

TERESA PASTUSZEWSKA¹**IWONA JUNOSZA KISIELEWSKA**¹**WERONIKA GRZECH**²**SEBASTIAN BRZozowski**²¹ Pracownia Chorób i Szkodników Kwarantannowych Ziemniaka
Instytut Hodowli i Aklimatyzacji Roślin, Oddział w Bydgoszczy² Katedra Fitopatologii

Akademia Techniczno-Rolnicza, Bydgoszcz

Rozwój bakteriozy pierścieniowej ziemniaka w rozmnożeniach wegetatywnych roślin

Development of bacterial ring rot infection in potato plants reproduction

W doświadczeniu polowym, w Pracowni Chorób i Szkodników Kwarantannowych Ziemniaka, w latach 2001–2003 śledzono rozwój objawów bakteriozy pierścieniowej ziemniaka w bulwach potomnych 8 prób (w próbie od 90–180 bulw) różnych odmian ziemniaka, w których stwierdzono metodą immunofluorescencyjną porażenie latentne. W pierwszym roku doświadczenia pierwsze symptomy choroby na liściach zaobserwowano w 8 tygodniu od wysadzenia u ok. 6% roślin ziemniaka (nr 27, 40, 170 i 187), pod koniec lipca liczba ich wzrosła do 80%. W następnych latach typowych objawów dla tej choroby na roślinach nie obserwowano. Każdego roku dwukrotnie oceniano bulwy potomne w poszukiwaniu widocznych objawów, zewnętrznych i wewnętrznych, na ich przekroju. Obserwacje te wykonywano zaraz po zbiorze oraz po przechowaniu na wiosnę. Bulwy wykazywały objawy od 0% (nr 63) do 21,6% (nr 170) — od ich braku, poprzez szkliste do kremowożółtych stref w wiązce przewodzącej w okolicy przystolonowej, potem żółtych do jasnobrązowych, aż do całkowitego zniszczenia wiązek naczyniowych i wycieku, przy ucisku bulw, śluzu bakteryjnego wraz ze zmacerowanymi tkankami bulwy.

Słowa kluczowe: bakterioza pierścieniowa ziemniaka, bulwy, porażenie latentne, metoda immunofluorescencyjna, objawy, rośliny

The development of bacterial ring rot symptoms in 8 samples of progeny tubers (90–180 tubers per sample), in which latent infection was detected by immunofluorescence methods, was examined in a field experiment in 2001–2003. First bacterial ring rot symptoms on leaves appeared in the 8th week after tubers planting in samples 27, 40, 170 and 187 (6% of leaves infested). They consisted of wilting of lower leaves, overcolouring and rolling of leaves margins inwards. Progeny tubers were examined twice a year, in autumn and in spring. Internal tuber symptoms ranged from glassy to cream — yellow zones along the vascular tissue near the stolon. In later stages of the disease yellowish rings were observed. Maximum percentage (21.6%) of tubers with visible symptoms was found in a sample no. 170.

Key words: bacterial ring rot, latent infection, immunofluorescence method, plants, tubers, symptoms

WSTĘP

Sprawcą groźnej choroby kwarantannowej ziemniaka — bakteriozy pierścieniowej jest gramododatnia bakteria *Clavibacter michiganensis* subsp. *sepedonicus* (Cms). Choroba jest trudna do wykrycia ze względu na jej cechy epidemiologiczne takie jak: wewnętrzne przemieszczanie się bakterii wiązkami naczyniowymi, bardzo powolny rozwój objawów na roślinie i ich maskowanie przez zgnilizny wywoływane przez towarzyszące mikroorganizmy oraz często bezobjawową postać choroby (Dykstra, 1941, 1942; Slack, 1987). Dopóki nie wystąpią wyraźne objawy choroby jest ona trudna do wykrycia na plantacji jak i w przechowalni czy kopcach.

Na częściach nadziemnych roślin ziemniaka objawy chorobowe ujawniają się późno, zwykle po kwitnieniu lub nawet pod koniec wegetacji. Mogą również wcale nie wystąpić. Z tego powodu choroba może być mylona z innymi, na przykład z zarazą ziemniaka (*Phytophthora infestans*), wędnięciem (*Verticillium albo-atrum*), czy też z objawami starzenia się rośliny. Pierwsze objawy choroby pojawiają się na niżej położonych liściach, wokół łodygi bądź z jej jednej strony. Brzegi liści zwijają się łyżeczkowato, bledną, więdną, usychają i zwisają. Liście i łodygi zmieniają barwę na matowojasnozieloną, szarzieloną, czasem są cętkowane, żółte, w końcu brunatnieją i obumierają. Wędnięcie postępuje od dołu ku górze łodygi. Mogą być zaatakowane liście z jednej strony łodygi lub listki z jednej strony liścia. Nasilenie objawów zależy od warunków środowiskowych, stężenia bakterii w tkance, a także odmiany ziemniaka. Przy utrzymującej się suszy i temperaturach w granicach 21–23°C (optimum temperatury wzrostu dla Cms) choroba rozwija się szybciej, natomiast nadmiar wilgoci hamuje jej rozwój.

Objawom występującym na częściach nadziemnych roślin towarzyszą objawy zewnętrzne i wewnętrzne na bulwach. Porażenie młodych bulw następuje poprzez stolony. Wczesne objawy infekcji uwiadcniają się na przekroju bulw w części przystolonowej, w postaci różnej długości, szklistych do kremowożółtych przebarwień wiązek przewodzącej. W stadium zaawansowanym choroby przebarwienie wiązek przewodzącej może być koloru jasnobrązowego i może obejmować cały jej obwód. Przy ściśnięciu bulwy, w miejscu przebiegu wiązki następuje jej rozwarstwienie, równocześnie można obserwować wyciek kremowego, serowatego i bezwonnego śluzu bakteryjnego zawierającego również zmacerowane tkanki rdzenia bulwy. W zaawansowanym stadium choroby można zauważyć objawy zewnętrzne w okolicy oczek — jasnoczerwone lub brunatne plamy oraz gwiazdkowate pęknięcia skórki. Bulwy z takimi objawami są podatne na wtórną infekcję bakteriami mokrej zgnilizny (*Erwinia carotovora* subsp. *atroseptica*), która może maskować objawy bakteriozy pierścieniowej.

Małe populacje sprawcy choroby zasiedlające tkankę roślin ziemniaka mogą nie wywoływać żadnych objawów, a wówczas choroba przebiega w postaci bezobjawowej, zwanej również latentną (Dykstra, 1941, 1942), a u tolerancyjnych odmian mogą wywoływać tylko niespecyficzne objawy, podobne do tych, jakie wywołują inne patogeny, czy też trudne do odróżnienia od objawów fizjologicznego starzenia się roślin. Porażenie latentne jest szczególnie niebezpieczne, ponieważ może nie powodować żadnych objawów na roślinach i bulwach nawet przez kilka rozmnożeń wegetatywnych roślin (De Boer

i McNaughton, 1986; Slack, 1987; De Boer i in., 1992b; Manzer i in., 1987) przyczyniając się do rozprzestrzeniania choroby.

W Polsce bakteria *C. michiganensis* subsp. *sepedonicus* zaliczana jest do szczególnie groźnych organizmów szkodliwych, objętych przepisami kwarantannowymi, nakazującymi przymusowe zwalczanie, z przyjęciem tolerancji zerowej. Obecnie brak jest dostępnej metody bezpośredniego chemicznego czy biologicznego zwalczania (EPPO/CABI, 1997). Wyhodowano kilka tolerancyjnych, o pewnej odporności, odmian takich jak: Furore, Merrimack, Saranac, Teton, Wolhthman (Bonde i in., 1942, 1947; Riedl i in., 1946; Lansade, 1950; Akeley i in., 1955). Odmiany te po inokulacji ulegały tylko lekkiemu porażeniu, ze względu jednak na nie dość dobre inne cechy użytkowe nie zostały szerzej wykorzystane w uprawie. Kriel i inni (1995) stwierdzili odporność na *C. michiganensis* subsp. *sepedonicus* u 9 tetraploidalnych dzikich gatunków *Solanum*.

Jak dotąd najważniejszym sposobem zwalczania i zapobieżenia rozprzestrzenianiu się choroby jest produkcja zdrowego materiału nasiennego i hodowlanego. Jest to możliwe tylko przez systemowe testowanie i kwalifikację tych materiałów, by wyeliminować z nich zainfekowane bulwy. Aby skutecznie usuwać bulwy porażone latentnie, niezbędne stało się opracowanie odpowiednio czułych, specyficznych i sprawnych metod laboratoryjnych. W sprawie wykrywania i diagnozowania bakteriozy pierścieniowej ziemniaka Dyrektywa UE i Procedura Kwarantanna EPPO (Dyrektywa EEC 93/85; Anonim, 1990) zalecają w pierwszym etapie wizualną ocenę 200 bulw z 25-tonowej partii. Następnie przeprowadzenie ekstrakcji bakterii z tkanki bulw i wykrywanie patogena metodą pośredniej immunofluorescencji (IFAS). Dla potwierdzenia wyniku pozytywnego w IFAS zaleca się wykonanie testu oberzynowego, tj. zainokulowanie roślin *Solanum melongena* w celu selektywnego rozmnożenia bakterii, a następnie izolację na podłoże mikrobiologiczne i ponowne przeprowadzenie testu IFAS. Specyficzność testu IFAS ograniczają reakcje krzyżowe stosowanych przeciwciał poliklonalnych, które w dużym stopniu można zredukować używając w kolejnym etapie przeciwciał monoklonalnych (Calzolari i in., 1982; Crowley i De Boer, 1982; De Boer i Wieczorek, 1984; De Boer i Mc Naughton, 1986). Duże trudności w diagnostyce przy wykorzystaniu IFAS stwarzają próby zawierające niskie koncentracje komórek bakteryjnych *Cms*. W ostatnich latach coraz szersze zastosowanie w diagnostyce bakterii mają metody molekularne (w tym technika PCR) jako odznaczające się wyższą czułością detekcji. Technika PCR została również wykorzystana przez szereg autorów do wykrywania bakterii *C. michiganensis* subsp. *sepedonicus* jako dodatkowa metoda weryfikująca niejednoznaczne czasami wyniki uzyskane w teście IFAS (Schneider i in., 1993; Firrao i Lozzi, 1994; Pastuszewska, 1999; Pastrik i Rainey, 1999).

Celem badań było śledzenie przez okres trzech lat rozwoju latentnej postaci bakteriozy pierścieniowej w trzech kolejnych rozmnożeniach wegetatywnych roślin ziemniaka. Chcieliśmy dowiedzieć się po upływie, jakiego czasu z bulw porażonych latentnie przez *C. michiganensis* subsp. *sepedonicus*, wyrosną bulwy potomne z widocznymi objawami chorobowymi.

MATERIAŁ I METODY

Materiał roślinny

Materiałem wyjściowym było 8 prób ziemniaków różnych odmian i różnego pochodzenia (w próbie od 90 do 180 bulw), z których 3 pozyskano z badań masowych Inspekcji Ochrony Roślin oraz 5 z badań własnych. Pierwsza grupa, to pięć prób o nr: 27, 40, 170, 186 i 187, ze stwierdzoną testem pośredniej immunofluorescencji (IFAS) latentną postacią bakteriozy pierścieniowej. W próbach nr 27 i 40 stwierdzono ok. 10^7 komórek bakterii w 1 ml osadu (10^7 cfu/ml osadu), w próbach 170, 186 i 187 — ok. 10^6 cfu/ml osadu.

Drugą grupę stanowiły trzy próby o nr: 33, 46 i 63, które na podstawie testu IFAS były podejrzane o porażenie chorobą. Stwierdzono w nich poniżej 10^3 cfu/ml osadu, czyli poniżej progu wykrywalności tej metody.

Miejsce przeprowadzenia badań

Doświadczenie przeprowadzono w Pracowni Chorób i Szkodników Kwarantannowych Ziemniaka latach 2001–2003 na polu doświadczalnym na terenie IHAR w Bydgoszczy. W 2001 roku wysadzano z każdej próby wszystkie bulwy, jakimi dysponowano: z nr 170 i 187 po 90 bulw, z nr 33 i 63 po 135 bulw oraz z nr 27, 40, 186 i 46 po 180 bulw. W latach następnych z każdej próby wysadzano po 100 bulw pobranych losowo.

Przeprowadzone zabiegi pielęgnacyjne

Chwasty usuwano ręcznie, zastosowano insektycyd przeciwko stonce ziemniaczanej. Bulwy przechowywano przez okres zimy w ziemnej piwnicy, w której utrzymywała się temperatura ok. 4–5°C.

Przeprowadzone obserwacje

W czasie wegetacji prowadzono obserwacje roślin. Z tych, na których zaobserwowano objawy w postaci jednostronnych wędnięć na niżej położonych liściach, zwijających się łyżeczkowato brzegów liści i przebarwień, pobierano próbki tkanki i wykonywano preparaty mikroskopowe według metody IFAS dla potwierdzenia występowania sprawcy choroby.

Po zbiorze, w obrębie każdej próby, wszystkie zebrane bulwy potomne oceniano pod względem występowania objawów zewnętrznych i wewnętrznych. W tym celu wszystkie bulwy przecinano i obserwowano wiązki przewodzące, określając procent bulw z typowymi objawami. Bulwy porażone i gnijące po uparowaniu odrzucano, pozostałe bez objawów przechowywano do wiosny następnego roku. Wiosną ponownie przeprowadzono obserwacje objawów chorobowych, liczono bulwy z objawami. Wybierano do sadzenia bulwy bez widocznych objawów chorobowych, pozostałe parowano i wyrzucano.

Sposób wykrywania i identyfikacji *C. michiganensis* subsp. *sepedonicus* w próbach roślin ziemniaka według metody pośredniej immunofluorescencji (IFAS)

Ekstrakcja bakterii *Cms* z bulw i łodyg roślin

Próbę bulw (90–200 bulw) myto pod bieżącą wodą i wysuszono. Przy pomocy jałowego skalpela obierano skórkę z części przystolonowej i pobierano stożkowate wycinki z tkanki przewodzącej. W przypadku prób roślin, łodygi (ok. 10 cm części przyziemnej) cięto

jałowym skalpelem na krótkie odcinki. Wszystkie wycinki bulw bądź odcinki łodyg umieszczano w jednorazowym pojemniku, zalewano buforem do maceracji PB 0,05M, pH 7,0 (Na_2HPO_4 , KH_2PO_4 , H_2O) i wytrząsano na wytrząsarce poziomej przez 4 godz., przy obrotach 130 obr./min. Następnie roztwór przenoszono do probówki wirówkowej, wirowano w wirówce z chłodzeniem (4°C) 10 minut przy obrotach 10 000 obr./min. Supernatant odrzucano, a osad zawieszano w buforze PB 0,01 M, pH 7,2 (NaH_2PO_4 , NaH_2PO_4 , H_2O). Tak przygotowane próby analizowano według testu IFAS.

Wykonanie preparatów według testu IFAS

Przygotowano seryjne dziesięciokrotne rozcieńczenia ($10\times$, $100\times$, $1000\times$) w buforze PB 0,01 M, pH 7,2 (j.w). Kolejne rozcieńczenia osadu nanoszono na okienka wielopunktowego szkiełka mikroskopowego. Na oddzielnym szkiełku mikroskopowym przygotowano kontrolę pozytywną nanosząc zawiesinę kultury *Cms* BPR IOR nr 527 (w stężeniu 10^6 komórek /ml). Powietrznie wysuszone preparaty utrwalano 95% alkoholem etylowym. W pierwszym etapie reakcji nanoszono swoiste kozie przeciwciała poliklonalne i po 30 min. inkubacji w wilgotnej komorze sflukiwano i moczo (2 $\times$ 5 min.) w buforze PBS 0,01 M. PH 7,2 (Na_2HPO_4 , NaH_2PO_4 , NaCl , H_2O). W drugim etapie nanoszono koniugat przeciwciał króliczych z FITC oraz sflukiwano i moczo jak poprzednio. Obydwa przeciwciała zakupiono w Loeve. Do preparatu dodawano bufor fosforanowy z glicerolem (Na_2HPO_4 , NaH_2PO_4 , glicerol, H_2O) i przykrywano szkiełkiem nakrywkowym. Preparaty przeglądano w mikroskopie fluorescencyjnym Zeiss Jenalumar, przy powiększeniu 650 razy. W preparatach z badanych prób, w co najmniej 10 losowo wybranych polach widzenia, poszukiwano morfologicznie typowych, fluoryzujących komórek bakteryjnych (porównując je z kontrolą pozytywną) i przeliczano je na mililitr nierozcieńczonego osadu. Próg wykrywalności dla metody IFAS równa się 10^3 – 10^4 komórek na mililitr nierozcieńczonego osadu. Mniej niż 1 komórka fluoryzująca w polu widzenia mikroskopu (< 1 IFU/ pole widzenia mikroskopu) odpowiada populacji bakterii mniejszej niż 10^3 cfu/ml osadu.

WYNIKI

W czasie wegetacji typowe objawy na roślinach zaobserwowano tylko w pierwszym roku doświadczenia. Sprzyjały temu korzystne warunki pogodowe — małe opady i średnia temperatura. Objawy ujawniły się już po upływie ok. 8 tygodni na poletkach z próbami nr 27, 40, 170 i 187. Na około 6% roślin obserwowano jednostronne wędnięcia niżej położonych liści, zwijające się łyżeczkowato brzegi liści i ich przebarwienia. Wykonane z podejrzanych roślin preparaty mikroskopowe według metody IFAS, we wszystkich pobranych roślinach potwierdziły występowanie bakterii *Clavibacter michiganensis* subsp. *sepedonicus*. Z czasem liście stawały się żółte, potem brunatne i obumierały. Pod koniec lipca roślin z wyraźnymi objawami choroby na poletkach w próbach 27 i 40 było ok. 80%, natomiast w próbach nr 170, 186 i 187 ok. 50%.

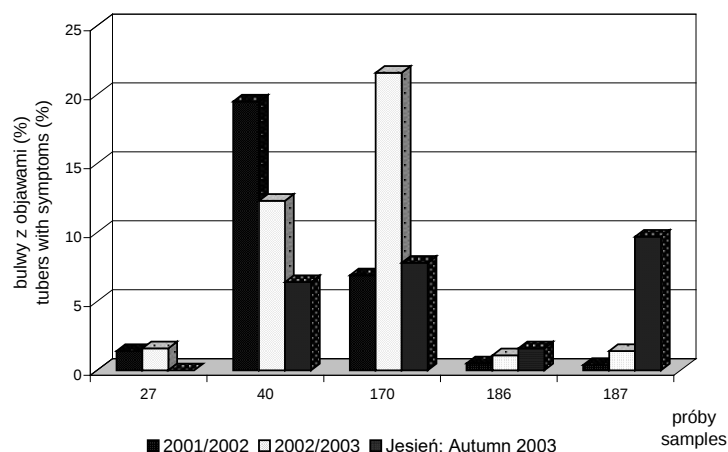
Zakres porażenia bulw potomnych z pierwszego rozmnożenia (tab. 1) był następujący: w potomstwie pierwszej grupy prób porażonych latentnie bakteriozą pierścieniową

ziemniaka (nr: 27, 40, 170, 186, 187), po zbiorze wahał się od 0%–0,9% (odpowiednio w nr 186 i 40), po przechowaniu w potomstwie nr 40 wzrósł do 19,5% (rys. 1).

Tabela 1

Porażenie bulw potomnych bakteriozą pierścieniową w latach 2001–2002
Infestation of potato progeny tubers by bacterial ring rot (2001–2002)

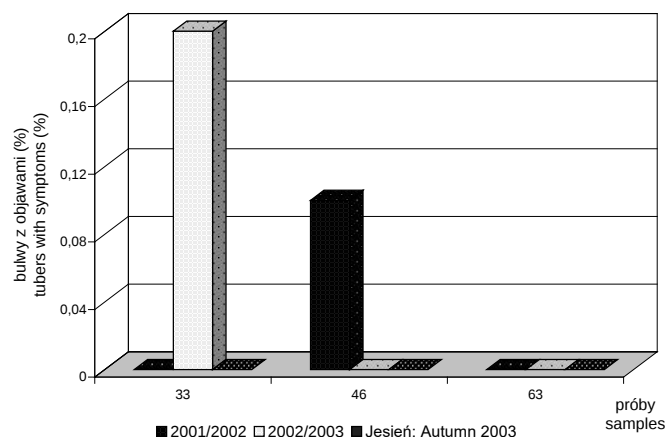
Numer próby Sample	Liczba bulw potomnych ogółem Number of progeny tubers	Bulwy z objawami Tubers with visible symptoms						Bulwy gnijące% Decayed tubers
		jesień 2001 autumn	%	wiosna 2002 spring	%	razem j + w total a + s	%	
27	2200	8	0,4	22	1,0	30	1,4	1,9
40	1100	10	0,9	205	18,6	215	19,5	7,7
170	550	1	0,2	37	6,7	38	6,9	11,3
186	1600	0	0,0	8	0,5	8	0,5	3,4
187	700	2	0,3	1	0,1	3	0,4	6,7
33	1600	0	0,0	0	0,0	0	0,0	4,1
46	2166	2	0,1	0	0,0	2	0,1	0,9
63	1650	0	0,0	0	0,0	0	0,0	2,0



Rys. 1. Porażenie bulw potomnych pochodzących z bulw porażonych latentnie bakteriozą pierścieniową ziemniaka (2001–2003)

Fig. 1. Infestation of tubers produced by potato plants grown from tubers with proved latent infection with ring rot (2001–2003)

W potomstwie drugiej grupy prób podejrzanych o porażenie latentne (nr: 33, 46, 63) zakres porażenia po zbiorze i po przechowaniu przez 6 miesięcy nie zmienił się i wyniósł od 0%–0,1%. W potomstwie z próby nr 46 znaleziono po zbiorze 2 bulwy z objawami (0,3%) (rys. 2).



Rys. 2. Porażenie bulw potomnych pochodzących z bulw podejrzanych o porażenie latentne bakteriozą pierścieniową ziemniaka (2001–2003)

Fig. 2. Infestation of tubers produced by potato plants grown from tubers with probable latent infection with ring rot (2001–2003)

Zakres porażenia bulw potomnych drugiego rozmnożenia (tab. 2) był następujący: w pierwszej grupie po zbiorze wahał się od 0 do 0,3% (bulwy z objawami znaleziono tylko w nr 170), a wiosną po okresie przechowywania wzrósł do 1,1%–21,3%.

Tabela 2

Porażenie bulw potomnych bakteriozą pierścieniową w latach 2002–2003
Infestation of potato progeny tubers by bacterial ring rot (2002–2003)

Numer próby Sample	Liczba bulw potomnych ogółem Number of progeny tubers	Bulwy z objawami Tubers with visible symptoms						Bulwy gnijące% Decayed tubers
		jесień 2002 autumn	%	wiosna 2003 spring	%	razem j +w total a + s	%	
27	747	0	0,0	12	1,6	12	1,6	15,8
40	578	0	0,0	71	12,3	71	12,3	23,4
170	352	1	0,3	75	21,3	76	21,6	26,4
186	645	0	0,0	7	1,1	7	1,1	22,5
187	710	0	0,0	10	1,4	10	1,4	11,1
33	833	1	0,1	1	0,1	2	0,2	15,6
46	1011	0	0,0	0	0,0	0	0,0	1,1
63	522	0	0,0	0	0,0	0	0,0	3,1

Najwięcej bulw z objawami stwierdzono w próbie nr 170 (21,6%) i nr 40 (12,3%). W próbach tych zanotowano również najwyższy procent bulw gnijących, odpowiednio 26,3% i 23,4%.

W potomstwie drugiej grupy tylko w jednej próbie nr 33 znaleziono po zbiorze i po przechowaniu po 1 bulwie z objawami.

Zakres porażenia bulw potomnych trzeciego rozmnożenia (tab. 3) kształtował się dla pierwszej grupy pomiędzy 0% a 9,7%. Żadnej porażonej bulwy nie znaleziono w nr 27, najwięcej w nr 187.

Tabela 3

Porażenie bulw potomnych bakteriozą pierścieniową — jesień 2003
Infestation of potato progeny tubers by bacterial ring rot — autumn 2003

Numer próby Sample	Liczba bulw potomnych ogółem Number of progeny tubers	Bulwy z objawami Tubers with visible symptoms		Bulwy gnijące % Decayed tubers
		liczba number	%	
27	747	0	0,0	1,7
40	360	23	6,4	21,4
170	574	45	7,8	24,6
186	555	9	1,6	15,7
187	538	4	9,7	11,9
33	690	0	0,0	7,2
46	933	0	0,0	0,1
63	822	0	0,0	0,5

Tabela 4

Zróznicowanie reakcji bulw różnych genotypów ziemniaka na bakteriozę pierścieniową ziemniaka w latach 2001–2003

Differentiation of tuber reaction to ring rot in potato genotypes studied in 2001–2003

Nr próby Sample	Liczba bulw potomnych Number of progeny tubers	Bulwy z objawami Tubers with visible symptoms		Bulwy gnijące % Decayed tubers
		suma sum	%	
27	3694	42	1,1	4,6
40	2038	309	15,2	14,4
170	1476	159	10,8	20,0
186	2800	24	0,9	10,0
187	1948	17	0,9	9,7
33	3123	2	0,1	7,9
46	4110	2	0,04	0,8
63	2994	0	0,0	0,02

W roku 2003 zakończono trzyletnie obserwacje rozwoju infekcji. Zbiorcze wyniki za ten okres przedstawiono w tabeli 4. Zakres porażenia bulw potomnych, jaki zanotowano za okres trzech lat badań był następujący:

- w pierwszej grupie pochodzących z prób porażonych latentnie (nr: 27, 40, 170, 186, 187) wahał się w granicach od 0,9% (nr 186 i 187) do 15,2% (nr 40),
- w bulwach potomnych wszystkich prób porażonych latentnie bulwy z objawami choroby znaleziono już w pierwszym rozmnożeniu,
- -najwięcej bulw z objawami wykryto w potomstwie z próby nr 40, odpowiednio w roku 2001/2002 w pierwszym rozmnożeniu zanotowano ich najwięcej — 19,5%; w 2002/2003 — 12,3%; jesienią 2003 — 6,4%, średnio za okres trzech lat obserwacji — 15,2% (tab. 1, 2, 3, 4),

- w potomstwie z drugiego rozmnożenia próby nr 170, w ciągu trzyletnich obserwacji zarejestrowano najwyższy z wszystkich prób procent bulw z objawami (21,6%) i gnijących (26,4%) (tab. 2),
- w drugiej grupie prób podejrzanych o porażenie (nr 33, 46 i 63) w pierwszym roku tylko w próbie nr 46 znaleziono bulwy z objawami (tab. 1), w drugim w próbie nr 33 (tab. 2). Natomiast w próbie nr 63 w ciągu trzech lat obserwacji nie stwierdzono żadnej bulwy z objawami (tab. 1, 2, 3).

DYSKUSJA

Bakterie *Clavibacter michiganensis* subsp. *sepedonicus* w niskim stężeniu w łodydze czy bulwach mogą w ogóle nie wywoływać żadnych objawów chorobowych w łodydze czy bulwach. Pojawienie się objawów na roślinach na plantacji jest zmienne, nie zawsze zauważalne, a jeżeli wystąpi to jest obserwowane pod koniec wegetacji, w okresie starzenia się roślin. Nasilenie objawów jest uzależnione od warunków otoczenia, stężenia bakterii wewnątrz rośliny, również odmiany ziemniaka, a objawy mogą być maskowane przez objawy fizjologicznego starzenia się roślin, a także obecność innych patogenów (De Boer, Naughton, 1986; Bishop i Slack, 1987; De Boer i in., 1992). Niewiele jeszcze wiadomo, z jaką częstotliwością pojawiają się infekcje latentne. Przypuszcza się, że na wielkość populacji bakterii mają wpływ warunki naturalne na plantacjach (De Boer i Mc Naughton, 1986; Kawchuk i in., 1998). De Boer i Mc Cann (1990) w próbach, w których testem IFAS wykrywali liczną populację bakterii *C. m.* subsp. *sepedonicus*, stwierdzali tylko 9% bulw z objawami. Porażenia latentne mogą być niewykrywalne przez okres kilku lat uprawy (Manzer i in., 1987). Sztucznie infekowane bulwy traktowane w jednakowy sposób mogą zachowywać się różnie (Westra i Slack, 1994; Kawchuk i in., 1998; Nelson i in., 1992; De Boer i in., 1992 a; Pastuszewska, 1999). W jednym roku, na wyrastających z zainfekowanych bulw roślinach występują objawy zarówno na liściach jak i bulwach, w innym tylko na liściach lub tylko na bulwach. Kawchuk i wsp. (1998) zaobserwowali to zjawisko w ciągu wieloletnich badań — zakres objawów infekcji na liściach był bardzo zróżnicowany, od braku jakichkolwiek objawów aż do całkowitej nekrotyzacji liści. Na bulwach było podobnie, obserwowano bulwy bez żadnych objawów choroby, bulwy z porażeniem części lub całej wiązki przewodzącej, ale również bulwy, które miały całkowicie rozmiękczone miąższ. Autorzy ci uzyskali pozytywną korelację ($P < 0,01$) pomiędzy objawami na liściach i bulwach w kilku pierwszych latach eksperymentu. Później obserwowali obniżenie ekspresji objawów na bulwach aż do całkowitego ich zaniku, co tłumaczą wpływem dodatkowych zmiennych. Mogła to spowodować, jak przypuszczają, akumulacja antagonistycznych mikroorganizmów w glebie. Gamard i De Boer (1995) wyizolowali wiele różnych bakterii z bulw ziemniaka i otaczającej rizosfery. Nelson i Semeniuk (1964) zauważyli zmiany w izolacie bakterii *Corynebacterium insidiosum* (McCulloch) pozyskanym z pola. Nadal prowadzone są badania w tym kierunku w celu wyjaśnienia przyczyn zanikania objawów bakteriozy pierścieniowej w bulwach.

WNIOSKI

1. Duże znaczenie dla wystąpienia objawów bakteriozy pierścieniowej na roślinach w czasie wegetacji oraz w bulwach miały czynniki środowiska (sprzyjająca pogoda) i poziom stężenia bakterii w tkance.
2. W potomstwie roślin z prób porażonych latentnie, bulwy z objawami znaleziono już w pierwszym rozmnożeniu.
3. W potomstwie z prób nr 186 i 187 wzrastał w kolejnych rozmnożeniach procent bulw z objawami; w nr 27 i 170 wzrastał do drugiego rozmnożenia, następnie obniżył się. Natomiast w potomstwie nr 40 najwięcej bulw porażonych stwierdzono w pierwszym roku, w kolejnych latach procent ich spadał.
4. Procent bulw z objawami wzrastał po okresie przechowywania.
5. Z bulw silniej porażonych uzyskiwano mniej bulw potomnych, wyższy był procent bulw gnijących (od 9,7%–14,4%).
6. W potomstwie z prób podejrzanych o porażenie (nr 33, 46 i 63) bakteriozą pierścieniową bulwy z objawami znaleziono w pierwszym roku w potomstwie nr 46, w drugim w nr 33. Natomiast w potomstwie nr 63 do trzeciego rozmnożenia nie natrafiono na bulwy z objawami.
7. Stadia latentne bakteriozy pierścieniowej ziemniaka mogą być niewykrywalne w ciągu kilku lat uprawy ziemniaka (próbie nr 63 w ciągu trzech lat obserwacji nie stwierdzono żadnej bulwy z objawami).

LITERATURA

- Akeley R. V., Stevenson F. J., Blood P. T., Schultz E. S., Bonde R., Nielsen K. F. 1955. Merrimack. A new variety of potato resistant to late blight and ring rot and adapted to New Hampshire. *Am. Potato J.* 32: 93.
- Anonim. 1990. Quarantine procedure. *Clavibacter michiganensis* ssp. *sepedonicus*. Inspection and test methods. *Bulletin OEPP/EPP Bulletin* 20: 235 — 254.
- Bonde R., Stevenson F. J., Clark C. F., Akeley R. V. 1942. Resistance of certain potato varieties and seedling progenies to ring rot. *Phytopathology* 32: 813 — 819.
- Bishop A. L., S. A. Slack, 1987. Effect of cultivar, inoculum dose and strain of *Clavibacter michiganensis* subsp. *sepedonicus* on symptom development in potatoes. *Phytopathology* 77: 1085 — 1089.
- Bonde R., Stevenson F. J., Akeley R. V. 1947. Breeding potatoes for resistance to ring rot. *Phytopathology* 37: 539 — 555.
- Calzolari A., Bazzi C., Mazucchi U. 1982. Cross reactions between *Corynebacterium sepedonicum* and *Arthobacter polychromogenes* in immunofluorescence staining. *Potato Research* 25: 239 — 246.
- Crowley C. F., De Boer S. H., 1982. Non-pathogenic bacteria associated with potato stems cross-react with *Corynebacterium sepedonicum* antisera in immunofluorescence. *Am. Potato J.* 59: 1 — 8.
- De Boer S. H., Wiecek A. 1984. Production of monoclonal antibodies of *Corynebacterium sepedonicum*. *Phytopathology* 74: 1431 — 1433.
- De Boer S. H., McNaughton M. E. 1986. Evaluation of immunofluorescence with monoclonal antibodies for detecting latent bacterial ring rot infections. *Am. Potato J.* 63: 533 — 542.
- De Boer S. H., Mc Cann M. 1990. Detection of *Corynebacterium sepedonicum* in potato cultivars with different propensities to express ring rot symptoms. *Am. Potato J.* 67: 85 — 694.
- De Boer S. H., Janse J. D., Stead D. E., Van Vaerenbergh J., Mc Kenzie A. R., 1992a. Detection of *Clavibacter michiganensis* subsp. *sepedonicus* in potato stems and tubers grown from seed pieces with various levels of inoculum. *Potato Research* 35: 202 — 216.

- De Boer S. H., Van Vaerenbergh J., Stead D. E., Janse J. D., Mc Kenzie A. R. 1992b. A comparative study in five laboratories on detection of *Clavibacter michiganensis* subsp. *sepedonicus* in potato stems and tubers. *Potato Research* 35: 217 — 226.
- Dykstra T. P. 1941. Results of experiments in control of bacterial ring rot of potatoes in 1940. *Am. Potato J.* 18: 27 — 55.
- Dykstra T. P. 1942. Compilation of results in control of bacterial ring rot in 1941. *Am. Potato J.* 19: 175 — 196.
- Dyrektywa EEC Nr 93/85. *Official Journal L* 259.18.10.1993.
- EPPO/CABI. 1997. Quarantine Pests for Europe. Second edition: 986 — 990.
- Firrao G. R., R. Lozzi. 1994. Identification of *Clavibacter michiganensis* subsp. *sepedonicus* using polymerase chain reaction. *Can. J. Microbiol.* 40: 148 — 151.
- Gamard P., De Boer S.H. 1995. Evaluation of antagonistic bacteria for suppression of bacterial ring rot of potato. *Eur. J. Plant Pathology*. 101: 519 — 525.
- Kawchuk L. M., Lynch D. R., Kozub G. C., Nelson G. A., F. Kulcsar, Fujimoto D. K. 1998. Multi-year evaluation of *Clavibacter michiganensis* subsp. *sepedonicus* disease symptoms in cultivated potato genotypes. *Am. J. of Potato Research* 75: 235 — 243.
- Kriel C. J., Jansky S. H., Gudmestad N. C., Ronis D. H. 1995. Immunity to *Clavibacter michiganensis* subsp. *sepedonicus*: Screening of exotic *Solanum* species. *Euphytica* 82: 125 — 132.
- Lansade M. 1950. Recherches sur le flétrissement bacterien de la pomme de terre en France *Corynebacterium sepedonicum* (S. et K.) Skapt. et Burkh. *Ann. Epiphyt.* 2: 69 — 156.
- Manzer F. E., Gudmestad N. C., Nelson G. A. 1987. Factors affecting infection, disease development and symptom expression of bacterial ring rot. *Am. Potato J.* 64: 641 — 676.
- Nelson G. A., Lynch D. R., Kozub G. C. 1992. Ring rot symptom development on potato cultivars and lines in southern Alberta. *Potato Res.* 35: 133 — 142.
- Nelson G.A., Semeniuk G. 1964. An antagonistic variant of *Corynebacterium insidiosum* and some properties of the inhibitor. *Phytopathology* 54: 330 — 335.
- Pastrik K.H., Rainey F.A. 1999. Identification and differentiation of *Clavibacter michiganensis* subsp. *sepedonicus* by polymerase chain reaction — based techniques. *J. Phytopathology* 147: 687 — 693.
- Pastuszewska T. 1999. Badania nad sposobami wykrywania i eliminacji *Clavibacter michiganensis* subsp. *sepedonicus* w roślinach ziemniaka. Praca doktorska wykonana w Instytucie Hodowli i Aklimatyzacji Roślin w Bydgoszczy.
- Riedl W. A., Stevenson F. J., Bonde R. 1946. The Teton potato, a new variety resistant to ring rot. *Am. Potato J.* 23: 379 — 309.
- Schneider B. J., Zhao J. L., Orser C. D. 1993. Detection of *Clavibacter michiganensis* subsp. *sepedonicus* by DNA amplification. *FEMS Microbiol. Lett.* 109: 207 — 212.
- Secor G. A., De Buhr L., Gudmestad N. C. 1987. Chemical sanitation for bacterial ring rot control. *Am. Potato J.* 64: 699 — 698.
- Slack S. A. 1987. Biology and ecology of *Corynebacterium sepedonicum*. *Am. Potato J.* 64: 665 — 669.
- Westra A. A. G., Slack S. A., Drennan J.L. 1994. Comparison of some diagnostic assays for bacterial ring rot of potato: A case study. *Am. Potato J.* 9: 557 — 565.