 roku Li i współpracownicy zaproponowali na łamach *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology* nową klasyfikację taksonomiczną bakterii *Clavibacter michiganensis* subsp. *sepedonicus* do rangi nowych gatunków. Obecnie bakterie *Clavibacter michiganensis* subsp. *sepedonicus* stanowią odrębny gatunek: *Clavibacter sepedonicus* (Xiang Li i in., 2018)

Bakterioza pierścieniowa ziemniaka ze względu na ogromne straty w produkcji ziemniaków posiada status choroby kwarantannowej w Unii Europejskiej i podlega ustawowemu obowiązkowi zwalczania (Smith i in., 1997). W przypadku wykrycia tej choroby podejmowane są z urzędu działania administracyjne, określone w ustawie z dnia 18 grudnia 2003r. o ochronie roślin (Dz. U. z 2004r. Nr 11, poz. 94, ze zm.) i w rozporządzeniu Ministra Rolnictwa i Rozwoju Wsi z 26 kwietnia 2017r. w sprawie szczegółowych sposobów postępowania przy zwalczaniu i zapobieganiu rozprzestrzeniania się bakterii *Clavibacter michiganensis* subsp. *sepedonicus* (Dz. U. Nr 1, poz. 911). Stwierdzenie występowania bakteriozy pierścieniowej na plantacji ziemniaka skutkuje dyskwalifikacją plantacji, nałożeniem kwarantanny na producenta, a w dalszej konsekwencji zakazem eksportu i dystrybucji ziemniaków wewnątrz kraju. Producenci z tego tytułu ponoszą niejednokrotnie dotkliwe straty gospodarcze. Poza fizycznymi stratami materialnymi wiąże się to dodatkowo z restrykcjami prawnymi skutkującymi często kwarantanną przedsiębiorstw produkujących ziemniaki, co w konsekwencji prowadzi do ich bankructwa (Rich, 1983).

Bakterioza pierścieniowa ziemniaka jest szeroko rozpowszechnioną w świecie chorobą wywoływaną przez organizmy szkodliwe z klasy patogenów kwarantannowych. Choroba ta rozpowszechniona jest w 31 krajach na 5 różnych kontynentach (Elphinstone, 2004). Po raz pierwszy bakterioza pierścieniowa została wykryta i opisana w 1906 roku w Niemczech przez Spieckermanna. Jej obecność stwierdzono również w wielu innych krajach takich jak: Stany Zjednoczone, Ameryka Północna, Chiny, Kraje Europy północnej tj. Finlandia, Irlandia, Norwegia, Szwecja, Wielka Brytania i Kraje bałtyckie, Kraje Europy Południowej tj. Cypr, Kreta, Hiszpania, Kraje Europy Zachodniej tj. Austria, Francja i Holandia oraz Kraje Europy Wschodniej tj. Rosja (Baribeau, 1948; Massaer i in., 2014; Jorstad i in., 1932; Olsson, 1976). W Polsce w latach 1998 i 2000 występowanie tej choroby stwierdzono we wszystkich szesnastu

województwach. Za wolne od tego *Cms* są obecnie uważane Włochy, Rumunia, Słowenia, Słowacja, Irlandia, Luksemburg, Węgry i Portugalia jak również Australia (Elphinstone, 2004).

Bakterioza pierścieniowa jest niezwykle trudna do wyeliminowania. Wyniszczenie bakteriozy pierścieniowej ziemniaka, a ściślej czynnika sprawczego w 100% jest w zasadzie nieosiągalne. O pełnym wytypieniu czynnika sprawczego bakteriozy pierścieniowej nie może mówić żaden z powyżej wymienionych krajów, gdzie wystąpiła choroba. Wytłumaczenia należy szukać w fakcie występowania bakteriozy pierścieniowej w systemie produkcji na niskim poziomie i bezobjawowe porażenie bulw tą bakterią. Warto zaznaczyć, że występowaniu choroby w Polsce sprzyja struktura sektora ziemniaczanego o bardzo dużej liczbie producentów ziemniaka i niekorzystnej strukturze uprawy, charakteryzującej się niewielkimi obszarowo plantacjami ziemniaka w produkcji towarowej. Ponadto, w Polsce nadal stosuje się tradycyjne metody do obsadzania plantacji towarowych i przydomowych polegające na wykorzystywaniu sadzeniaków z własnej produkcji, co skutkuje niską wymienialnością kwalifikowanego materiału nasiennego, a to w konsekwencji sprzyja rozprzestrzenianiu się bakteriozy pierścieniowej. Patogen wywołujący tę chorobę, gdziekolwiek występuje, stwarza ogromne zagrożenie dla hodowli i nasiennictwa oraz utrudnia krajowy obrót ziemniakiem. Wyeliminowanie ognisk bakteriozy jest trudne głównie z powodu braku dostatecznie czułych metod jej detekcji i identyfikacji oraz częstego występowania tej choroby w formie latentnej (utajonej) (Ciampi i in., 1981; Nottle, 2005; Zielke i Naumann, 1984). Do tej pory nie opracowano skutecznych metod kontroli zakażeń ziemniaków bakterią *Cms* ani też nie wyhodowano odmiany ziemniaka odpornego na wywoływaną przez nią chorobę. Rutynowe metody detekcji takie jak test immunofluorescencji (IF) oraz test pośredniej immunofluorescencji (IFAS) przy zastosowaniu przeciwciał poliklonalnych i monoklonalnych nie są dostatecznie czułe. W dalszym ciągu poszukiwane są skuteczne metody szybkiej detekcji i identyfikacji bakterii *Cms*. Informacje dotyczące struktury i różnorodności populacji *Cms* są niezbędne w opracowaniu najefektywniejszej metody wykrywania i zwalczania tego patogena.

ZAŁOŻENIA I CEL PRACY

Jak dotąd niewiele wiadomo o zmienności genetycznej, w tym zmienności cech chorobotwórczych populacji bakterii *Clavibacter michiganensis* subsp. *sepedonicus* występującej w naszym kraju. Poszerzenie wiedzy dotyczącej struktury genetycznej populacji *Cms*, pomogłoby określić poziom zmienności zdolności chorobotwórczych w populacji patogena i wynikającego stąd zagrożenia dla uprawy ziemniaka w różnych regionach kraju. Co więcej, uzyskane wyniki mogły by stać się cennym źródłem informacji przydatnych do stworzenia efektywnej strategii lokalizacji plantacji ziemniaka przyczyniającej się do

ograniczania występowania bakteriozy pierścieniowej na tej roślinie w Polsce.

Dlatego za cel główny pracy postawiono zbadanie zakresu zmienności genetycznej i zmienności cech chorobotwórczych izolatów *Cms* zebranych w różnych regionach geograficznych Polski i odniesienie uzyskanych wyników do danych w światowej literaturze przedmiotu.

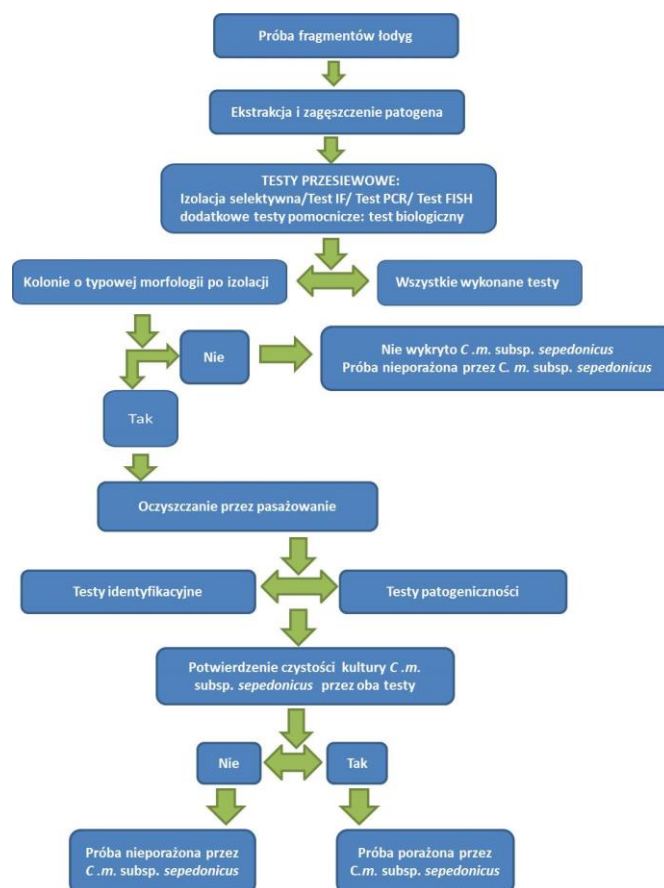
Cel główny pracy został osiągnięty w wyniku realizacji następujących celów cząstkowych:

1. założenie roboczej kolekcji izolatów bakterii z podgatunku *Clavibacter michiganensis* subsp. *sepedonicus* (*Cms*), pozyskanych z plantacji ziemniaka na terenie kraju,
2. określenie zróżnicowania patogeniczności zebranych izolatów *Cms*, w stosunku do roślin bakłażana (testy biologiczne).
3. określenie zakresu zmienności zebranej w Polsce populacji izolatów bakterii *Cms* z wykorzystaniem:
 - biotestów na patogeniczność izolatów *Cms*,
 - testów biochemicznych,
 - testów molekularnych na bazie łańcuchowej reakcji polimerazy (ang. polymerase chain reaction – PCR).

MATERIAŁY I METODY

Metodyka badań

Wszystkie prowadzone badania poprzedzające zróżnicowanie izolatów *Cms* oparte były o poniżej przedstawiony schemat obrazujący procedurę badania diagnostycznego, którego celem było wykrycie i identyfikacja bakterii *Clavibacter michiganensis* (Smith) Davis i in. subsp. *sepedonicus* (Spieckermann et Kotthoff) Davis i in. (Rys. 1).



Rys. 1. Schemat wykrywania i identyfikacji bakterii *Clavibacter michiganensis* subsp. *sepedonicus* w próbach zakażonych bulw i roślin ziemniaka.

Material bakteryjny

W badaniach wykorzystano dwieście izolatów bakterii *Clavibacter michiganensis* subsp. *sepedonicus* pozyskanych z szesnastu Wojewódzkich Inspektoratów Ochrony Roślin i Nasiennictwa (WIORiN), pochodzących z polskiej kolekcji zebranej w latach 2005-2013 w Radzikowie. Do badań włączono również szczep wzorcowy *Cms* BPRIOR 527, najczęściej stosowany do badań w polskich laboratoriach pochodzący z Banku Patogenów Roślin Instytutu Ochrony Roślin oraz 5 izolatów zagranicznych: NCPPB 3324 – izolat pochodzący z Belgii, NCPPB 3917 – izolat pochodzący z Kanady, NCPPB 2416 – izolat pochodzący z Belgii, LMG 6385 – izolat pochodzący z Norwegii, LMG 2889 – izolat pochodzący z Kanady. Do hodowli i izolacji bakterii *Cms* wykorzystano podłoża półselektywne: MNTA i NCP-88 oraz podłoża wzrostowe: YPGA oraz YGM. Bakterie *Cms* hodowano na stałych podłożach w temperaturze 23°C w cieplarni laboratoryjnej. Kultury bakteryjne utrzymywano na skosach w temperaturze 4°C.

Material roślinny

Roślinami bioindykatorowymi w testach biologicznych były rośliny bakłazana (*Solanum melongena* L, odmiana Black Beauty). Nasiona bakłazana przed wysiewem do kuwet, zaprawiono grzybobójczym preparatem miedzianu 50 WP. Siewki czternastodniowe w fazie

rozwiniętych liścieni, wysadzono po 1 sztuce do doniczki o wymiarach 90 mm × 90 mm × 100 mm (dł. × szer. × wys.) napełnionej ziemią wymieszaną z perlitem (1:20). Po upływie około 14 dni od przesadzenia, gdy co najmniej dwa, lecz nie więcej niż trzy liście były w pełni rozwinięte, rośliny zakażano zawiesinami bakterii *Cms*. Przez cały czas trwania doświadczenia rośliny hodowano w komorze fitotronowej w temp. 21-24°C, przy 14 godz. oświetleniu o natężeniu 2000 lux.

Test IFAS (test immunofluorescencji pośredniej)

W teście immunofluorescencji pośredniej wykorzystano gotowe przeciwciała poliklonalne i monoklonalne zakupione w firmie LOEWE. Test IFAS prowadzono dla 200 izolatów bakterii *Cms* włączając również kontrolę pozytywną. Dla wszystkich badanych izolatów przygotowano serię dziesięciokrotnych rozcieńczeń (10x, 100x, 1000x) w buforze PBS 0,01M pH 7.2., które w ilości 20µl наносzono na szkiełka wielopunktowe. Preparaty przeglądano pod powiększeniem 100x w mikroskopie fluorescencyjnym typu Nikon E600.

Testy patogeniczności

W celu oceny wirulencji badanych 200 izolatów *Cms* oraz dla potwierdzenia końcowej diagnozy obecności bakterii *Clavibacter michiganensis* subsp. *sepedonicus* w materiale roślinnym prowadzono testy patogeniczności na roślinach indykatorowych – bakłażanach (*Solanum melongena*). Doświadczenie prowadzono w komorze fitotronowej w ściśle kontrolowanych warunkach światła, wilgotności i temperatury. Siewki bakłażana w stadium trzeciego liścia, inokulowano zawiesinami bakterii *Cms* o koncentracji 10⁸ jtk/ml. Wykonano jednocześnie kontrolę negatywną inokulując siewki bakłażana wodą destylowaną. Rośliny inkubowano przez 40 dni. Ocenę stopnia porażenia roślin prowadzono po 12, 24 i 36 dniach od dnia inokulacji. Równolegle prowadzono również ocenę fotograficzną dla wybranej zakażonej rośliny bakłażana, w celu monitorowania rozwoju patogeniczności każdego izolatu z osobna. Doświadczenie przeprowadzono na trzech roślinach dla każdego izolatu w trzech powtórzeniach. Objawy choroby oceniono według pięciostopniowej skali Stead'a i Janse (2000).

Testy biologiczne

W celu określania charakterystyki fenotypowej 200 izolatów bakterii *Clavibacter michiganensis* subsp. *sepedonicus* przeprowadzono szereg testów biochemicznych i fizjologicznych. Wyboru prowadzonych testów dokonano zgodnie z zaleceniami zawartymi w Dyrektywie Komisji 2006/56/WE z dnia 12 czerwca 2006 r. w sprawie zwalczania bakteriozy pierścieniowej ziemniaka

Izolacja bakteryjnego DNA

Izolację bakteryjnego DNA przeprowadzono z wykorzystaniem zestawu Easy – DNA TM

(Invitrogen) postępując zgodnie z zaleceniami producenta. Koncentracja i czystość uzyskanego DNA określono spektrofotometrycznie poprzez pomiar absorbancji przy 260 nm i 280 nm (Thermo Scientific NanoDrop 1000 spektrofotometer). Tak uzyskane DNA stosowano w analizach PCR MP i VNTR.

Analiza PCR MP (PCR Melting Profile)

Metodą PCR MP scharakteryzowano 50 izolatów bakterii *Clavibacter michiganensis* subsp. *sepedonicus* różniących się stopniem patogeniczności w stosunku do roślin bakłażana. W analizie PCR MP wykorzystano 5 enzymów restrykcyjnych rozpoznających sekwencje cztero i sześci nukleotydomowe: *ApI*, *PstI*, *HindIII*, *BamHI* i *XmaI*.

Analiza VNTR (zmienna liczba tandemowych powtórzeń)

Wykorzystując analizę VNTR scharakteryzowano 50 izolatów bakterii *Clavibacter michiganensis* subsp. *sepedonicus* różniących się stopniem patogeniczności w stosunku do roślin bakłażana. Wyszukanie w bazie danych sekwencji repetytywnych w genomie bakterii *Cms* nastąpiło za pomocą programu BLAST (ang. Basic Local Alignment Search Tool). Do analizy wybrano niewielkie fragmenty sekwencji powtarzające się w genomie w niewielkiej liczbie kopii. W wyborze fragmentów VNTR kierowano się tym, aby możliwe było zaobserwowanie zróżnicowania wielkości amplifikowanych fragmentów DNA w elektroforezie w żelu agarozowym. Reakcje PCR prowadzono dwukrotnie w dwóch termocyklerach celem oceny powtarzalności otrzymanych wyników.

Analiza produktów amplifikacji DNA

Produkty amplifikowane w wyniku przeprowadzonych reakcji PCR z użyciem specyficznych starterów sprawdzono na 1,5% żelu agarozowym i prowadzono elektroforezę przy 150V przez 1h w buforze TBE (pH=8). W przypadku reakcji MP PCR rozdziału dokonywano na 2% żelu agarozowym a elektroforezę prowadzono przy 120V przez 4 godziny i 45 minut. Natomiast w przypadku analizy VNTR rozdział produktów prowadzono na 1,5% żelu agarozowym przy napięciu 100V przez 4 godziny. Żele wybarwiano przez 5 min. w bromku etydy (10 mg/ml) a następnie odbarwiano przez 40 minut w dH₂O. Obraz rozdziału elektroforetycznego sfotografowano na transiluminatorze UV za pomocą Kodak Gel Logic 200 Imagine System (Eastman Kodak Company, Rochester, NY 14650, USA), wykorzystując do tego program Kodak Molecular Imaging Software, Version 4.0 (Eastman Kodak Company, Rochester, NY 14650, USA). Wszystkie doświadczenia analizy molekularnej przeprowadzono na termocyklerach Mastercycler EP gradient.

Analiza danych statystycznych

Analiza danych opierała się na podstawowych testach statystycznych tj. analiza wariancji oraz procedurze Tukey'a. Porównywano stopień wirulencji 200 izolatów bakterii *Cms* oraz wpływ

mukoidalności izolatów bakterii *Cms* na stopień porażenia każdego z liści bakłażana. Za pomocą jednoczynnikowej analizy wariancji badano związek patogeniczności izolatów bakterii *Cms* w zależności od roku ich wyizolowania oraz miejsca pochodzenia. Badano również postęp rozwoju choroby na poszczególnych liściach, odrębnie dla każdego izolatu w trzech różnych okresach oceny.

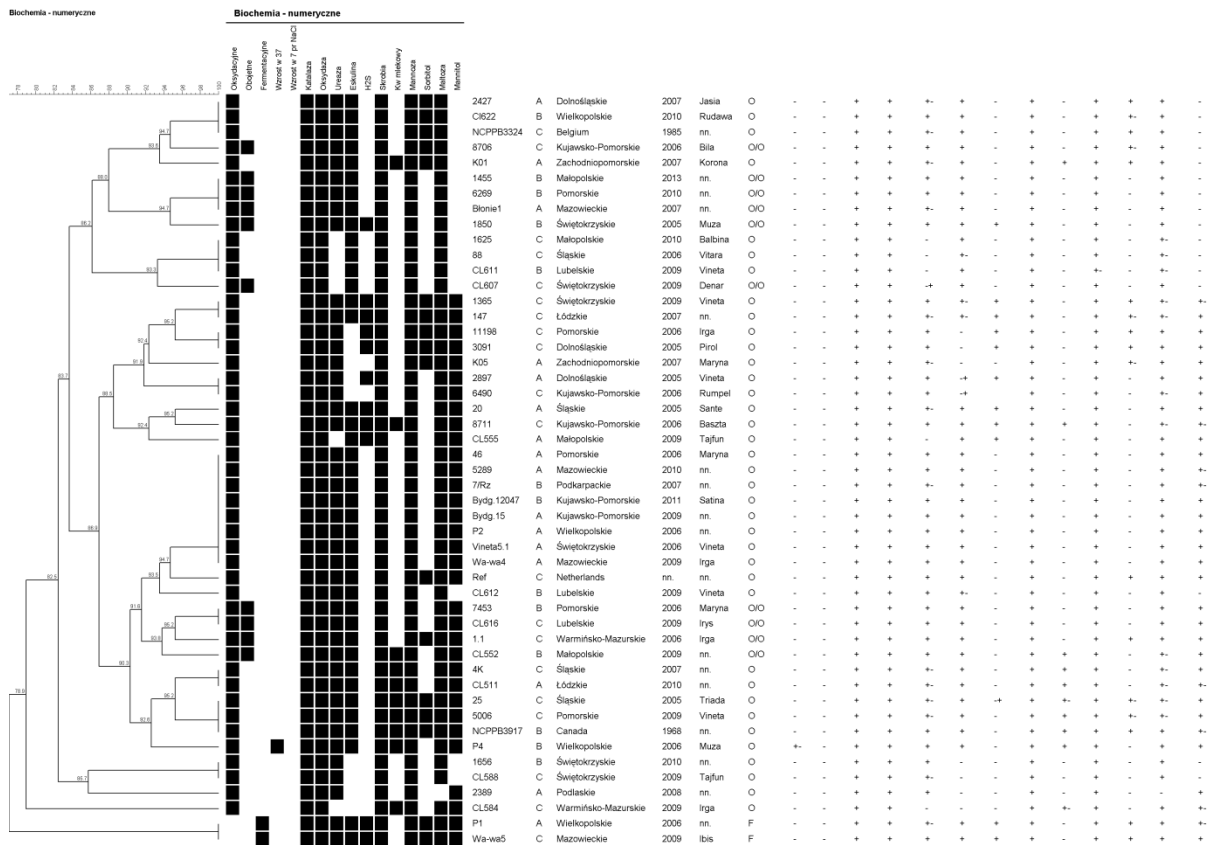
WYNIKI

Identyfikacja bakterii *Cms*

Wstępna identyfikacja fenotypowa (morfologia komórek i ich barwienie metodą Grama, morfologia kolonii na podłożu wzrostowym, mukoidalność) zakwalifikowała wszystkie 200 badanych izolatów do podgatunku *Clavibacter michiganensis* subsp. *sepedonicus*. Identyfikacja z zastosowaniem techniki PCR z użyciem starterów gatunkowo-specyficznych PSA-1 i PSA-R również dała wyniki pozytywne dla wszystkich badanych izolatów *Cms*, gdyż wszystkie one dały produkt amplifikacji 502pz, charakterystyczny fragment dla *Clavibacter michiganensis* subsp. *sepedonicus*. Charakterystyka morfologiczna na podstawie obserwacji mikroskopowych preparatów IFAS wykonanych z zastosowaniem przeciwciał poliklonalnych i monoklonalnych stwierdzono pozytywną reakcję dla 200 badanych izolatów bakterii *Cms*, gdyż wszystkie obserwowane kolonie bakteryjne morfologicznie (kształtem i wielkością) odpowiadały ogólnie przyjętej charakterystyce kolonii bakterii *Cms*.

Testy Biochemiczne

Testy biochemiczne zastosowane w badaniach własnych okazały się mało skuteczne w zróżnicowaniu bakterii z podgatunku *Cms*, gdyż nie pozwoliły na ustalenie takiej właściwości biochemicznej, która odróżniałaby od siebie izolaty tej bakterii. Wszystkie 200 izolatów *Cms* cechowało się dość zróżnicowanymi właściwościami biochemicznymi, które w żaden sposób nie korelowały z ich pochodzeniem geograficznym, mukoidalnością i zmiennością genetyczną. Wyniki analizy biochemicznej przedstawiono w systemie binarnym z wykorzystaniem Programu Bionumerix. W analizie zastosowano prosty w odczycie algorytm klasteryzacji UPGMA a do porównania użyto binarnego współczynnika korelacji Dice-a [Fot. 1].



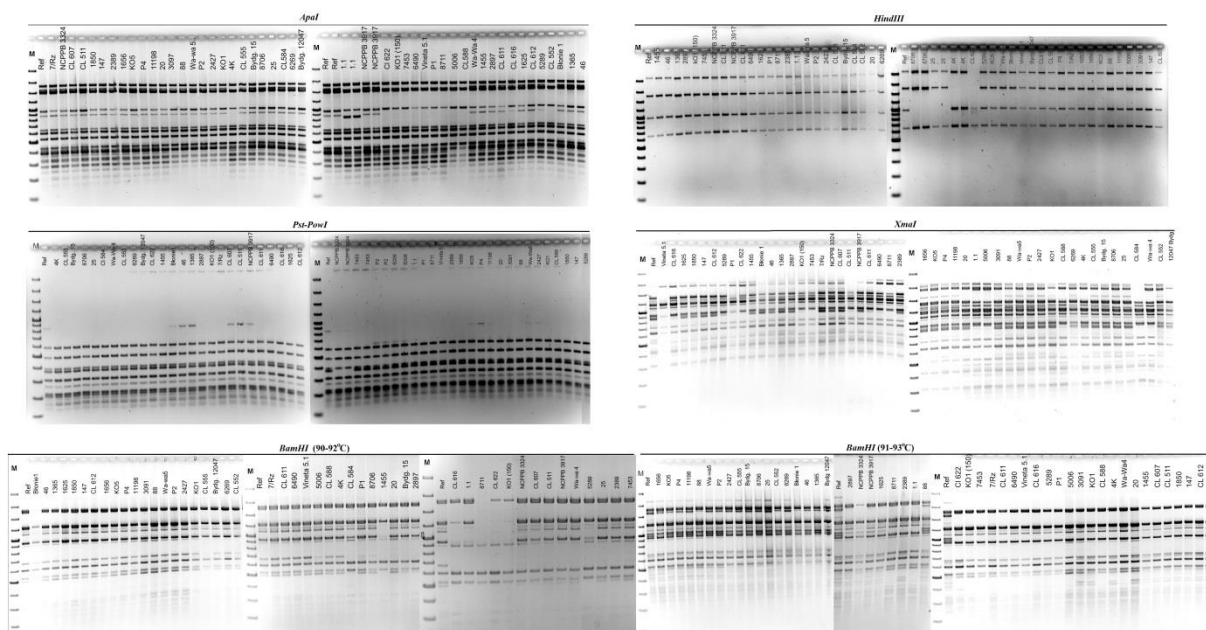
Fot. 1. Analiza binarna wyników testów biochemicznych 50 wybranych izolatów bakterii *Cms*. (Pat.-patogeniczność; A-najbardziej patogeniczne, B-średnio patogeniczne, C- najmniej patogeniczne).

Testy biologiczne (testy patogeniczności na roślinach bakłażana) prowadzone dla 200 izolatów bakterii *Cms*

Wyniki testu patogeniczności wykonanego dla 200 izolatów bakterii *Cms* ujawniły ich duże zróżnicowanie pod względem wirulencji. W teście tym jako podstawę zróżnicowania izolatów przyjęto tempo ich wzrostu *in planta* oraz produkcję czynników wirulencji indukujących więdnienie w warunkach kontrolowanych. Izolaty *Cms* istotnie różniły się pod względem nasilenia objawów chorobowych na roślinach bakłażana, co zobrazowano poprzez wykonanie oceny fotograficznej porażonych roślin dla każdego z trzech okresów oceny. Rośliny kontrolne inokulowane dH₂O pozostały bezobjawowe.

Genetyczny polimorfizm 50 izolatów *Cms* ujawniony przez PCR MP oraz VNTR

Analizę badanej grupy 50 izolatów bakterii *Cms* wykonano techniką PCR MP oddzielnie dla 5 enzymów restrykcyjnych, z czego dla enzymu *Bam*H1 analizę wykonano dla dwóch gradientów temperatur denaturacji (90-92°C i 91-93 °C) [Fot. 2, Załącznik 1].



Fot. 2. Profil elektroforetyczny produktów PCR uzyskanych metodą PCR MP dla 50 izolatów *Clavibacter michiganensis* subsp. *sepedonicus*. M-marker wielkości Gene Ruler 100 DNA Ladder Plus (Thermo Scientific), Ref- szczep referencyjny (BPRIOR 527).

Dla każdego enzymu sporządzono także dendrogram przedstawiający genetyczne podobieństwo izolatów *Cms*.

W przypadku zastosowania w reakcji PCR MP enzymu *ApaI* stwierdzono niewielkie zróżnicowanie wśród 50 izolatów *Cms*. Izolaty pogrupowały się w 4 grupy o różnych profilach elektroforetycznych składających się z powyżej 11-14 fragmentów DNA o długości od 170 do 1290 pz. Najniższy stopień podobieństwa między czterema powstałymi grupami dla tego enzymu wynosił 95,3%.

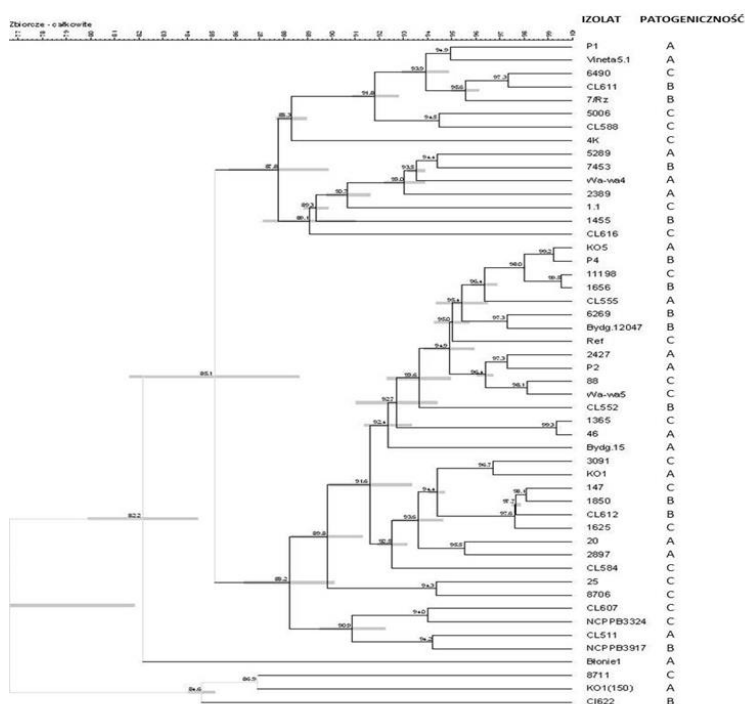
W przypadku enzymu *HindIII* użytego w reakcji PCR MP zaobserwowano największą konserwatywność otrzymanego wzoru elektroforetycznego spośród wszystkich zastosowanych enzymów. Stopień zróżnicowania wśród badanej grupy 50 izolatów *Cms* był niski a podobieństwo szacowało się na poziomie 95%. W tym przypadku można było wyróżnić 4 grupy szczepów *Cms*, gdyż typowanie takie pozwoliło wyodrębnić 4 różne wzory elektroforetyczne, składające się z 2-4 fragmentów DNA o długości od 650 do 1450 pz.

W przypadku enzymu *PstI* użytego w reakcji PCR MP obserwowano również małe zróżnicowanie wśród 50 izolatów *Cms*. Izolaty pogrupowały się w 4 grupy o różnych profilach elektroforetycznych składających się z powyżej 12 fragmentów DNA o długości od 120 do 850 pz. Większość badanych izolatów wykazało podobieństwo na poziomie 94,1%. Przy zastosowaniu enzymu *XmaI* do przeprowadzenia PCR MP stwierdzono duże zróżnicowanie wśród 50 badanych izolatów *Cms*. Izolaty pogrupowały się w 26 klasterów o różnych profilach elektroforetycznych, co obrazuje poniższy dendrogram. Najniższy stopień

podobieństwa między powstałymi grupami wynosił 83%. Pasma elektroforetyczne każdej z powstałych grup zawierały od 13 do 25 fragmentów DNA o długości od 310 do 1310 pz.

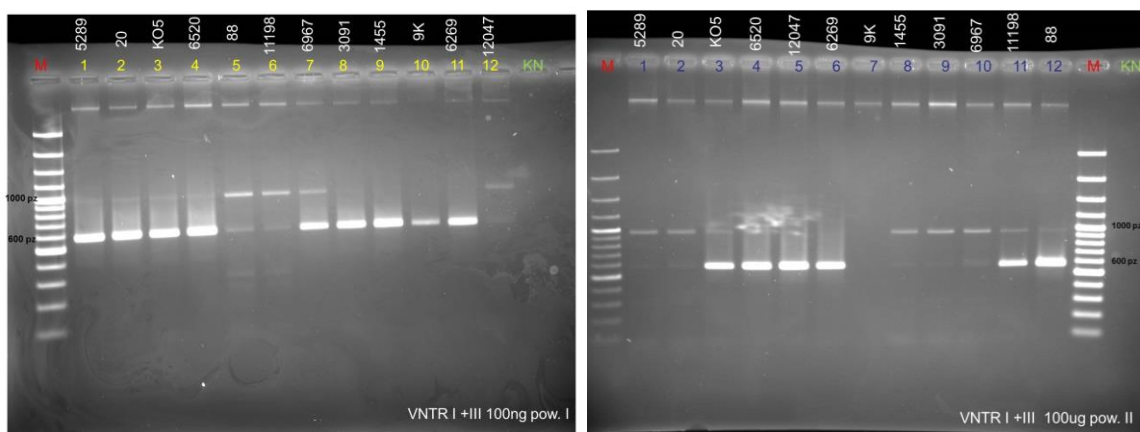
Dla enzymu *Bam*HI w reakcji PCR MP użyto dwóch różnych temperatur denaturacji (90°C-92°C i 91°C-93°C), które wykazały wyraźne różnice wśród profili elektroforetycznych dla każdego z zestawianych zestawów temperatur. Każda z temperatur kreowała inną liczbę otrzymanych klasterów. W przypadku enzymu *Bam*HI, gdzie zastosowano temperaturę denaturacji z przedziału 90°C-92°C otrzymano 8 klasterów różnicujących składających się 3-9 produktów DNA o długości od 500 do 1270 pz, natomiast dla enzymu *Bma*H1 gdzie zastosowano temperaturę z przedziału 91°C-93°C otrzymano 12 grup o różnych profilach elektroforetycznych w skład których wchodziło 6-19 fragmentów DNA o długości od 400 do 1290 pz.

Procent podobieństwa pomiędzy izolatami *Cms* zobrazowany poprzez zbiorcze drzewo filogenetyczne służące jako narzędzie do badań epidemiologicznych a nie filogenetycznych był bardzo wysoki i wynosi 90% nawet po zastosowaniu do różnicowania 5 różnych enzymów, jednakże zastosowanie pojedynczego enzymu *Xma*I pozwalało na różnicowanie izolatów z uzyskaniem podobieństwa na poziomie 83%. Najniższy stopień podobieństwa między wyodrębnionymi grupami wynosił 82,2% [Fot. 3].



MP: pozwoliły na opracowanie schematu diagnostycznego we wszystkich zastosowanych wariantach PCR MP, który pozwolił w sposób wydajny zróżnicować bakterie *Cms* na poziomie pojedynczego izolatu, czego nigdy wcześniej nie opisano w odniesieniu do bakterii z podgatunku *Clavibacter michiganensis* subsp. *sepedonicus*.

W obecnej pracy uzyskano mniej zadowalające rezultaty w odniesieniu do analizy VNTR od której odstąpiono w różnicowaniu pozostałej grupy izolatów *Cms* z racji ograniczeń związanych z relatywnie niską powtarzalnością wyników. Podczas elektroforezy w żelu agarozowym obserwowano duże i łatwo zauważalne różnice w wielkości pomiędzy allelami wybranych markerów VNTR, jednakże występował brak powtarzalności VNTR w ocenie zmienności izolatów *Cms* który mógł wynikać z niewystarczająco zoptymalizowanych warunków amplifikacji lub tak wysokiej wrażliwości reakcji na drobne zmiany warunków, że uniemożliwiającej osiągnięcie, w praktyce, powtarzalności prowadzonych reakcji [Fot. 4].



Fot. 4 Przykładowy elektroforegram markera VNTRI i VNTRIII w żelu agarozowym. M- wzorzec wielkości DNA GeneRuler 100 pz DNA Ladder Plus, ścieżki 1-12 izolaty bakterii *Cms*, KN- kontrola negatywna.

WNIOSKI

- Testy patogeniczności na roślinach bakłazana wykazały statystycznie istotne zróżnicowanie wirulencji izolatów bakterii *Clavibacter michiganensis* subsp. *sepedonicus*.
- Zaprojektowane testy PCR MP pozwoliły wykazać genetyczne różnice pomiędzy 50 izolatami bakterii *Cms* zarówno z tego samego jak i odległych regionów geograficznych.
- Metoda PCR MP pozwala w sposób jednoznaczny identyfikować i genetycznie różnicować izolaty wewnątrz podgatunku *Clavibacter michiganensis* subsp. *sepedonicus*. Z uwagi na dużą siłę dyskryminacji metoda ta powinna być stosowana w molekularnym typowaniu izolatów bakterii *Cms*.

- Nie wykazano korelacji pomiędzy cechami biochemicznymi, genetycznymi a stopniem patogeniczności izolatów bakterii *Cms* w stosunku do roślin bakłażana.

LITERATURA

- Baribeau B. (1948). Bacterial ring rot of potatoes. *American Potato Journal*; 25: 71 - 82.
- Ciampi L., Sequeira L., & French E. R. (1981). *Pseudomonas solanacearum*. Distribution in potato plants and the establishment of latent infections. In C. Lozano (Ed.). *Proceedings of the 5th International Conference on Plant Pathogenic Bacteria Cali, Colombia*; Centro Internacional de Agricultura Tropical: 148 – 161
- Davis M. J., Gillaspie A. G., Jr., Vidaver A. K., Harris R. W. (1984). *Clavibacter*: a new genus containing some phytopathogenic coryneform bacteria, including *Clavibacter xyli* subsp. *xyli* sp. nov., subsp. nov. and *Clavibacter xyli* subsp. *cynodontis* subsp. nov., pathogens that cause ratoon stunting disease of sugarcane and Bermudagrass stunting disease. *Int. J. Syst. Bacteriol.*; 34: 107 - 117.
- 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. Dz. Urz. UE Nr L 182 z dnia 4 lipca 2006 r.
- Elphinstone J. G. (2004). Central Science Laboratory, Sand Hutton, York, YO41 1LZ. Bacterial ring rot of potato (*Clavibacter michiganensis* subsp. *sepedonicus*). BPC Report: Bacterial ring rot of potato – the facts; 46 p
- Jorstad I. (1932). Berating om planteskdemmer i land-og-hage bruket VII. Sopp-og. Bakteriesykdommer pa potater. Landbruksdirektorens beretning. Tillegg, C: - 63.
- Massart S., Nagy C., Haissam J. M. (2014). Development of the simultaneous detection of *Ralstonia solanacearum* race 3 and *Clavibacter michiganensis* subsp. *sepedonicus* in potato tubers by a multiplex real-time PCR assay. *Eur J Plant Pathol.*; 138: 29 - 37.
- Nolte P. (2005). Recognized and managing bacterial ring rot. Idaho Potato Conference on January 19.
- Olsson K. (1976). Experience of ring rot caused by *Corynebacterium sepedonicum* (Spieck. et Kotth.) Skapt. et Burkh. in Sweden. Particularly detection of the disease in its latent form. EPPO Bulletin [Olsson, K. : Experience of brown rot caused by *Pseudomonas solanacearum* (Smith) Smith in Sweden.]; 6 (4): 209 - 219
- Rich A. E. (1983). *Potato disease* Academic press; 238 p.
- Smith J. M., Mc Namara D. G., Scott P R., Holderness M., Burger B. (1997). *Clavibacter michiganensis* subsp. *sepedonicus*. In: *Quarantine Pests for Europe*, CAB International (ed.), Univ. Press, Cambridge, UK: 986 - 990.
- Stead D., Janse J. D. (2000). Protocol for the diagnosis of quarantine organism *Clavibacter michiganensis* subsp. *sepedonicus*.

Xiang Li, James Tambong, Kat (Xiaoli) Yuan, Wen Chen, Huimin Xu, C. Andre Levesque and Solke H. De Boer (2018). Re-classification of *Clavibacter michiganensis* subspecies on the basis of whole-genome and multi-locus sequence analyses. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*; 68: 234 – 240

Zielke R., and Numann K. (1984). The influence of the medium and the duration of cultivation upon the reliability of the diagnosis of *Corynebacterium sepedonicum* (Spieck. Et Kotth.) Skapt. et Burkh., the casual agent of the bacterial ring rot of potato. (In German; English summary, p. 195) *Zbl. Mikrobiol.*; 139: 195 - 211.