

TERESA PASTUSZEWSKA
SEBASTIAN BRZOZOWSKI

Pracownia Chorób i Szkodników Kwarantannowych Ziemiaka
Instytut Hodowli i Aklimatyzacji Roślin, Oddział w Bydgoszczy

Diagnostyka latentnej formy bakteriozy pierścieniowej ziemniaka (*Clavibacter* *michiganensis* subsp. *sepedonicus* [Speckermann & Kotthoff] Davies *et al.*). Test patogeniczności na bakłażanie (*Solanum melongena* L.)

**The diagnosis of latent form of potato ring rot (*Clavibacter michiganensis* subsp. *sepedonicus*).
Pathogenicity test on eggplants (*Solanum melongena* L.)**

Obserwowano rozwój objawów bakteriozy pierścieniowej na roślinach bakłażana inokulowanych zawiesinami o zróżnicowanej liczebności komórek *Clavibacter michiganensis* subsp. *sepedonicus* (Cms) oraz oceniono przydatność testu biologicznego na bakłażanie do potwierdzania pozytywnych wyników testu immunofluorescencyjnego (IFAS). Przez cały okres trwania testu, na roślinach inokulowanych zawiesiną bakterii zawierającą od 10^1 jtk·ml⁻¹ do $4,8 \times 10^2$ jtk·ml⁻¹ (jednostki tworzące kolonie·ml⁻¹), nie zaobserwowano żadnych objawów choroby. Natomiast test IFAS potwierdził porażenie latentne roślin (tab. 1 i 2). Objawy obserwowano na roślinach inokulowanych zawiesiną bakterii Cms na i powyżej poziomu $9,1 \times 10^3$ jtk·ml⁻¹. Pierwsze objawy porażenia zaobserwowano na roślinach inokulowanych zawiesiną bakterii o najwyższym poziomie inokulum równym $9,1 \times 10^6$ jtk·ml⁻¹: po upływie 7 dni od momentu zakażenia, 4 z 10 roślin miały typowe objawy, natomiast po upływie 13 dni objawy wystąpiły na wszystkich roślinach.

Słowa kluczowe: bakłażan, bakterioza pierścieniowa ziemniaka, test biologiczny, test IFAS

The development of bacterial ring rot symptoms was observed on eggplants which were inoculated with different amounts of *Clavibacter michiganensis* subsp. *sepedonicus* (Cms) and usefulness of the bioassay in eggplant seedlings was assessed for verification of the results of indirect immunofluorescence antibody staining (IFAS). Plants infected with the suspensions of bacterial cells which contained from 10 colony forming units (cfu)·ml⁻¹ to 4.8×10^2 cfu·ml⁻¹ not show any disease symptoms for over 40 days. In all cases the IFAS-test confirmed the latent infection (Table 1 and 2). The symptoms were observed on plants infected with the Cms suspension in the concentration above 9.1×10^3 cfu·ml⁻¹. The first symptoms were observed 7 days after inoculation, on 4 from 10 plants

inoculated with the highest concentration inoculum (9.1×10^6 cfu·ml⁻¹): however 13 days later the symptoms were visible on all eggplants.

Key words: bacterial ring rot of potato, bioassay, eggplant, IFAS-test

WSTĘP

Bakteria *Clavibacter michiganensis* subsp. *sepedonicus* (Spieckermann & Kotthoff) Davies *et al* (Cms) jest sprawcą jednej z ważniejszych chorób ziemniaka — bakteriozy pierścieniowej. Cechy epidemiologiczne choroby, takie jak: rozwój w systemie naczyniowym roślin, powolny rozwój objawów na roślinie i w bulwach, ich podobieństwo do objawów powodowanych przez inne czynniki, zarówno biotyczne jak i abiotyczne oraz często bezobjawowe porażenie przez Cms bardzo utrudniają diagnostykę choroby (Dykstra, 1941, 1942; Slack, 1987). Infekcja i zasiedlenie przez Cms roślin i bulw ziemniaka może być niewykryte nawet przez kilka rozmnożeń wegetatywnych (De Boer i McNaughton, 1986; Slack, 1987; Manzer i in., 1987; De Boer i in., 1992; Pastuszewska, 1999; Pastuszewska i in., 2004).

Izolacja sprawcy bakteriozy pierścieniowej i jego identyfikacja metodami tradycyjnymi są czasochłonne i trudne, ze względu na powolny metabolizm i powolny wzrost na podłożach. W wykrywaniu i identyfikacji bakterii *Clavibacter michiganensis* subsp. *sepedonicus* w laboratoriach fitopatologicznych najszersze zastosowanie mają metody serologiczne, a wśród nich test immunoenzymatyczny (ELISA) oraz test immunofluorescencyjny (IFAS). W Polsce obowiązuje Rozporządzenie Ministra Rolnictwa i Rozwoju Wsi z 13 kwietnia 2004 r. (Dz.U. Nr 75, poz. 709) w sprawie szczegółowych sposobów postępowania przy zwalczaniu i zapobieganiu rozprzestrzeniania się bakterii *Clavibacter michiganensis* subsp. *sepedonicus*, które jest dostosowaniem Dyrektywy EEC (Nr 93/85) do prawa polskiego. Jest ona zgodna z procedurą rekomendowaną przez Europejską i Śródziemnomorską Organizację Ochrony Roślin (EPPO; Anonim, 1990). W pierwszym etapie wizualnie ocenia się 200 bulw z partii 25-tonowej. W kolejnym etapie przeprowadza się ekstrakcję bakterii z tkanki, pobranej z części przystolonowej bulwy, zagęszcza się zawiesinę bakterii przez wirowanie i następnie identyfikuje się patogena za pomocą testu IFAS, stosując przeciwciała poli- lub monoklonalne. Brak objawów typowych dla infekcji przy jednoczesnych pozytywnych wynikach w teście IFAS, świadczą o bezobjawowym porażeniu przez Cms. Wynik ten należy jednak potwierdzić w teście biologicznym. Najlepszą rośliną testową i swoistym podłożem umożliwiającym zwiększenie populacji Cms są rośliny bakłażana, odmiana Black Beauty. W stadium trzeciego liścia rośliny zakaża się ekstraktem z tkanki bulw ziemniaka. Po 40. dniach wzrostu roślin, ze zmacerowanej tkanki bakłażana, można izolować bakterie na podłoża mikrobiologiczne, najlepiej półselektywne (de la Cruz i in., 1992; Jansing i Rudolph, 1998). Przez kolejne pasáže można uzyskać czyste kultury Cms.

Celem pracy było śledzenie rozwoju objawów bakteriozy pierścieniowej na roślinach bakłażana inokulowanych zawiesinami o różnej liczebności bakterii *Clavibacter michiganensis* subsp. *sepedonicus* oraz ocena przydatności testu biologicznego na bakłażanie do potwierdzania pozytywnych wyników testu immunofluorescencyjnego.

MATERIAŁ I METODY

Uprawa oberżyny

Nasiona oberżyny (*Solanum melongena* L, odmiana Black Beauty) przed wysiewem do pasteryzowanego kompostu, zaprawiono preparatem Funaben. Siewki 14-dniowe, w fazie rozwiniętych liścieni, wysadzono po 5 sztuk w podłużnej doniczce o wymiarach 40 cm × 16 cm × 13 cm (dł. × szer. × wys.) napełnionej pasteryzowanym kompostem. Po upływie około 14 dni od przesadzenia, gdy co najmniej dwa, lecz nie więcej niż trzy liście były w pełni rozwinięte, rośliny zakażano. Przez cały czas trwania doświadczenia rośliny hodowano w pokoju wegetacyjnym w temp. 21–24°C, przy 14 godz. oświetleniu o natężeniu 2000 lux.

Kultura bakterii i sporządzenie inokulum bakteryjnego

Badania prowadzono na szczepie Cms BPR IOR 529, hodowanym przez 5 dni na agarze drożdżowo-peptonowo-glukozowym (YPGA). Przygotowano zawiesinę czystej kultury bakterii Cms w sterylnej wodzie destylowanej i ustalono spektrofotometrycznie (Shimadzu UV — 2100), przy długości fali 600 nm, zmętnienie odpowiadające około 10^8 jtk·ml⁻¹. Wykonano serię, dziesięciokrotnych rozcieńczeń inokulum, aż do uzyskania zawiesiny zawierającej 10 jtk·ml⁻¹.

Inokulacja roślin testowych

Siewki bakłażana w stadium trzeciego liścia, inokulowano zawiesinami bakterii Cms. W tym celu na każdej roślinie pomiędzy liścieniami i pierwszym liściem, za pomocą sterylnego skalpela wykonywano podłużne lub lekko ukośne nacięcie o długości 0,5–1,0 cm i głębokości średnio trzy czwarte średnicy łodygi. W nacięcie łodygi wprowadzano za pomocą mikropipety 5 µl inokulum bakteryjnego (o poziomie od 10^8 jtk·ml⁻¹ do 10^8 jtk·ml⁻¹). Ranę zabezpieczano sterylną wazeliną. Wykonano jednocześnie kontrolę, w której za pomocą mikropipety wprowadzono sterylną wodę destylowaną. Rośliny inkubowano przez 40 dni. Od 5. dnia rozpoczęto codzienne obserwacje roślin.

Przygotowanie prób i wykonanie testu immunofluorescencyjnego

Po zakończeniu testu biologicznego, z wszystkich roślin bakłażana, inokulowanych zawiesiną bakterii o tym samym poziomie, wykonano próby zbiorcze, które przebadano testem immunofluorescencyjnym. Rośliny ścinano, pobierano 2 cm fragmenty łodyg, tuż nad raną po inokulacji. Próbki tkanki roślin umieszczano w sterylnych, polietylenowych pojemnikach z przykrywką, zalewano 40 ml buforu fosforanowego do maceracji (PB) 0,05 M, pH 7,0 i wytrząsano przez okres 10 godzin, przy 150 obr./min. Uzyskane w ten sposób zawiesiny wirowano, a osad zawieszano w 0,5 ml buforu PB 0,01 M, pH 7,2. Przygotowane w ten sposób ekstrakty rozcieńczano dziesięcio- i stukrotnie w buforze PB 0,01 M, pH 7,2. Zarówno ekstrakty, jak i rozcieńczenia nanoszono na szkiełka wielopunktowe w ilości 20 µl na okienko, suszono powietrzem i utrwalano 95% alkoholem etylowym. Preparaty immunofluorescencyjne wykonano przy zastosowaniu poliklonalnych przeciwciał kozich (anty-Cms) i koniugatu króliczego firmy Loeve. Preparaty pokryte przeciwciałami inkubowano przez 30 min. w wilgotnej, ciemnej (dla koniugatu króliczego) komorze. Następnie przeprowadzono dwukrotne płukanie w buforze PBS 0,01 M, pH 7,2 i suszono. W ostatnim etapie na szkiełka podstawowe nanoszono roztwór glicerofosforanu

i przykrywano je szkiełkami nakrywkowymi. Preparaty przeglądano w mikroskopie fluorescencyjnym Jenalumar, przy powiększeniu 650 razy. W celu określenia liczby komórek Cms przeglądano 40 pól widzenia mikroskopu, w przypadku każdego rozcieńczenia.

WYNIKI

Pierwsze objawy porażenia zaobserwowano po upływie 7 dni od momentu zakażenia, na 4 z 10 roślin inokulowanych zawiesiną bakterii $9,1 \times 10^6$ jtk·ml⁻¹. Na najmłodszych liściach, zaobserwowano „tłuste, ciemne plamy” (rys. 1).



Rys. 1. Ciemna, tłusta plama na młodym liściu bakłażana (*Solanum melongena*) odmiana Black Beauty, 8 dni po inokulacji zawiesiną Cms $9,1 \times 10^6$ jtk·ml⁻¹

Fig. 1. Glassy, dark spot on young eggplant leaf (*Solanum melongena*) cv. Black Beauty, 8 days after inoculation with 9.1×10^6 cfu·ml⁻¹ of Cms

Tego typu symptomy, na roślinach infekowanych zawiesiną bakterii $9,1 \times 10^5$; $9,1 \times 10^4$ jtk·ml⁻¹ i $9,1 \times 10^3$ jtk·ml⁻¹, zaobserwowano po odpowiednio 11 i 14 dniach, od momentu inokulacji.

W kolejnym stadium porażenia niektóre starsze liście roślin testowych, nie zmieniając barwy blaszek, ulegały zwiotczeniu (rys. 3), natomiast inne liście na tych samych roślinach, posiadały lokalne chlorozy między nerwami (rys. 2). Rozwijające się młode liście, często ulegały charakterystycznym, jednostronnym deformacjom, połączonym z ciemniejszymi zmianami zabarwienia blaszek, opisywanymi wcześniej jako „tłuste, ciemne plamy”.

Zmiany chorobowe tego rodzaju przedstawiono na fotografii 4. Takie objawy obserwowano na roślinach, które inokulowano zawiesiną bakterii $9,1 \times 10^3$ jtk·ml⁻¹.

Zaawansowane stadium porażenia objawiało się silnymi chlorozami liści, które w miarę upływu czasu pogłębiały się, a tkanka ulegała lokalnym, nekrotycznym zmianom. W miarę wzrostu zarówno na słabo, jak i silnie porażonych roślinach bakłażana, po pewnym czasie tworzyły się liście, bez charakterystycznych objawów. Zaobserwowano, iż przy najwyższej liczbie bakterii w inokulum $9,1 \times 10^6$ jtk·ml⁻¹, niektóre rośliny testowe ulegały całkowitej nekrozie (rys. 5).



Rys. 2. Lokalne chlorozy między nerwami 20 dni od inokulacji zawiesiną Cms $9,1 \times 10^6$ jtk·ml⁻¹
Fig. 2. Interveinal chlorosis, 20 days after inoculation with 9.1×10^6 cfu·ml⁻¹ of Cms

Na roślinach inokulowanych zawiesiną komórek Cms 10 jtk·ml⁻¹ do $4,8 \times 10^2$ jtk·ml⁻¹, przez cały okres trwania testu, nie zaobserwowano żadnych objawów choroby (tab. 1), natomiast test IFAS potwierdził porażenie latentne (tab. 2). W 13. dniu trwania testu na wszystkich roślinach inokulowanych zawiesiną bakterii o najwyższej liczbie, wystąpiły objawy choroby. Obserwowano również wyraźną różnicę w intensywności porażenia roślin. Przy wyższej liczbie komórek Cms w inokulum obserwowano objawy choroby na większej liczbie liści, natomiast na roślinach zakażanych zawiesiną bakterii $9,1 \times 10^3$ jtk·ml⁻¹, stwierdzano tylko pojedyncze liście z objawami.



Rys. 3. Zwiotczenie liścia w 30 dniu od inokulacji zawiesiną $Cms\ 10^6\ jtk \cdot ml^{-1}$
Fig. 3. Wilting of eggplant leaf, 30 days after inoculation with $9.1 \times 10^6\ cfu \cdot ml^{-1}$ of *Cms*



Rys. 4. Jednostronne deformacje liścia bakłażana (*Solanum melongena*) odmiana Black Beauty
Fig. 4. Secund deformation of eggplants (*Solanum melongena*) cv. Black Beauty leaf



Rys. 5. Całkowita nekrotyzacja rośliny bakłażana (*Solanum melongena*) odmiana Black Beauty
Fig. 5. Complete necrosis of eggplant (*Solanum melongena*) cv. Black Beauty

Test IFAS dla prób zbiorczych (tab. 2), w których obserwowano rośliny z objawami bakteriozy pierścieniowej (wykonany z roślin inokulowanych zawiesiną komórek *Cms* powyżej $4,8 \times 10^2$ jtk \cdot ml $^{-1}$), potwierdził we wszystkich 4. zastosowanych poziomach inokulum, bardzo liczną obecność komórek *Cms* w badanej tkance, wynoszącą > 500 jednostek fluoryzujących w polu widzenia mikroskopu (jf/pwm). W przypadku prób z roślin inokulowanych zawiesiną zawierającą 10 jtk \cdot ml $^{-1}$ do 10^2 jtk \cdot ml $^{-1}$, w preparatach mikroskopowych zaobserwowano sporadyczne występowanie typowych komórek bakterii *Cms*, od 1 do 20 jednostek fluoryzujących (jf). Natomiast w preparacie z roślin zakażonych

zawiesiną bakterii Cms $4,8 \times 10^2$ jtk·ml⁻¹, stwierdzono powyżej 20 jf w preparacie, co odpowiada liczebności komórek $> 10^3$ jtk·ml⁻¹ ekstraktu.

Tabela 1

Rozwój objawów na roślinach bakłażana w zależności od poziomu inokulum *Cms* (szczep BPR IOR 529)
Symptoms development on eggplants inoculated with different numbers of *Clavibacter michiganensis* subsp. *sepedonicus* (strain BPR IOR 529) cells in inoculum

BPR IOR 529 (jtk×ml ⁻¹) (cfu × ml ⁻¹)	Liczba roślin Number of plants	Liczba roślin z objawami (dni po inokulacji) Number of plants showing symptoms (days after inoculation)					
		7	14	21	28	35	40
10	10	0	0	0	0	0	0
10 ²	10	0	0	0	0	0	0
4,8 × 10 ²	10	0	0	0	0	0	0
9,1 × 10 ³	10	0	1	2	5	6	6
9,1 × 10 ⁴	10	0	5	8	10	10	10
9,1 × 10 ⁵	10	0	3	7	8	8	8
9,1 × 10 ⁶	10	4	10	10	10	10	10
Kontrola (sterylna H ₂ O) Control (sterile water treated)	10	0	0	0	0	0	0

Tabela 2

Porównanie efektywności wykrywania *Cms* testem biologicznym i immunofluorescencyjnym w roślinach testowych inokulowanych zawiesiną *Cms*, szczep BPR IOR 529, 40 dni po inokulacji
Results of the bioassay and immunofluorescent tests on plants inoculated with the *C. m.* subsp. *sepedonicus* suspension, the strain BPR IOR 529, 40 days after inoculation

Poziom bakterii w inokulum (jtk×ml ⁻¹) Inoculum concentration(cfux ml ⁻¹)	Liczba roślin Number of plants		Wynik testu IFAS IFAS-test results
	badanych tested	z objawami showing symptoms	
10	10	0	+
10 ²	10	0	+
4,8 × 10 ²	10	0	++
9,1 × 10 ³	10	6	+++
9,1 × 10 ⁴	10	10	+++
9,1 × 10 ⁵	10	8	+++
9,1 × 10 ⁶	10	10	+++
Kontrola (sterylna H ₂ O) Control (sterile water treated)	10	0	—

+++ Liczba bakterii ≥ 500 jf/pwm, co odpowiada $\geq 10^7$ jtk·ml⁻¹ ekstraktu

+++ Bacterial concentration ≥ 500 immunofluorescing units (ifu)/ mf (per microscope field), which means 10^7 cfu·ml⁻¹ of extracts

++ Liczba bakterii >20 jf w preparacie, co odpowiada $> 10^3$ jtk·ml⁻¹ ekstraktu

++ Bacterial concentration >20 ifu per slide, which means $> 10^3$ cfu·ml⁻¹ of extract

+ Liczba bakterii w granicach, od 1–20 w preparacie = 50 - 10³ jtk·ml⁻¹ ekstraktu

+ Bacterial concentration from 1–20 ifu per slide = 50 - 10³ cfu·ml⁻¹ of extracts

— Nie obserwowano bakterii *Cms*; No bacterial cells observed

DYSKUSJA

Test patogeniczny na bakłażanie, do wykrywania *Clavibacter michiganensis* subsp. *sepedonicus* — sprawcy bakteriozy pierścieniowej ziemniaka, opisali Olsson (1976) oraz

Lelliott i Sellar (1976). Jest on rutynowo stosowany w wykrywaniu i identyfikacji Cms w celu potwierdzenia latentnego porażenia roślin ziemniaka (Dyrektywa EEC Nr 93/85, Rozporządzenie Min. Rolnictwa i Rozwoju Wsi z 13 kwietnia 2006). Lelliott i Sellar (1976) w teście na bakłażanie wykrywali z łatwością jedną bulwę, z symulowanym utajonym porażeniem bakteriozą pierścieniową, zmieszaną z 99 nieporażonymi bulwami.

Powszechnie stosowaną metodą wykrywania patogena jest immunofluorescencja pośrednia (test IFAS), której techniczna granica wykrywalności zawiera się w przedziale 10^3 - 10^4 jtk·ml⁻¹ (Dyrektywa EEC Nr 93/85). Często obserwowane są w preparatach mikroskopowych pojedyncze, morfologicznie typowe, fluoryzujące komórki Cms. W takich przypadkach wynik testu IFAS traktuje się jako negatywny.

W przeprowadzonym doświadczeniu po 40. dniach testu na roślinach inokulowanych zawiesinami komórek Cms od 10 do $4,8 \times 10^2$ jtk·ml⁻¹ (tab. 1) nie zaobserwowano żadnych objawów choroby. Minimalny poziom inokulum, przy którym wystąpiły objawy choroby, to $9,1 \times 10^3$ jtk·ml⁻¹, natomiast najszybciej, bo po 7. dniach od zakażenia, symptomy choroby zaobserwowano na roślinach inokulowanych zawiesiną $9,1 \times 10^6$ jtk·ml⁻¹. Zeller i Xie (1985) obserwowali pierwsze objawy choroby w postaci chloroz, przy minimalnym poziomie inokulum 2×10^3 jtk·ml⁻¹, gdy inokulum sporządzono z czystej kultury Cms oraz przy poziomie 2×10^4 jtk·ml⁻¹, gdy bakterie zmieszano z ekstraktem z tkanki ziemniaka.

Janse i Vaerenbergh (1987) badali wpływ wyższej niż optymalna (21° C) temperatury przeprowadzenia testu na wystąpienie objawów na roślinach bakłażana. Przy optymalnej temp. obserwowali objawy przy poziomie inokulum pomiędzy 5×10^3 i 5×10^4 jtk·ml⁻¹, podczas gdy rośliny rosły w temp. 28°C dopiero przy poziomie inokulum pomiędzy 5×10^5 i 5×10^6 jtk·ml⁻¹.

Po okresie trwania testu patogeniczności, liczebność bakterii w roślinach, inokulowanych zawiesiną o gęstości od 10 do 10^2 jtk·ml⁻¹, nadal pozostała poniżej progu wykrywalności testu IFAS, a w preparatach wykonanych z tych roślin obserwowano tylko nieliczne, typowe morfologicznie komórki Cms. Natomiast w roślinach inokulowanych zawiesiną bakterii zawierającą $4,8 \times 10^2$ jtk·ml⁻¹, mieszczącym się także poniżej progu wykrywalności IFAS, liczebność bakterii w tkance bakłażana wzrosła do poziomu wykrywanego IFAS (tab. 2).

Pastrik (2000) wykrywał Cms w zbiorczych próbach ziemniaków. W kilku przypadkach uzyskał negatywny wynik testu IFAS z zastosowaniem zarówno przeciwciał poli-, jak i monoklonalnych, natomiast dopiero w kolejnych retestach biologicznych (od 2 do 5) dla tych samych prób, wynik był pozytywny. Wskazane jest zatem, przeprowadzenie testu na bakłażanie dla prób, w których testem IFAS stwierdza się morfologicznie typowe fluoryzujące komórki w ilości poniżej 20 jednostek w preparacie. Przez okres 40 dni testu bakterie rozmnażają się w roślinie do poziomu możliwego do wykrycia IFAS, a w kolejnych testach biologicznych możliwe jest zaobserwowanie charakterystycznych objawów porażenia

Według Lopez i wsp. (1997, cyt. za Łojkowską, 2001) oraz Lopez i wsp. (2005) diagnostyka bakteryjnych organizmów szkodliwych w roślinach powinna polegać na zintegrowanym połączeniu izolacji, technik serologicznych, molekularnych oraz testu

biologicznego. Zdaniem autorów testy dopełniające się, poprawiają dokładność wykrywania patogenów, obniżając liczbę fałszywie pozytywnych i fałszywie negatywnych wyników. Pomimo czasochłonności i dużych kosztów zintegrowanej diagnostyki, ma ona uzasadnienie by obniżyć ryzyko rozprzestrzeniania bakteryjnych organizmów szkodliwych.

Ze względu na duże znaczenie bakteriozy pierścieniowej ziemniaka z punktu widzenia epidemiologicznego jak i fitosanitarnego można spodziewać się, że w niedługim czasie nastąpi wprowadzenie zmian w obowiązującym w krajach UE schemacie wykrywania i identyfikacji Cms i włączenie do niego metod molekularnych.

WNIOSKI

1. Diagnostyka latentnej formy bakteriozy pierścieniowej ziemniaka na podstawie testu fluorescencyjnego oraz testu patogeniczności na bakłazanie nie daje pewności wykrycia wszystkich nielicznych komórek bakterii *Clavibacter michiganensis* subsp. *sepedonicus*.
2. Konieczne są zmiany w obowiązującej procedurze diagnozowania bakteriozy pierścieniowej ziemniaka i wprowadzenie do wykrywania i identyfikowania sprawcy choroby czulszych technik np. technik molekularnych.

LITERATURA

- Anonim. 1990. Quarantine procedure. *Clavibacter michiganensis* ssp. *sepedonicus*. Inspection and test methods. Bulletin OEPP/EPPO Bulletin 20: 235 — 254.
- 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., Van Vaerenbergh J., Stead D. E., Janse J. D., Mc Kenzie A. R. 1992. A comparative study in five laboratories on detection of *Clavibacter michiganensis* subsp. *sepedonicus* in potato stems and tubers. Potato Research 35: 217 — 226.
- De la Cruz A. R., Wiese M. V., Schaad N. W. 1992. A semiselective agar medium for isolation of *Clavibacter michiganensis* subsp. *sepedonicus* from potato tissues. Plant Diseases 76: 830 — 834.
- 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.
- Janse J. D., Van Vaerenbergh J. 1987. Interpretation of the EC method for the detection of latent *Corynebacterium sepedonicum* infections in potato. Bulletin OEPP/EPPO Bulletin 17: 1 — 10.
- Jansing H., Rudolph K. 1998. Physiological capabilities of *Clavibacter michiganensis* subsp. *Sepedonicus* and development of a semi-selective medium. J. Plant Dis. Protection 105 (6): 590 — 601.
- Lelliot R. A., Sellar P. W. 1976. The detection of latent ring rot (*Corynebacterium sepedonicum* [Spiek. et Kottth.] Skapt. et Burkh.). Bulletin OEPP/EPPO Bulletin 6 (2): 101 — 106.
- Lopez M. M., Bertolini E., Caruso P., Penyalver R., Marco-Noales E., Gorris M. T., Morente C., Salcedo C., Cambra M., Llop P. 2005. Advantages of integrated approach for diagnosis of quarantine pathogenic bacteria in plant material. Phytopathologia Polonica 35: 49 — 56.
- Łojkowska E. 2001. Wykrywanie obecności czynników chorobotwórczych W: Biotechnologia roślin: diagnostyka molekularna roślin. (red. S. Malepszy), Wyd. PWN SA. Vol. 8: 462 — 485.

- Rozporządzenie Ministra Rolnictwa i Rozwoju Wsi z dnia 13 kwietnia 2004. W sprawie szczegółowych sposobów postępowania przy zwalczaniu i zapobieganiu rozprzestrzeniania się bakterii *Clavibacter michiganensis* subsp. *sepedonicus*. Dziennik Ustaw Nr.75, poz. 709.
- 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.
- Ollson K. 1976. Experience of ring rot caused by *Corynebacterium sepedonicum* in Sweden, particularly detection of the disease in its latent form. *EPP0 Bull.* 6: 209 — 219.
- Slack S. A. 1987. Biology and ecology of *Corynebacterium sepedonicum*. *Am. Potato J.* 64: 665 — 669.
- Pastrik K. H. 2000. Detection of *Clavibacter michiganensis* subsp. *sepedonicus* in potato tubers by multiplex PCR with coamplification of host DNA. *European Journal of Plant Pathology* 106: 155 — 165.
- 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.
- Pastuszewska T., Junosza Kisielewska I., Grzech W., Brzozowski S. 2004. Rozwój bakteriozy pierścieniowej ziemniaka w rozmnożeniach wegetatywnych roślin. *Biul. IHAR* 233: 277 — 287.
- Zeller W., Xie Y. 1985. Studies on the diagnosis of bacterial ring rot of potatoes. *Phytopathologische Zeitschrift* 112: 198 — 206.