

TERESA PASTUSZEWSKA**GRZEGORZ GRYŃ**

Pracownia Chorób i Szkodników Kwarantannowych Ziemiaka

Zakład Technologii Produkcji Roślin Okopowych

Instytut Hodowli i Aklimatyzacji Roślin — PIB, Oddział w Bydgoszczy

Aktywność celulolityczna a wirulencja *Clavibacter michiganensis* subsp. *sepedonicus*

Cellulolytic activity and virulence of *Clavibacter michiganensis* subsp. *sepedonicus*

Celem przeprowadzonych badań było określenie dla puli 34 szczepów *Clavibacter michiganensis* subsp. *sepedonicus* (*Cms*) właściwości celulolitycznych oraz patogeniczności w stosunku do bakłażana (*Solanum melongena*). We wszystkich badanych szczepach *Cms* potwierdzono wytwarzanie enzymu celulazy. Wraz ze wzrostem aktywności enzymu celulazy obserwowano wzrost wirulencji bakterii *Cms*, wyrażonej stopniem pokrycia liści bakłażana objawami chorobowymi. Korelacja liniowa między tymi cechami wyniosła $R = 0,75$.

Słowa kluczowe: bakterioza pierścieniowa ziemniaka, celulaza, *Clavibacter michiganensis* subsp. *sepedonicus*, czynnik wirulencji

The aim of this study was to determine the cellulolytic activity and virulence on eggplant (*Solanum melongena*) of pool of 34 strains of *Clavibacter michiganensis* subsp. *sepedonicus* (*Cms*). It was demonstrated that all of *Cms* isolates and strains produced enzyme cellulase. Increased enzyme activity caused higher virulence, expressed as intensity of symptoms on eggplant. Linear correlation between these traits was $R = 0.75$.

Key words: cellulase, *Clavibacter michiganensis* subsp. *sepedonicus*, potato ring rot, virulence factor

WSTĘP

Jednym z bakteryjnych patogenów roślin, jest podgatunek *Clavibacter michiganensis* subsp. *sepedonicus* (*Cms*). Komórki *Cms* są pleorformicznymi, maczugowatymi gramdodatnimi pałeczkami. W preparatach mikroskopowych obserwuje się ich charakterystyczne popodziałowe układy przypominające litery 'V' lub 'L' lub pismo chińskie czy palisady. Niekiedy w preparatach z naturalnie zakażonych tkanek lub świeżo wyizolowanych kultur występują formy kuliste komórek, które na pożywce agarowej ponownie przybierają formę krótkich pałeczek (Slack, 1987). Do cech charakterystycznych

należy powolny wzrost na podłożach mikrobiologicznych oraz obecność w ścianie komórkowej kwasu 2,4-diaminomasłowego (Waleron i in., 2010). Naturalną rośliną żywicielską, na której rozwijają się wyraźne objawy chorobowe jest ziemniak (*Solanum tuberosum*) (CABI/EPPO, 1997). Bugbee i Gudmestad (1988) podają jako naturalną, bezobjawową roślinę żywicielską burak cukrowy (*Beta vulgaris*). Poprzez sztuczną inokulację mogą ulec porażeniu inne gatunki psiankowatych, jak pomidor czy bakłażan. Podgatunek bakterii *Cms*, będący sprawcą bakteriozy pierścieniowej – choroby groźnej dla upraw ziemniaka, jest objęty w krajach członkowskich UE kwarantanną i zwalczany z urzędu.

Głównym źródłem rozprzestrzeniania patogena są porażone sadzeniaki, w których po wysadzeniu bakterie rozmnażają się i poprzez system wiązek przewodzących przemieszczają do łodyg i ogonków liściowych oraz tworzących się bulw. We wczesnych stadiach choroby na łodygach ziemniaka może pojawić się wędnięcie brzegów listków, a w późniejszym okresie pomiędzy nerwami rozwijają się plamy chlorotyczne, potem nekrozy i następuje usychanie liści (De Boer i Slack, 1984). Wczesne objawy choroby w bulwach mogą być obserwowane w części przystolonowej. Tkanka przewodząca począwszy od stolonu staje się szklista lub przejrzysta, później objawy te rozszerzają się na cały pierścień naczyń. Po ściśnięciu bulwy z wiązek przewodzących wydziela się serowaty, kremowo-biały wyciek bakteryjny. W zaawansowanym stadium porażenia na powierzchni bulw można obserwować spękania. Sprawca choroby może zasiedlać rośliny ziemniaka i bulwy nie wywołując objawów i pozostawać niewykrytym przez kilka rozmnożeń wegetatywnych (Sletten, 1985; Kawchuk i in., 1998; Pastuszewska i Junosza Kisielewska, 2002, 2004; Pastuszewska, 2008).

Wystąpienie objawów choroby jest uzależnione od odmiany ziemniaka, koncentracji patogena w roślinie, jego wirulencji oraz czynników środowiska. Mechanizm odpowiedzialny za wywoływanie objawów choroby na roślinach jest sprawą dyskusyjną i nadal badaną. W roślinach ziemniaka komórki *Cms*, występują głównie we wiązkach przewodzących. Dogodne warunki rozwoju w ksylemie ziemniaka bakterie *Cms* zapewniają sobie przez wydzielanie różnych związków, decydujących o stopniu patogeniczności — wirulencji. W procesie chorobowym wywołanym przez *Cms* najważniejszą rolę odgrywają: zewnątrzkomórkowo wydzielane przez *Cms* enzymy celulolityczne — celulazy, białka indukujące odpowiedź nadwrażliwości (Nissinen i in., 2001; Van der Wolf i in., 2005), a także egzopolisacharydy (EPS). Te ostatnie pełnią wiele istotnych funkcji, między innymi zabezpieczają komórki *Cms* przed nadmierną utratą wody, umożliwiają im adhezję do powierzchni tkanek gospodarza, istotną podczas zakażenia i rozwoju choroby (Jahr i in., 1999). EPS są mieszaniną heterogennych polimerów o charakterze kwasowym, rzadziej obojętnym, wśród których znajdują się głównie fukoza, galaktoza, glukoza i mannoza (Westra i Slack, 1992; Jahr i in., 1999; Lomovatskaya i in., 2002). Nadmierna ilość wydzielanych EPS w postaci śluzów, może zaburzyć transport wody, ale nie zawsze koreluje ze stopniem wirulencji. Szczepy *Cms* powodujące odpowiedź nadwrażliwości na roślinach tytoniu, wywołują również symptomy bakteriozy pierścieniowej na ziemniaku. Infekcja rośliny, nie będącej typowym gospodarzem, powoduje indukcję reakcji odpornościowej, za sprawą mechanizmu

kodującego specyficzne białka. Odpowiedzią rośliny jest wystąpienie na powierzchni liści nekrotycznych zmian, ograniczających infekcję i rozwój choroby.

Najważniejszymi czynnikami, odpowiedzialnymi za wirulencję bakterii *Cms*, są wydzielane zewnątrzkomórkowo enzymy, z których celulazy odgrywają najbardziej znaczącą rolę. Baer i Gudmestad (1995) opisali produkcję celulazy przez bakterie *Cms* oraz określili optymalne warunki jej aktywności (temperatura 37°C i pH 6–7). W wyniku działania enzymu następuje niszczenie szkieletu celulozowego ściany komórkowej rośliny, bariery ochronnej przed atakami patogenów, co prowadzi do zakłócenia transportu wody i wędnięcia porażonych roślin (Lagaert i in., 2009) oraz zgnilizny tkanki otaczającej wiązki przewodzące (Baer i Gudmestad, 1993). Obok celulaz *Cms* produkuje enzymy pektynolityczne i amylolityczne, jednak ich rola w rozwoju choroby jest uważana za mniejszą (Laine i in., 2000, Holtsmark, 2001).

Celem badań było określenie aktywności celulolitycznej wybranych szczepów *Clavibacter michiganensis* subsp. *sepedonicus* (*Cms*) oraz jej wpływ na wirulencję w stosunku do roślin bakłażana (*Solanum melongena*).

MATERIAŁ I METODY

Do badań wykorzystano 34 szczepy *Clavibacter michiganensis* subsp. *sepedonicus*, w tabeli 1 zamieszczono ich wykaz. W tej puli, 25 stanowiły naturalne izolaty otrzymane z IHAR PIB Radzików dla potrzeb realizacji wspólnych badań w Programie Wieloletnim 2008-2013. Izolaty te zostały wyosobnione z ekstraktów bulw ziemniaka, porażonych przez *Cms*, pozyskanych z laboratoriów Państwowej Inspekcji Ochrony Roślin i Nasiennictwa. Pozostałe 9 szczepów (polskie i zagraniczne) wybrano z kolekcji szczepów bakteryjnych, zgromadzonej w Pracowni Chorób i Szkodników Kwarantannowych IHAR PIB w Bydgoszczy. W badaniach używano sześciodniowych kultur bakterii wyrosłych na pożywce YGM (De Boer i Copeman, 1980) w temperaturze 21°C.

Aktywność enzymów celulolitycznych została określona w teście płytkowym, z wykorzystaniem podłoża zawierających celulozę. Testy wykonano w 3 terminach, po 3 powtórzenia dla każdego szczepu *Cms*. Przygotowano zawiesiny szczepów *Cms* w sterylnej wodzie o koncentracji (10^7 jtk/ml), ustalonej za pomocą densytometru. Następnie 5 μ l zawiesiny bakterii posiano na zmodyfikowaną pożywkę M9 (pH 7,0), wzbogaconą w sól sodową karboksymetylocelulozy, będącą rozpuszczalną postacią celulozy (Meletzus i in., 1993). Po 10 dniach inkubacji w temperaturze 21°C zmierzono średnicę kolonii bakterii, a następnie wybarwiono płytki 0,1% roztworem czerwieni Kongo, dla obserwacji stref świadczących o występowaniu i aktywności enzymów powodujących hydrolizę celulozy. Po 15. minutowym czasie barwienia, płytki odbarwiano 1M roztworem NaCl. Aktywność enzymów określono na podstawie pomiaru promienia powstałej strefy zhydrolizowanego składnika pożywki. Obecność wokół kolonii bakteryjnej niezabarwionego 'halo', świadczyła o uwolnieniu enzymu hydrolitycznego, a wielkość promienia informowała o ilości wydzielanego enzymu.

Wirulencję szczepów *Cms* określono na podstawie testów bakłażanowych (*Solanum melongena*) przeprowadzonych w 4 terminach. Badania wykonano na 6 roślinach dla

każdego szczepu *Cms* w każdym z terminów, łącznie na 24 roślinach. W tym celu siewki bakłazana (odmiana Black Beauty) w stadium trzeciego liścia, inokulowano, przy pomocy strzykawki zawiesinami *Cms*, o gęstości 10^7 jtk/ml. Do eksperymentu dołączono kontrolę negatywną (sterylny bufor PB) i pozytywną (szczep wzorcowy NCPPB 4053). Zakażone siewki inkubowano w 21°C, przy 14. godzinnym oświetleniu, przez 25–40 dni. Obserwacje rozpoczęto po siedmiu dniach i kontynuowano co tydzień, określając stopień porażenia i wędnięcia według opracowanej skali (dane nie zamieszczone) oraz powierzchnię blaszek liściowych z charakterystycznymi objawami, wyrażoną w procentach.

Różnice w wielkości strefy hydrolizy celulozy i stopień pokrycia liści zmianami chorobowymi pozwoliły na ocenę zróżnicowania szczepów według zdolności wywoływania objawów bakteriozy pierścieniowej ziemniaka.

Do określenia zależności pomiędzy wirulencją szczepów *Cms* wyrażoną powierzchnią (w %) liści bakłazana objętych objawami choroby a zdolnością tych szczepów do produkcji celulazy, zastosowano analizę korelacji Spearmana. Do analiz statystycznych użyto programu Statistica 7.1.

WYNIKI I DYSKUSJA

W badaniach użyto 34 szczepy *Cms*, z czego 25 wyizolowano z ekstraktów porażonej bulwy ziemniaka, pochodzących z 12 województw Polski, a 9 szczepów z kolekcji przechowywanej w laboratorium IHAR-PIB, Oddział w Bydgoszczy. Różnice fenotypowe wybranych szczepów pozwoliły na obserwację mechanizmów powodujących objawy chorobowe na roślinie bakłazana oraz strefę hydrolizy celulozy w teście płytkowym. Średnie promienie niezabarwionych stref, wokół kolonii bakteryjnych wynosiły od 1,06 do 6,92 mm, w tym dla naturalnych izolatów z grupy 1 a od 1,50 do 6,92 mm, natomiast dla szczepów grupy 1 b od 1,06 do 5,83 mm (tab. 1, rys. 1).

Tabela 1

Charakterystyka szczepów bakterii *Clavibacter michiganensis* subsp. *sepedonicus* użytych w badaniach Characteristics of bacterial strains of *Clavibacter michiganensis* subsp. *sepedonicus* used in this study

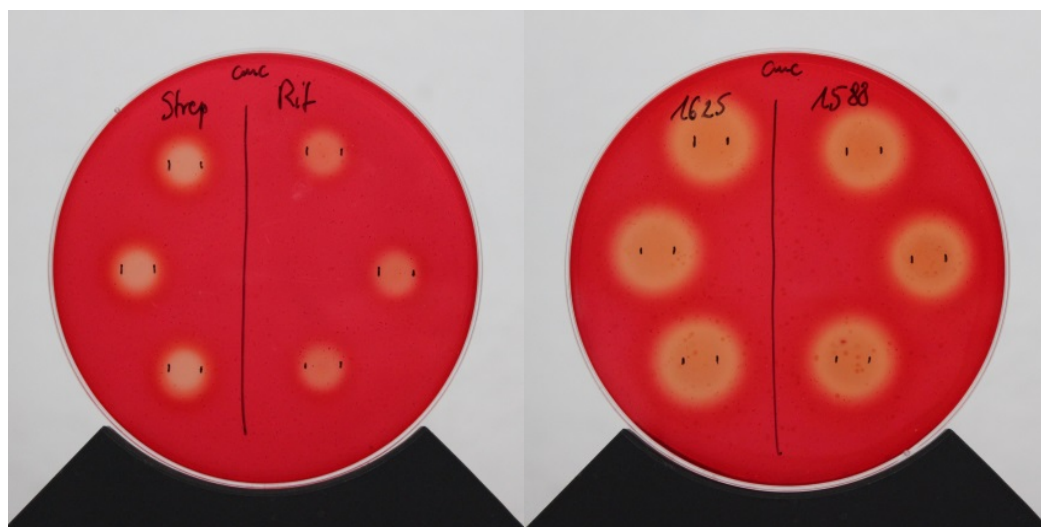
Szczep Strain	Strefa hydrolizy karboksymetylocelulozy na pożywce (mm), średnia Region of carboxymethylcellulose hydrolysis of media (mm), mean	Powierzchnia objawów na liściach bakłazana (%), średnia ² Symptoms area on eggplant leaves (%), mean
1	2	3
CL 585 (warmińsko-mazurskie) ^{1a}	1,50±0,44 ^x	0,00±0,00 ^x
CL 581 (warmińsko-mazurskie) ^{1a}	1,70±0,45	1,10±0,28
6967 (pomorskie) ^{1a}	1,75±0,51	0,00±0,00
CL 616 (lubelskie) ^{1a}	1,80±0,58	1,70±1,06
5006 (pomorskie) ^{1a}	1,80±0,66	4,40±3,50
CL 583 (warmińsko-mazurskie) ^{1a}	1,83±0,34	1,50±1,50
3535 (śląskie) ^{1a}	2,20±0,26	51,30±24,28
3127 (lubuskie) ^{1a}	2,30±0,00	26,70±9,50
287 (pomorskie) ^{1a}	2,40±0,10	23,20±6,04
6269 (pomorskie) ^{1a}	3,17±0,06	44,00±10,78
4 (mazowieckie) ^{1a}	3,20±0,00	55,20±2,88

1	2	3
3692 (śląskie) ^{1a}	3,27±0,25	71,30±0,20
CL 589 (podkarpackie) ^{1a}	3,58±1,11	34,50±9,70
5289 (mazowieckie) ^{1a}	3,77±0,25	69,00±14,64
4553 (mazowieckie) ^{1a}	4,23±0,45	46,70±5,06
CL 599 (podkarpackie) ^{1a}	4,28±0,49	40,50±18,26
1965 (opolskie) ^{1a}	4,30±0,30	46,80±25,70
1656 (świętokrzyskie) ^{1a}	4,53±0,50	50,50±19,39
7636 (pomorskie) ^{1a}	4,60±0,40	64,70±15,90
CL 613 (lubelskie) ^{1a}	5,00±1,18	22,80±10,22
CL 620 (wielkopolskie) ^{1a}	5,00±1,24	35,10±15,60
1588 (małopolskie) ^{1a}	5,40±0,53	58,90±24,38
CL 597 (kujawsko-pomorskie) ^{1a}	5,48±0,64	30,90±26,32
1625 (małopolskie) ^{1a}	6,17±0,15	60,00±5,00
CL 607 (świętokrzyskie) ^{1a}	6,92±0,71	29,70±8,96
NCPPB 3898 (Rif.) ^{1b}	1,06±0,13	5,00±2,74
NCPPB 2140 (Strep.) ^{1b}	1,86±0,70	12,00±5,22
BPR IOR 527 ^{1b}	1,96±0,48	7,00±2,30
PD 330 ^{1b}	2,00±0,35	17,00±5,00
PD 323 ^{1b}	2,10±0,85	13,00±4,30
BPR IOR 529 ^{1b}	2,66±0,41	3,50±1,78
PD 406 ^{1b}	2,70±0,45	5,50±1,76
PD 221 ^{1b}	3,65±0,40	21,00±7,34
NCPPB 4053 ^{1b}	5,83±0,35	60,00±8,09

^{1a} Z IHAR Radzików; From IHAR Radzików; ^{1b} Z IHAR Bydgoszcz; From IHAR Bydgoszcz

² Oznacza procent pokrycia liści bakłażana objawami chorobowymi; Mean percentage of eggplant leaves with disease symptoms

^x Odchylenie standardowe; Standard deviation



Rys. 1. Aktywność celulolityczna *Clavibacter michiganensis* subsp. *sepedonicus* wyrażona strefą rozkładu celulozy w pożywce

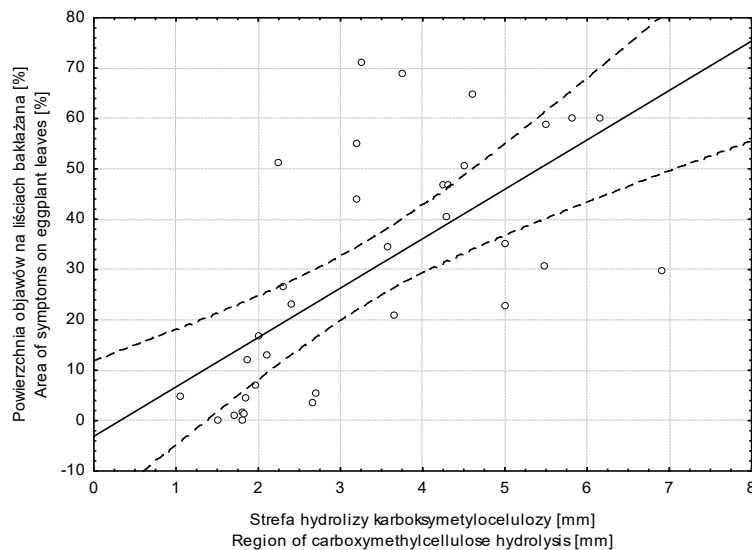
Fig. 1. Cellulase activity of *Clavibacter michiganensis* subsp. *sepedonicus* seen as areas of breakdown of cellulose on the indicator plate

Test na bakłazanie, który jest stosowany w diagnostyce *Clavibacter michiganensis* subsp. *sepedonicus* — sprawcy bakteriozy pierścieniowej ziemniaka, opisali Olsson (1976), Lelliott i Sellar (1976), Pastuszewska i Brzozowski (2006). Autorzy określili objawy więdnienia, wywoływane przez *Cms*. Objawy mogą rozpoczynać się od brzegów liści lub przestrzeni między nerwami. W fazie początkowej zwiędnięte fragmenty tkanki mogą być ciemniejsze niż tkanka otaczająca oraz są lekko błyszczące i nasączone wodą. Więdnięcie początkowo może ograniczać się do centralnej części blaszki liściowej, później rozprzestrzenia się na cały liść. W następstwie postępującego więdnienia, między nerwami tworzą się plamy chlorotyczne, z czasem nekrotyczne.

W prezentowanych badaniach powierzchnia blaszek liściowych, na której wystąpiły objawy chorobowe wyniosła od 0 do 71,3%. Objawów nie zaobserwowano na roślinach inokulowanych szczepem CL 585 (warmińsko-mazurskie) i 6967 (pomorskie). W przypadku inokulacji ośmioma szczepami *Cms* z grupy 1 a: 3535, 4, 3692, 5289, 1656, 7636, 1588, 1625 oraz jednego z grupy 1 b — NCPPB 4053, różniących się pochodzeniem, objawy choroby objęły ponad 50% powierzchni liści roślin bakłazana.

Nowe izolaty *Cms* z grupy 1 a wykazały się większą aktywnością enzymatyczną i większą patogennością wobec roślin bakłazana w stosunku do szczepów z kolekcji – grupy 1 b. Wyjaśnieniem takich wyników może być obniżenie wirulencji szczepów z grupy 1 b po długim przechowywaniu na sztucznych podłożach.

W badanej puli szczepów *Cms* wystąpiła znacząca zależność liniowa (współczynnik korelacji $R = 0,75$) pomiędzy wielkością strefy hydrolizy celulozy a powierzchnią objawów chorobowych (rys. 2).



Rys. 2. Wykres rozrzutu dla powierzchni objawów na liściach bakłazana (%) i strefy hydrolizy karboksymetylocelulozy na pożywce (mm)

Fig. 2. Dispersion plot for percentage of eggplant leaves showing symptoms and region of carboxymethylcellulose hydrolysis on indicator plate (mm)

Oznacza to, że wraz ze wzrostem strefy hydrolizy celulozy powiększał się obszar objawów na liściach bakłażana. Nie można tego odnieść do innych cytowanych w pracy wyników badań z uwagi na to, że nie prezentują one bezpośredniego porównania tych cech w takim zakresie, jaki przedstawiono w niniejszej pracy.

Jak podają Bishop i Slack (1987) ekspresja objawów bakteriozy pierścieniowej na ziemniaku w dużej mierze związana jest z warunkami środowiskowymi, dawką inokulum, odmianą i wirulencją szczepu *Cms*. Według Nissinen i in. (2001) warunkiem, by mógł nastąpić rozwój metod detekcji sprawcy bakteriozy pierścieniowej jest poznanie mechanizmów odpowiedzialnych za zjawisko choroby bezobjawowej, czyli latentnej i patogeniczność *Cms*.

W badaniach własnych podjęto próbę oceny zróżnicowania szczepów bakteryjnych pod względem produkcji enzymu celulazy jako jednego z czynników wirulencji. Z doniesień literaturowych (Baer i Gudmestad, 1993; Metzler i in., 1997; Laine i in., 2000; Nissinen i in., 2001) wynika, że enzymy takie jak: celulaza, pektynaza, amylaza są odpowiedzialne za powodowanie charakterystycznych objawów chorobowych na roślinie. Utrata zdolności wykorzystywania substancji pokarmowych pochodzenia białkowego i tłuszczowego przez *Cms* spowodowała, że bakterie te kolonizują wąską niszę ekologiczną ograniczoną do wiązek przewodzących rośliny ziemniaka (Bentley i in., 2008).

Nissinen i in. (2001) uważają, że aktywność cellulolityczna nie jest konieczna do rozprzestrzeniania się bakterii w tkance roślinnej, ale jest niezbędna do wywoływania symptomów choroby. Wyniki badań przytoczone przez Laine i in. (2000) potwierdzają plazmidowy charakter genów kodujących celulazę. Bentley i in. (2008) przeprowadzili analizę struktury genomu *Cms* i porównali do innych bakterii z gatunku *Clavibacter michiganensis*. Autorzy opisali kilka cech genomu potwierdzających endofityczny charakter *Cms*. Wyjaśnienie funkcji genu *celA* zlokalizowanego w plazmidzie pCS1 pozwoliło poznać główny czynnik wirulencji podgatunku *Cms*.

Nissinen i in. (2001) sugerują, że występowanie bakteriozy pierścieniowej w formie latentnej, powodujące trudności w diagnozie sprawcy choroby, może mieć związek z obniżeniem ekspresji genu *celA*.

Dalsze badania nad zdolnością szczepów *Cms* do wydzielania enzymów zewnątrzkomórkowych i ich patogenicznością są konieczne w celu poprawienia wykrywalności, identyfikacji i zapobiegania rozprzestrzeniania się sprawcy choroby ziemniaków. Poznanie sekwencji genomu *Cms* (AM849034) oraz jego analiza dostarcza nowych informacji o genach warunkujących biosyntezę czynników determinujących wirulencję tej bakterii (Bentley i in., 2008; Waleron i in., 2010).

WNIOSKI

1. Potwierdzono zróżnicowanie szczepów *Cms* pod względem wielkości strefy hydrolizy celulozy oraz pokrycia blaszek liściowych bakłażana objawami chorobowymi.
2. 2. Produkcja egzoenzymu celulazy, przez badane szczepy *Cms* jest istotnie dodatnio skorelowana ($R = 0,75$) z właściwościami tych szczepów do siły wywołanych objawów chorobowych na roślinach bakłażana.

LITERATURA

- Baer D., Gudmestad N. C. 1993. Serological detection of nonmucoid strains of *Clavibacter michiganensis* subsp. *sepedonicus* in potato. *Phytopathology* 83: 157 — 163.
- Baer D., Gudmestad N. C. 1995. In vitro cellulolytic activity of plant pathogen *Clavibacter michiganensis* subsp. *sepedonicus*. *Canadian J. Microbiol.* 41 (10): 877 — 888.
- Bentley S. D., Corton C., Brown S.E., Barron, A., Clark L., Doggett J., Harris, B., Ormond D., Quail M. A., May G., Francis D., Knudson D., Parkhill J., Ishimaru C. A. 2008. Genome of the actinomycete plant pathogen *Clavibacter michiganensis* subsp. *sepedonicus* suggests recent niche adaptation. *J. Bacteriol.* 190: 2150 — 2160.
- Bishop A. L., Slack S. A. 1987. Effect of inoculum dose and preparation, strain variation, and plant growth conditions on the eggplant assay for bacterial ring rot. *Am. Potato J.* 64: 227 — 234.
- Bugbee W. M., Gudmestad N. C. 1988. The recovery of *Corynebacterium sepedonicum* from sugarbeet seed. *Phytopathology* 78: 205 — 208.
- De Boer S. H., Copeman R. J. 1980. Bacterial ring rot testing with indirect fluorescent antibody staining procedure. *A. Potato J.* 57: 457 — 465.
- De Boer S. H., Slack S.A. 1984. Current status and prospects for detecting and controlling bacterial ring rot of potatoes in North America. *Plant Disease* 68: 841 — 844.
- CABI/EPPO. 1997. *Clavibacter michiganensis* subsp. *sepedonicus*: 986 — 990. In: *Quarantine Pests for Europe, 2nd Edn*, CAB International, Wallington: 1424 pp.
- Holtmark I., Takle G. W., Brurberg M. B. 2008. Expression putative virulence factors in the potato pathogen *Clavibacter michiganensis* subsp. *sepedonicus* during infection. *Arch. Microbiol.* 189: 131 — 139.
- Jahr H., Bahro R., Ahlemeyer J., Eichenlaub R. 1999. Interactoins between *Clavibacter michiganensis* and its host plants. *Environ. Microbiol.*: 113 — 118.
- 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 Res.* 75: 235 — 243.
- Lagaert S., Beliën T., Volckaert G. 2009. Plant cell walls: Protecting the barrier from degradation by microbial enzymes. *Seminars in Cell & Developmental Biology* 20: 1064 — 1073.
- Laine M. J., Haapalainen M., Wahloos T., Kankare K., Nissinen R., Kassuwi S., Metzler M.C. 2000. The cellulase encoded by the native plasmid of *Clavibacter michiganensis* ssp. *sepedonicus* plays a role in virulence and contains an expensing-like domain. *Physiological and Molecular Plant Pathology* 57: 221 — 233.
- Lelliot R. A., Sellar P. W. 1976. The detection of latent ring rot (*Corynebacterium sepedonicum* [Spiek. et Koth.] Skapt. et Burkh.). *Bulletin OEPP/EPPO Bulletin* 6 (2): 101 — 106.
- Lomovatskaya L. A., Romanenko A. S., Krivolapova N. V. 2002. Identification of potato cells plasma membrane receptors to ring rot pathogen extra cellular polysaccharides. *Academic Open Internet Journal (www.acadjournal.com.)* 7.
- Meletzus D., Bermphol A., Dreier J., Eichenlaub R. 1993. Evidence for plasmid-encoded virulence factors in the phytopathogenic bacterium *Clavibacter michiganensis* ssp. *sepedonicus* NCPPB 382. *Journal of Bacteriology* 175: 2131 — 2136.
- Metzler M. C. Laine M. J., De Boer S. H. 1997. The status of molecular biological research on the plant pathogenic genus *Clavibacter*. *FEMS Microbiology Letters* 150: 1 — 8.
- Nissinen R., Kassuwi S., Peltola R., Metzler M. C. 2001. In planta — complementation of *Clavibacter michiganensis* subsp. *sepedonicus* strains deficient in cellulose production or HR induction restores virulence. *European Journal of Plant Pathology* 107: 175 — 182.
- Olsson K. 1976. Experience of ring rot caused by *Corynebacterium sepedonicum* in Sweden, particularly detection of the disease in its latent form. *OEPP/EPPO Bulletin* 6: 209 — 219.
- Pastuszewska T. 2008. Tempo rozwoju bakteriozy pierścieniowej ziemniaka z formy bezobjawowej w objawową w potomstwie bulw ziemniaka. *Zeszyty Problemowe Postępów Nauk Rolniczych* 531: 161 — 168.

- Pastuszewska T., Junosza Kisielewska I. 2002. Podatność wybranych odmian ziemniaka na bakteriozę pierścieniową (*Clavibacter michiganensis* subsp. *sepedonicus*). Prog. Plant Protection/Post. Ochr. Roślin 42 (2): 920 — 923.
- Pastuszewska T., Junosza Kisielewska I. 2004. Reakcja wybranych odmian ziemniaka na inokulację bakterią *Clavibacter michiganensis* subsp. *sepedonicus*. Prog. Plant Protection/Post. Ochr. Roślin 4, (2): 1014 — 1016.
- Pastuszewska T., Brzozowski S. 2006. Diagnostyka latentnej formy bakteriozy pierścieniowej ziemniaka (*Clavibacter michiganensis* subsp. *sepedonicus* [Spieckermann & Kotthoff] Davies et al.). Test patogeniczności na bakłażanie (*Solanum melongena*). Biul. IHAR 242: 205 — 215.
- Slack S. A. 1987. Biology and ecology of *Corynebacterium sepedonicum*. Am. Potato J. 64: 665 — 670.
- Sletten A. 1985. The effect of *Corynebacterium sepedonicum* on symptoms and yield of four potato cultivars. Potato Research 28: 27 — 33.
- Van der Wolf J. M., Elphinstone J. G., Stead D. E., Metzler M., Müller P., Karjalainen R. 2005. Epidemiology of *Clavibacter michiganensis* subsp. *sepedonicus* in relation to control of bacterial ring rot. Plant Research International B. V. Wageningen, February 2005: 38 pp.
- Waleron M., Skrzybkowska M., Waleron K., Łojkowska E. 2010. Epidemiologia wybranych podgatunków bakterii *Clavibacter michiganensis* oraz metody ich identyfikacji i zwalczania. Post. Mikrobiol. 49 (4): 269 — 284.
- Westra A. G., Slack S. A. 1992. Isolation and characterization of extracellular polysaccharide of *Clavibacter michiganensis* subsp. *sepedonicus*. Phytopathology 82: 1193 — 1199.