PROGRESS IN PLANT PROTECTION
56 (1): 73-78, 2016
ISSN 1427-4337

DOI: 10.14199/ppp-2016-013
Published online: 22.02.2016

Received: 14.11.2015 / Accepted: 04.02.2016

Evaluation of the pathogenicity of different strains of *Clavibacter michiganensis* subsp. *sepedonicus* from NCPPB collection in United Kingdom

Ocena patogeniczności wybranych szczepów *Clavibacter michiganensis* subsp. *sepedonicus* pochodzących z kolekcji NCPPB w Wielkiej Brytanii

Grzegorz Gryń[1]*, Teresa Pastuszewska[1], Włodzimierz Przewodowski[2]

Summary

The aim of the study was to evaluate the cellulolytic activity, mucoid diversity and pathogenicity of selected strains of *Clavibacter michiganensis* subsp. *sepedonicus* (*Cms*) from National Collection of Plant Pathogenic Bacteria (NCPPB), York in United Kingdom in relation to eggplant (*Solanum melongena*). The disease symptoms on test plants range from 6.1 to 38.4% and two strains had no signs of infection. Hydrolysis zones of carboxymethylcellulose in the plate test resulted in high heterogeneity and ranged from 0.33 to 4.29 mm. High virulence of *Cms* strains in bioassay was observed with the increase of enzyme activity. The obtained results indicate that the correlation between pathogenicity of selected strains on eggplants and mucoid based on optical density of suspensions was significant at the level of –0.54.

Key words: virulence factors; *Clavibacter michiganensis* subsp. *sepedonicus*; mucoid strain; cellulolytic activity

Streszczenie

Celem przeprowadzonych badań była ocena właściwości celulolitycznych, zróżnicowania mukoidalnego oraz patogeniczności w stosunku do bakłażana (*Solanum melongena*) wybranych szczepów C*lavibacter michiganensis* subsp*. sepedonicus* (*Cms*) pochodzących z National Collection of Plant Pathogenic Bacteria (NCPPB), York w Wielkiej Brytanii. Objawy chorobowe na roślinach testowych kształtowały się na poziomie od 6,1 do 38,4%, dla dwóch szczepów nie stwierdzono symptomów porażenia. Strefy hydrolizy karboksymetylocelulozy w teście płytkowym wykazały dużą niejednorodność i wynosiły od 0,33 do 4,29 mm. Wraz ze wzrostem aktywności enzymu obserwowano wzrost wirulencji bakterii *Cms* w teście biologicznym. Korelacja patogeniczności szczepów określona w teście na bakłażanach i mukoidalności stwierdzonej na podstawie gęstości optycznej zawiesin była istotna i wyniosła –0,54.

Słowa kluczowe: czynniki wirulencji; *Clavibacter michiganensis* subsp. *sepedonicus*; mukoidalny szczep; aktywność celulolityczna

Instytut Hodowli i Aklimatyzacji Roślin – Państwowy Instytut Badawczy
[1] Oddział Bydgoszcz
Powstańców Wielkopolskich 10, 85-090 Bydgoszcz
[2] Zakład Nasiennictwa i Ochrony Ziemniaka
Bonin 3, 76-009 Bonin
*corresponding author: g.gryn@ihar.bydgoszcz.pl

The Polish Society of Plant Protection
The Institute of Plant Protection – National Research Institute
The Committee of Plant Protection of the Polish Academy of Science

Wstęp / Introduction

Clavibacter michiganensis subsp. *sepedonicus* (*Cms*), sprawca bakteriozy pierścieniowej stanowi poważne zagrożenie dla upraw ziemniaka. Powoduje znaczny wzrost kosztów produkcji wynikający ze straty plonów oraz wprowadzenia kwarantanny w miejscu produkcji ziemniaków. Rozprzestrzenianie się bakterii *Cms* następuje głównie przez porażony materiał sadzeniakowy oraz zanieczyszczone powierzchnie maszyn rolniczych stosowanych w uprawie ziemniaków (Ramey i wsp. 2004; van der Wolf i wsp. 2005a, b; Danhorn i Fuqua 2007; Harding i wsp. 2014). Bardzo ważne jest poznanie mechanizmów pozwalających bakteriom *Cms* zasiedlać wiązki przewodzące rośliny żywicielskiej. Stwierdzenie obecności komórek *Cms* w materiale pobranym z części nadziemnej roślin lub bulw ziemniaka, nie oznacza wystąpienia charakterystycznych objawów chorobowych na roślinie (latentna postać choroby). Występowanie symptomów choroby w postaci chloroz liści, więdnięcia części łodyg, zmian w tkance przewodzącej bulw zależy od odmiany ziemniaka, koncentracji i wirulencji patogena w roślinie oraz czynników środowiskowych (Westra i wsp. 1994; Kawchuk i wsp. 1998; Pastuszewska i Junosza Kisielewska 2004; Hill i wsp. 2011). Wykrywanie czynnika etiologicznego bakteriozy pierścieniowej ziemniaka oparte jest na zastosowaniu testów immunofluorescencji pośredniej, izolacji na podłożach półselektywnych, testu biologicznego i metody fluorescencyjnej hybrydyzacji in situ (FISH – fluorescent in situ hybridization) lub łańcuchowej reakcji polimerazy (PCR – polymerase chain reaction) (Pastrik 2000; Dyrektywa Komisji 2006/56/WE). Izolowane z roślin bakterie *Cms* mogą różnić się stopniem patogeniczności (wirulencją). Spośród poznanych czynników wirulencji wymienia się: wydzielane zewnątrzkomórkowo enzymy celulolityczne, białka indukujące nadwrażliwość oraz wytwarzane otoczki egzopolisacharydowe – polimery zewnątrzkomórkowe (EPS – extracellular polymeric substances) (Metzler i wsp. 1997; Nissinen i wsp. 2001; Bentley i wsp. 2008; Hogenhout i Loria 2008). Pozakomórkowe substancje wytwarzane przez komórki *Cms* pełnią wiele istotnych funkcji. Wśród składników występujących w otoczce bakterii *Cms*, wymienia się cztery główne komponenty, o różnej masie cząsteczkowej, zbudowane z fukozy, galaktozy, glukozy i mannozy (Westra i Slack 1992). Warstwa śluzu zabezpiecza komórki bakterii przed utratą wody, stanowi barierę przed czynnikami zewnętrznymi. Otoczka jest również miejscem wymiany jonowej oraz magazynuje składniki odżywcze i wiąże związki toksyczne (Jahr i wsp. 1999; Gartemann i wsp. 2003).

Rola otoczek śluzowych bakterii w patogeniczności jest dyskusyjna. Badania relacji roślina-patogen, skłaniają do podejrzewania EPS o utrudnianie reakcji obronnej rośliny. Ponadto EPS umożliwiają adhezję bakterii *Cms* do powierzchni biotycznych i abiotycznych, ułatwiają kolonizację komórek gospodarza i tworzenie biofilmu (Rudrappa i wsp. 2008). Zdaniem wielu badaczy czynnikiem wirulencji o największym znaczeniu jest produkcja enzymów celulolitycznych, proteolitycznych i amylolitycznych (Baer i Gudmestad 1995; Metzler i wsp. 1997; Laine i wsp. 2000; Holtsmark i wsp. 2008). Geny kodujące enzym celulazę (*celA*) zlokalizowane są w plazmidzie pCS1 (Laine i wsp. 2000; Nissinen i wsp. 2001).

Tabela 1. Lista badanych szczepów *Clavibacter michiganensis* subsp. *sepedonicus*
Table 1. List of tested strains of *Clavibacter michiganensis* subsp. *sepedonicus*

Szczep *Cms* Strain of *Cms*	Data wprowadzenia do kolekcji Date of introduction to the collection	Kraj pochodzenia Country of origin
NCPPB 299	1951	Kanada – Canada
NCPPB 378	1956	Szwecja – Sweden
NCPPB 379	1956	Szwecja – Sweden
NCPPB 2138	1968	Kanada – Canada
NCPPB 3294	1983	Belgia – Belgium
NCPPB 3295	1983	b.d. – n.d.
NCPPB 3296	1983	b.d. – n.d.
NCPPB 3324	1984	Belgia – Belgium
NCPPB 2140	1968	Czechy – Czech Republic
NCPPB 3385	1985	Norwegia – Norway
NCPPB 3896	1994	Wielka Brytania – United Kingdom
NCPPB 3898	1994	Ukraina – Ukraine
NCPPB 3917	1994	Kanada – Canada
NCPPB 4229	2001	Cypr – Cyprus
NCPPB 4053	1999	Szwecja – Sweden

b.d. – brak danych – n.d. – no data

Celem badań była charakterystyka patogeniczności wybranych szczepów *C. michiganensis* subsp. *sepedonicus*. W badaniach użyto 15 szczepów pochodzących z National Collection of Plant Pathogenic Bacteria (NCPPB), York w Wielkiej Brytanii (tab. 1).

Materiały i metody / Materials and methods

W doświadczeniu przeprowadzono test płytkowy określający aktywność celulolityczną, test biologiczny na roślinie bakłażana, ocenę wizualną kolonii oraz metodykę określającą stopień mukoidalności użytych do badania szczepów na podstawie pomiaru gęstości optycznej zawiesin.

Aktywność celulolityczną stwierdzono po posianiu zawiesin *Cms* (5 µl, w postaci kropli) o koncentracji 10^7 jtk/ml na pożywkę zmodyfikowaną M9 z dodatkiem soli sodowej karboksymetylocelulozy (cmc) (Meletzus i wsp. 1993). Po 10 dniach inkubacji w temperaturze 21°C zaznaczono obszar kolonii bakterii, a następnie wybarwiono płytki 0,1% roztworem czerwieni Kongo. Po 15 minutach płytki odbarwiono 1M roztworem NaCl. Zmierzono promień niezabarwionego „halo" wokół kolonii bakteryjnej świadczący o ilości produkowanego enzymu rozkładającego celulozę. Doświadczenie przeprowadzono w trzech powtórzeniach.

W teście patogeniczności użyto siewki bakłażana (odmiana Black Beauty) w stadium trzeciego liścia. Test wykonano w trzech terminach, każdorazowo inokulując zawiesiną danego szczepu *Cms* 10 roślin bakłażana. W trakcie eksperymentu określano wzrokowo powierzchnię blaszek liściowych z charakterystycznymi objawami (do oceny użyto wszystkie w pełni rozwinięte liście), wyrażoną w procentach. Odnotowano również liczbę roślin z charakterystycznymi objawami (według 5-stopniowej skali: 1 – brak objawów; 2–3 – ciemnozielone, następnie jasnozielone zmiany na liściach, 4 – chlorozy, 5 – nekrozy) do całkowitej liczby siewek użytych do badań dla danego szczepu *Cms* (tab. 2). Jako kontrolę negatywną użyto siewki bakłażana, które inokulowano sterylnym 0,9% roztworem NaCl. Do określenia zależności między patogenicznością szczepów stwierdzoną na roślinach bakłażana a ilością produkowanego enzymu celulolitycznego, zastosowano współczynnik korelacji Pearsona.

W badaniu opisującym poziom mukoidalności szczepów użyto 7-dniową hodowlę bakterii (pożywka YPGA – yeast peptone glucose agar – agar drożdżowo-peptonowo-glukozowy, inkubacja w temperaturze 21°C). Na wadze analitycznej odważano po 0,1 g inokulum bakteryjnego każdego szczepu, dodano 900 µl 0,9% NaCl (rozcieńczenie 10^{-1}), a następnie wykonano z nich szereg 10-krotnych rozcieńczeń (0,9% NaCl) i posiew na podłoże YPGA (Dyrektywa Komisji 2006/56/WE). Wykonano pomiar gęstości optycznej (OD – optical density) otrzymanych zawiesin w rozcieńczeniu 10^{-3} na spektrofotometrze (Shimadzu UV-2100) przy długości fali λ = 600 nm. Doświadczenie przeprowadzono w trzech powtórzeniach każdorazowo dokonując oceny wizualnej mukoidalności wyrosłych na podłożu YPGA kolonii *Cms*. Do analiz statystycznych użyto pakietu Statistica 7.1 PL, porównania szczegółowe wykonano testem post-hoc Tukeya (dla $p < 0,05$). Dokonano korelacji Pearsona mukoidalności, wyrażoną pomiarem gęstości optycznej zawiesin z patogenicznością szczepów, określoną w teście biologicznym.

Wyniki i dyskusja / Results and discussion

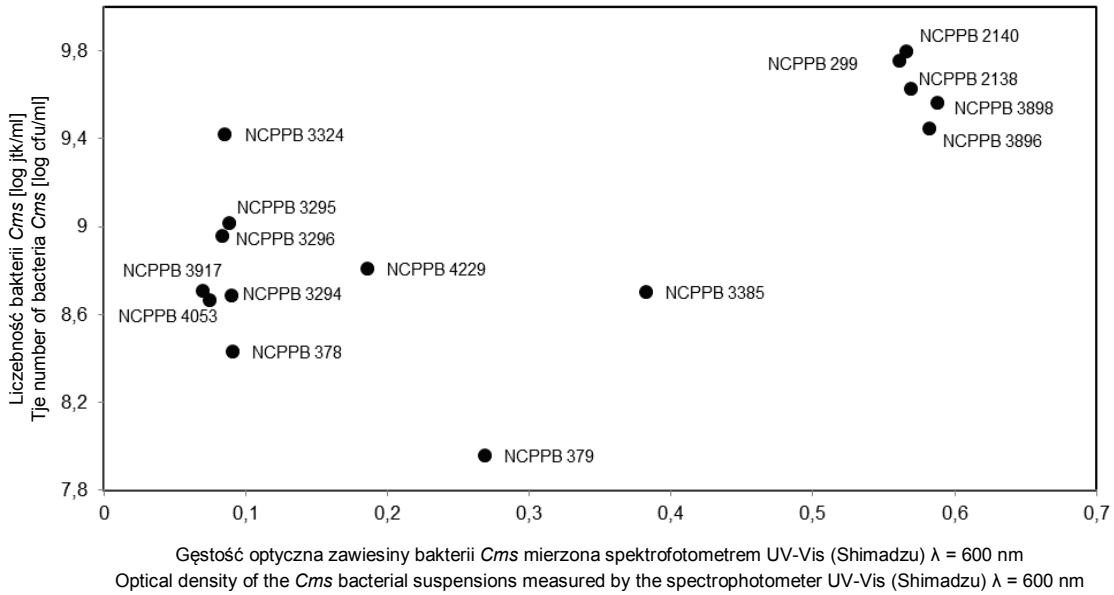
Otrzymane wyniki przedstawiają duże zróżnicowanie szczepów *Cms* z kolekcji NCCPB pod względem patogeniczności stwierdzonej na roślinach bakłażana. Test biologiczny na roślinach bakłażana, zdaniem Bishopa i Slacka (1987, 1992) może charakteryzować patogeniczność szczepów *Cms* według przyjętej skali. Autorzy jako podstawę zróżnicowania szczepów podali tempo ich wzrostu *in planta* oraz produkcję czynników wirulencji indukujących więdnięcie w warunkach kontrolowanych. W badaniach własnych zastosowano 5-stopniową skalę objawów i więdnięcia. Dwa szczepy *Cms*: NCPPB 3898 i 3896 nie powodowały symptomów chorobowych na oberżynie. Objawy chorobowe na roślinach testowych dla pozostałych szczepów kształtowały się na poziomie od 6,1 do 38,4% powierzchni blaszek liściowych. Tylko jeden szczep *Cms* NCPPB 4053 powodował charakterystyczne więdnięcia i chlorozy liści na wszystkich badanych siewkach bakłażana (tab. 2).

Pomiary stref hydrolizy karboksymetylocelulozy w teście płytkowym wykazały również dużą niejednorodność w grupie badanych szczepów i oscylowały w przedziale od 0,33 do 4,29 mm. Najniższe promienie strefy hydrolizy zaobserwowano u dwóch niemukoidalnych szczepów NCPPB 3898 i 3896, które nie powodowały symptomów chorobowych na roślinie testowej (tab. 2). Otrzymane wyniki pomiaru stref hydrolizy cmc odbiegają od wyników oceny rozkładu celulozy dla izolatów *Cms* pozyskanych z laboratoriów Państwowej Inspekcji Ochrony Roślin i Nasiennictwa (PIORiN) (Pastuszewska i Gryń 2013). W badaniach dotyczących aktywności celulolitycznej *Cms* badacze wykorzystali również szczepy przechowywane długi czas w kolekcji Instytutu Hodowli i Aklimatyzacji Roślin – Państwowego Instytutu Badawczego. Autorzy zaobserwowali mniejszą aktywność enzymatyczną i mniejszą patogeniczność szczepów po długim przechowywaniu na sztucznych podłożach w porównaniu do izolatów otrzymanych z laboratoriów PIORiN. Nissinen i wsp. (2001) w eksperymencie z użyciem 4 szczepów otrzymali wartości pomiaru strefy rozkładu celulozy wynoszące maksymalnie 3,6 mm, przy nieco wyższych, w porównaniu do badań własnych, obserwowanych objawach na bakłażanie (56%). Badaczom nie udało się jednak stwierdzić korelacji między aktywnością celulolityczną a wirulencją szczepów. W badaniach własnych wystąpiła korelacja między wielkością strefy hydrolizy celulozy a powierzchnią objawów chorobowych na bakłażanie wynosząca 0,7. Podobna zależność (korelacja 0,75) wystąpiła w badaniach Pastuszewskiej i Grynia (2013). Nissinen i wsp. (2001) podkreślają, że produkcja egzoenzymu rozkładającego celulozę jest niezbędna do wywoływania symptomów choroby, jednocześnie jednak sugerują, że obniżenie ekspresji genu *celA* powoduje trudności w diagnozie latentnej formy bakteriozy pierścieniowej.

Tabela 2. Charakterystyka szczepów bakterii *Clavibacter michiganensis* subsp. *sepedonicus*
Table 2. Characteristic of bacterial strains of *Clavibacter michiganensis* subsp. *sepedonicus*

Szczep *Cms* Strain of *Cms*	Strefa hydrolizy cmc[1], średnia Region of cmc[1] hydrolysis, mean [mm]	Ocena wizualna mukoldalności kolonii *Cms* Visual assessment of *Cms* colony	Gęstość optyczna zawiesiny otrzymanej z 0,1 g inokulum *Cms* (1000×), średnia The optical density of the suspension obtained from 0.1 g *Cms* inoculum (1000×), mean	Liczba roślin z objawami/całkowita liczba inokulowanych roślin Number of plants with symptoms/total number of inoculated plants	Powierzchnia liści bakłażana z objawami, średnia Eggplant leaf surface with symptoms, mean [%]
NCPPB 3898	0,33 (0,47)[2]	–	0,59 (0,01) a	0/30	0
NCPPB 3896	0,58 (0,32)	–	0,58 (0,05) a	0/30	0
NCPPB 378	2,83 (0,24)	+++	0,09 (0,03) d	12/30	6,1
NCPPB 3385	1,75 (0,50)	++	0,38 (0,09) b	12/30	7,8
NCPPB 3917	3,25 (0,40)	+++	0,07 (0,01) d	18/30	13,9
NCPPB 379	3,04 (0,21)	++	0,27 (0,09) bc	20/30	15,8
NCPPB 2138	3,04 (0,21)	+	0,57 (0,07) a	29/30	17,1
NCPPB 2140	1,08 (0,35)	–	0,57 (0,07) a	25/30	19,8
NCPPB 4229	1,33 (0,24)	++	0,19 (0,02) cd	26/30	24
NCPPB 299	2,50 (0,00)	+	0,56 (0,02) a	29/30	26,2
NCPPB 3295	3,04 (0,48)	+++	0,09 (0,02) d	27/30	28,4
NCPPB 3294	2,87 (0,25)	+++	0,09 (0,00) d	24/30	29,6
NCPPB 3324	4,29 (0,34)	+++	0,09 (0,01) d	29/30	29,6
NCPPB 3296	4,04 (0,08)	+++	0,08 (0,01) d	29/30	34,5
NCPPB 4053	4,00 (0,00)	+++	0,07 (0,01) d	30/30	38,4

[1] sól sodowa karboksymetylocelulozy – carboxymethylcellulose sodium salt
[2] odchylenie standardowe – standard deviation
– szczep niemukoidalny – non-mucoid strain
++ szczep średnio mukoidalny – medium mukoid strain
+++ szczep mukoidalny – mucoid strain
Średnie oznaczone tymi samymi literami nie różnią się istotnie przy p = 0,05
Averages followed by the same letters do not differ significantly at p = 0.05



Rys. 1. Wykres rozrzutu pomiaru gęstości optycznej (OD_{600}) i liczebności bakterii *Cms* (log jtk/ml) w zawiesinie wykonanej z 0,1 g inokulum (rozcieńczenie 1:1000)
Fig. 1. Dispersion plot optical density (OD_{600}) and number of *Cms* bacteria (log cfu/ml) in suspension made from 0.1 g inoculum (dilution 1:1000)

W badaniach własnych podjęto próbę oceny zróżnicowania szczepów *Cms* pod względem ilości produkowanej otoczki egzopolisacharydowej (mukoidalności) i jej wpływu na patogeniczność bakterii stwierdzanej w teście biologicznym na bakłażanie. Liczebność bakterii w jednakowej naważce wynoszącej 0,1 g inokulum była różna w zależności od stopnia mukoidalności, co świadczyć może o ilości produkowanej otoczki mukoidalnej (rys. 1). Większa wartość średniej pomiaru gęstości optycznej zawiesiny odpowiada mniejszej ilości wytwarzanej otoczki śluzowej (EPS) w ocenie wizualnej kolonii. Westra i Slack (1992) dowiedli, że proporcje monosacharydów wchodzących w skład otoczki mukoidalnej badanych szczepów *Cms* były zróżnicowane. Autorzy wskazują możliwość fizycznej blokady wiązek przewodzących przez EPS, prowadzącą do więdnięcia rośliny. Badacze nie odnotowali jednak zależności użytych szczepów *Cms*, różniących się mukoidalnością, ze zdolnością wywoływania symptomów chorobowych na roślinie bakłażana i ziemniaka. W przypadku patogena blisko spokrewnionego z *Cms* – *Clavibacter michiganensis* subsp. *michiganensis* (*Cmm*), Bermpohl i wsp. (1996) zaobserwowali nieznacznie większe masy roślin pomidorów inokulowanych szczepami bakterii o zredukowanej produkcji EPS w porównaniu ze szczepami wirulentnymi. W doświadczeniu własnym na podstawie stopnia występowania objawów chorobowych na bakłażanie stwierdzono korelację wirulencji i wartości pomiaru gęstości optycznej, świadczącej o mukoidalności szczepów, wynoszącą –0,54. Lepsze zrozumienie roli otoczek mukoidalnych i egzoenzymów w patogeniczności szczepów *Cms* wymaga dodatkowych badań o szerszym zasięgu obejmującym kolonizację roślin żywicielskich, regulację ekspresji genów kodujących celulazy i szybkość namnażania patogena w roślinie. Opracowanie odpowiednich testów oceniających stopień wirulencji szczepów *Cms* jest pierwszym krokiem do wyjaśnienia mechanizmów odpowiedzialnych za występowanie objawów chorobowych na roślinie i skutecznej walki z bakteriozą pierścieniową ziemniaka w formie latentnej. Opracowywany test stwierdzający ilość wydzielanego egzopolisacharydu z próbki inokulum bakteryjnego na podstawie pomiaru spektrofotometrycznego i posiewu na podłoże stałe pozwoli, w przypadku skrajnie różniących się mukoidalnością szczepów *Cms*, na doprecyzowanie warunków prowadzonych testów patogeniczności.

Wnioski / Conclusions

1. Wykazano duże zróżnicowanie wirulencji szczepów *Cms* pochodzących z kolekcji NCPPB.
2. Stwierdzono istotny wpływ ilości produkowanego egzoenzymu celulazy na nasilenie symptomów chorobowych na roślinach bakłażana, a tym samym wirulencję szczepu.
3. Zaobserwowano znaczne zróżnicowanie szczepów *Cms* pod względem mukoidalności. Szczepy powodujące większe nasilenie objawów na bakłażanie były szczepami mukoidalnymi.

Literatura / References

Baer D., Gudmestad N.C. 1995. *In vitro* cellulolytic activity of the plant pathogen *Clavibacter michiganensis* ssp. *sepedonicus*. Canadian Journal of Microbiology 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. Journal of Bacteriology 190 (6): 2150–2160.

Bermpohl A., Dreier J., Bahro R., Eichenlaub R. 1996. Exopolysaccharide in the pathogenic interaction of *Clavibacter michiganensis* subsp. *michiganensis* with tomato plants. Microbiological Research 151 (4): 1–9.

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. American Potato Journal 64 (5): 227–234.

Bishop A.L., Slack S.A. 1992. Effect of infection with *Clavibacter michiganensis* subsp. *sepedonicus* Davis et al. on water relation in potato. Potato Research 35 (1): 59–63. DOI: 10.1007/BF02357724.

Danhorn T., Fuqua C. 2007. Biofilm formation by plant-associated bacteria. Annual Review of Microbiology 61 (1): 401–422.

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.

Gartemann K.H., Kirchner O., Engemann J., Gräfen I., Eichenlaub R., Burger A. 2003. *Clavibacter michiganensis* subsp. *michiganensis*: first steps in the understanding of virulence of a Gram-positive phytopathogenic bacterium. Journal of Biotechnology 106 (2–3): 179–191.

Harding M.W., Daniels G.D., Howard R.J. 2014. *In vitro* evaluations of microbial biofilms and their responses to chemical disinfectants. Acta Horticulturae 1053: Proceedings of the Second International Symposium on Discovery and Development of Innovative Strategies for Postharvest Disease Management: 245–255. DOI: 10.17660/ActaHortic.2014.1053.27.

Hill B., Kalischuk M., Waterer D.R., Bizimungu B., Howard R. 2011. An environmental model predicting bacterial ring rot symptom expression. American Journal of Potato Research 88 (3): 294–301.

Hogenhout S.A., Loria R. 2008. Virulence mechanisms of Gram-positive plant pathogenic bacteria. Current Opinion in Plant Biology 11 (4): 449–456.

Holtsmark I., Takle G.W., Brurberg M.B. 2008. Expression putative virulence factors in the potato pathogen *Clavibacter michiganensis* subsp. *sepedonicus* during infection. Archives of Microbiology 189 (2): 131–139.

Jahr H., Bahro R., Ahlemeyer J., Eichenlaub R. 1999. Interactoins between *Clavibacter michiganensis* and its host plants. Environmental Microbiology 1 (2): 113–118.

Kawchuk L.M., Lynch D.R., Kozub G.A., Nelson G.A., Kulcsar F., Fujimoto D.K. 1998. Multi-year evaluation of *Clavibacter michiganensis* subsp. *sepedonicus* disease symptoms in cultivated potato genotypes. American Journal of Potato Research 75 (6): 235–243.

Laine M.J., Haapalainen M., Wahlroos T., Kankare K., Nissinen R., Kassuwi S., Metzler M.C. 2000. The cellulose encoded by the native plasmid of *Clavibacter michiganensis* ssp. *sepedonicus* plays a role in virulence and contains an expansin-like domain. Physiological and Molecular Plant Pathology 57 (5): 221–233.

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 (7): 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 (2): 175–182.

Pastrik K.H. 2000. Detection of *Clavibacter michiganensis* ssp. *sepedonicus* in potato tubers by multiplex PCR with coamplification of host DNA. European Journal of Plant Pathology 106 (2): 155–165.

Pastuszewska T., Gryń G. 2013. Aktywność celulolityczna a wirulencja *Clavibacter michiganensis* subsp. *sepedonicus*. Biuletyn Instytutu Hodowli i Aklimatyzacji Roślin 270: 123–131.

Pastuszewska T., Junosza Kisielewska I. 2004. Reakcja wybranych odmian ziemniaka na inokulację bakteriami *Clavibacter michiganensis* subsp. *sepedonicus*. [Response of potato cultivars to inoculation with bacteria *Clavibacter michiganensis* subsp. *sepedonicus*]. Progress in Plant Protection/Postępy w Ochronie Roślin 44 (2): 1014–1016.

Ramey B.E., Koutsoudis M., von Bodman S.B., Fuqua C. 2004. Biofilm formation in plant-microbe associations. Current Opinion in Microbiology 7 (6): 602–609.

Rudrappa T., Biedrzycki M.L., Bais H.P. 2008. Causes and consequences of plant-associated biofilms. FEMS Microbiology Ecology 64: 153–166.

van der Wolf J.M., Elphinstone J.G., Stead D.E., Metzler M., Müller P., Karjalainen R. 2005a. Epidemiology of *Clavibacter michiganensis* subsp. *sepedonicus* in relation to control of bacterial ring rot. Plant Research International B.V. Wageningen, February 2005, 38 pp.

van der Wolf J.M., van Beckhoven J., Hukkanen A., Karjalainen R., Muller P. 2005b. Fate of *Clavibacter michiganensis* ssp. *sepedonicus*, the causal organism of bacterial ring rot of potato, in weeds and field crops. Journal of Phytopathology 153 (6): 358–365.

Westra A.A.G., Arneson C.P., Slack S.A. 1994. Effect of interaction of inoculum dose, cultivar, and geographic location on the development of foliage symptoms of bacterial ring rot of potato. Phytopathology 84 (4): 410–415.

Westra A.A.G., Slack S.A. 1992. Isolation and characterization of extracellular polysaccharide of *Clavibacter michiganensis* subsp. *sepedonicus*. Phytopathology 82 (10): 1193–1200.