Erwinia carotovora (*Pectobacterium carotovorum*) – metody wykrywania, identyfikacji i badania zróżnicowania genetycznego[1]

Wojciech Śledź, Ewa Łojkowska
Zakład Ochrony i Biotechnologii Roślin,
Międzyuczelniany Wydział Biotechnologii
Uniwersytetu Gdańskiego i Akademii Medycznej w Gdańsku
ul. Kładki 24, 80-822 Gdańsk
e-mail: lojkowsk@biotech.univ.gda.pl

Słowa kluczowe: *Erwinia carotovora*, *Pectobacterium carotovorum*, mokra zgnilizna, metody wykrywania, identyfikacji i różnicowania

Wstęp

W stosowanej przez wiele lat klasyfikacji bakterii opartej na analizie cech biochemicznych, serologicznych oraz wywoływanych objawach chorobowych [18, 54], rodzaj *Erwinia* (rodzina *Enterobacteriaceae*, rząd *Eubacteriales*, klasa *Eubacteriae*) obejmował trzy grupy bakterii: *Amylovora*, *Carotovora*, *Herbicola*. W ostatnich latach na podstawie badań sekwencji genów kodujących 16S rRNA, opracowano nową systematykę bakterii z rodzaju *Erwinia*. Z dawnego rodzaju *Erwinia* wyróżniono cztery rodzaje: *Erwinia*, *Pectobacterium*, *Brenneria*, *Pantoea* [25]. Klasyfikacja tych bakterii jest wciąż dyskutowana. Uważa się, iż systematyka oparta na badaniu genów kodujących 16S rRNA nie jest wystarczająca, ponieważ nie uwzględnia licznych cech badanych bakterii, np. specyficzności interakcji roślina–patogen oraz właściwości patogenicznych różnych mikroorganizmów z rodzaju *Erwinia*. Obowiązująca obecnie szczegółowa taksonomia rodzaju *Erwinia* i *Pectobacterium* dostępna jest na stronach internetowych http://www.dsmz.de/bactnom/nam1159.htm i http://www.dsmz.de/bactnom/nam2237.htm [9].

[1] Praca finansowana z projektu KBN 6PO6A 033 21 i SPB/COST853/P-04/DZ 189.

W obrębie gatunku *E. carotovora* (*Pectobacterium carotovorum*) wyróżnia się pięć podgatunków: *E. c.* subsp. *atroseptica*, (*P. c.* subsp. *atrosepticum*), *E. c.* subsp. *carotovora* (*P. c.* subsp. *carotovorum*), *E. c.* subsp. *betavasculorum* (*P. c.* subsp. *betavasculorum*), *E. c.* subsp. *odorifera* (*P. c.* subsp. *odoriferum*), *E. c.* subsp. *wasabiae* (*P. carotovorum* subsp. *wasabiae*).

Duża grupa bakterii z dawnego rodzaju *Erwinia*, zaliczanych obecnie do nowego rodzaju *Pectobacterium*, nie wykazuje specyficzności, odnośnie gatunku infekowanych roślin. Bakterie te mogą powodować więdnięcie, miękkie zgnilizny, plamistości i zgorzele tkanki roślinnej. Niektóre gatunki mogą być fakultatywnymi patogenami roślin, zwierząt, ludzi a także niepatogenicznymi epifitami roślin. Bakterie z rodzaju *Pectobacterium* mogą powodować straty gospodarcze w uprawach m.in. ziemniaków, pomidorów, kukurydzy, marchwi, cykorii, buraków cukrowych oraz roślin ozdobnych: filodendronów, chryzantem, sępoli i goździków [49, 50]. Zdaniem Perombelona i Hyman [48] tylko bakterie *E. c.* subsp. *atroseptica* i niektóre zimnolubne szczepy *E. chrysanthemi* mogą wywoływać czarną nóżkę ziemniaka (gnicie podstaw łodyg roślin ziemniaka podczas wegetacji). Natomiast bakterie *E. c.* subsp. *atroseptica*, *E. c.* subsp. *carotovora* oraz *E. chrysanthemi* wywołują mokrą zgniliznę bulw (maceracja tkanki bulw ziemniaka głównie podczas okresu przechowywania). Bakterie *E. c.* subsp. *atroseptica*, w niektórych krajach europejskich, są uważane za jednego z głównych sprawców strat plonów w uprawach ziemniaka [46].

W związku z faktem, iż w większości publikacji dotyczącej omawianej grupy bakterii użyto nazw wynikających z systematyki opartej na właściwościach biochemicznych i akceptowanych przez większość fitopatologów, w niniejszej publikacji posługiwano się w większości przypadków nazwą *Erwinia carotovora*.

Bakterie gatunku *E. carotovora*, są Gram-ujemnymi pałeczkami syntetyzującymi substancje o charakterze bakteriocyn [4]. Te fakultatywne anaeroby nie formują przetrwalników. Niektóre z nich mają rzęski. Jako saprofity powszechnie występują w zbiornikach wodnych, wodach gruntowych, powietrzu i glebie.

Generalnie przyjmuje się, iż infekcje bulw ziemniaka wywołane przez bakterie *E. carotovora* są nieuniknione. Głównym źródłem bakterii *E. c.* subsp. *atroseptica* na polu są zainfekowane oraz gnijące bulwy mateczne. Nowo tworzące się bulwy mogą być zakażane na drodze systemicznej lub poprzez „bakteryjne wycieki" z bulw matecznych. Kolejne źródła zakażeń to uszkodzone w czasie zabiegów agrotechnicznych liście oraz łodygi zainfekowanych roślin. Natomiast gleba jest znacznie mniej ważnym źródłem bakterii *E. c.* subsp. *atroseptica*. Wynika to z faktu, iż w tym środowisku komórki bakteryjne przeżywają w ograniczonej liczbie [49, 50].

Wnikanie komórek bakteryjnych do tkanek, następuje poprzez miejsca uszkodzone mechanicznie podczas zabiegów agrotechnicznych, zbioru, transportu oraz przez naturalne otwory rośliny (np. aparaty szparkowe, hydatody) [1]. Tak zwany progowy poziom bakterii, powyżej którego na łodygach ziemniaka pojawiają się objawy czar-

nej nóżki, niezależnie od warunków środowiskowych, wynosi około 10^3 jednostek tworzących kolonie (j.t.k.) *E. c.* subsp. *atroseptica* na bulwę [49, 50].

Wykrywanie i identyfikacja bakterii należących do gatunku *E. carotovora*

Prace związane z wykrywaniem i identyfikacją bakteryjnych patogenów roślin rozpoczęto w drugiej połowie XIX wieku, kiedy to w 1878 roku, Buriill opublikował wyniki badań, w których stwierdził, iż zarazę ogniową jabłoni i grusz w stanie Illinois (USA) wywołują bakterie. Wkrótce po tym odkryciu, mikrobiolog Erwin F. Smith opisał kilka następnych chorób roślin wywoływanych również przez bakterie. W 1920 roku, Smith opisał po raz pierwszy pałeczki Gram-ujemne, nieformujące spor, będące fakultatywnymi anaerobami, należące do rodziny *Enterobacteriaceae* i powodujące choroby roślin [1].

Metody stosowane do wykrywania i identyfikacji bakterii z gatunku *E. carotovora* można podzielić na trzy grupy. Pierwsza grupa obejmuje testy opierające się na badaniu cech biochemiczno-fizjologicznych mikroorganizmów oraz podstawowe techniki mikrobiologiczne polegające na barwieniu i obserwacji cech morfologicznych wyizolowanych patogenów. Kolejną grupę stanowią różne techniki serologiczne wykorzystujące przeciwciała poli- i monoklonalne. Ostatnia grupa to techniki molekularne bazujące na badaniu właściwości kwasów nukleinowych, stanowiących materiał genetyczny patogenów.

Testy biochemiczno-fizjologiczne

Metody płytkowe. Do izolacji patogenów występujących na roślinach oraz materiale nasiennym rutynowo stosuje się metodę płytkową (ang. Plating Assays, Conventional Plate Count), polegającą na wysiewaniu homogenatów zainfekowanych tkanek roślinnych lub nasion (sadzeniaków) na różnego rodzaju podłoża mikrobiologiczne o charakterze wybiórczym (selektywnym), półwybiórczym lub wybiórczo-różnicującym. Najlepszym i najchętniej stosowanym podłożem wybiórczo-różnicującym do izolacji oraz wstępnej identyfikacji pektynolitycznych bakterii z rodzaju *Erwinia* jest podłoże CVP (ang. Cristal Violet Pectate medium), na którym bada się zdolności bakterii do degradacji kwasu poligalakturonowego (PGA) [47].

Czynnikiem pomocniczym w identyfikacji może być barwienie całych komórek patogena lub poszczególnych elementów strukturalnych komórek (np. rzęsek) i obserwacja za pomocą mikroskopu. Przykład może stanowić podstawowe barwienie stosowane w mikrobiologii od 1884 roku, tj. barwienie metodą Grama [33].

Testy biochemiczne wykorzystywane do identyfikacji bakterii z rodzaju *Erwinia* to m.in. badanie zdolności do wzrostu w temperaturze 20°C, 30°C, 37°C oraz w wa-

runkach beztlenowych, aktywności fosfatazy, katalazy, oksydazy i enzymów proteolitycznych, odporności na 5% NaCl, utylizacji α-metylo-D-glukozydu, glukozy, fruktozy, galaktozy, mannitolu, rybozy, mannozy, sorbitolu, zdolności do produkcji β-galaktozydazy, cukrów redukujących z sacharozy, H_2S z cysteiny, redukcji azotanów, zdolności do rozkładu i utylizacji glicerolu, bursztynianów, fumaranów, octanów, jabłczanów, szczawianów, benzoesanów, propionianów, L-arabinozy, wytwarzania gazu z melezitozy, dekstryn, adonitolu, dulcitolu. Bada się także zdolność bakterii do wytwarzania zewnątrzkomórkowych polisacharydów oraz zdolność do poruszania się [35, 54]. Charakterystyczne właściwości biochemiczno-fizjologiczne pięciu podgatunków należących do gatunku *E. carotovora* oraz gatunku *E. chrysanthemi* przedstawiono w tabeli 1.

Tabela 1. Cechy biochemiczno-fizjologiczne bakterii *E. c.* subsp. *atroseptica* (Eca), *E. c.* subsp. *carotovora* (Ecc), *E. c.* subsp. betavasculorum (Ecb), *E. c.* subsp. *odorifera* (Eco), *E. c.* subsp. *wasabiae* (Ecw) i gatunku *E. chrysanthemi* (Ech) [62]

Testy biochemiczno-fizjologiczne	Eca	Ecc	Ecb	Eco	Ecw	Ech
Właściwości pektynolityczne (CVP)	+	+	+	+	+	+
Wzrost w temp. 20°C	+	+				–
Wzrost w temp. 30°C	+	+	+			+
Wzrost w temp. 36–37°C	–	+	+		–	+
Odporność na 5% NaCl	+	+		+		–
Aktywność alkalicznej fosfatazy	–	–	–			+
Zdolność do produkcji kwasu z α-metylo-D-glukozydu	+	–	+		–	–
Zdolność do produkcji cukrów redukujących z sacharozy	+	–	+		–	–/+
Wrażliwość na erytromycynę	–	–	–			+

Testy, w których bada się fizjologiczno-biochemiczne właściwości różnych bakterii często są opracowywane w formie zestawów komercyjnych. Klasycznym przykładem może być test API (ang. Analytical Profile Index), zestaw kilkunastu mini-probówek zawierających różne podłoża mikrobiologiczne służące do szybkiej identyfikacji bakterii np. z rodziny *Enterobacteriaceae* – test API 20E. Biochemiczna charakterystyka bakterii z podgatunku *E. c.* subsp. *atroseptica* z zastosowaniem komercyjnych testów API 20E i API 50CHE została opisana przez De Boer'a i in. [14].

Na podstawie właściwości biochemicznych bakteryjne patogeny roślin można także różnicować w obrębie gatunku lub podgatunku tworząc tzw. biowary lub grupy biochemiczne. Otrzymane wyniki różnicowania biochemiczno-fizjologicznego izolatów podgatunku *E. c.* subsp. *atroseptica* z terenu Polski wykazały, iż 58,8% badanych izolatów wykazuje typowe dla tej grupy cechy fenotypowe [57, 58]. Pozostałe izolaty nie wykazywały typowych reakcji biochemiczno-fizjologicznych (np. wzrost

w temperaturze 37°C, aktywność alkalicznej fosfatazy, brak zdolności redukowania sacharozy), szczepy takie nazywane są szczepami nietypowymi.

Również Dickey i Kelman [17] wskazali, iż szczepy *E. c.* subsp. *atroseptica* mogą wykazywać różne zdolności co do produkcji cukrów redukujących z sacharozy oraz kwasu z maltozy. Także w badaniach Alarcon i in. [2] niektóre ze szczepów *E. c.* subsp. *atroseptica* nie wykazywały zdolności do produkcji kwasu z α-metylo-D-glukozydu lub rozmnażały się w temperaturze 37°C, uważanej za zbyt wysoką dla tego podgatunku.

Klasyczne metody izolacji, identyfikacji i różnicowania patogenów roślinnych charakteryzują się stosunkowo niskim kosztem, są łatwe do przeprowadzenia, a przy ich wykonaniu nie stosuje się zazwyczaj drogiego sprzętu specjalistycznego. Niestety testy biochemiczne charakteryzują się także pracochłonnością oraz stosunkowo długim czasem oczekiwania na wynik. Bardzo często uzyskane wyniki są niejednoznaczne i trudne do interpretacji.

Analiza kwasów tłuszczowych (ang. Fatty Acid Profiles – FAP). Metoda ta polega na analizie jakościowej i ilościowej wyższych kwasów tłuszczowych występujących w błonach komórek bakteryjnych. W pierwszym etapie prowadzi się ekstrakcję kwasów tłuszczowych, a następnie są one poddawane metylacji. Analizę metyloestrów wyższych kwasów tłuszczowych (ang. Fatty Acid Methyl Esters – FAMEs) prowadzi się przy pomocy chromatografii gazowej (ang. Gas Chromatography – GC) lub chromatografii gazowo-cieczowej (ang. Gas and Liquid Chromatography – GLC). Natomiast identyfikację rzadziej spotykanych kwasów tłuszczowych prowadzi się za pomocą chromatografii gazowej sprzęgniętej ze spektrometrią masową (ang. Gas Chromatography – Mass Spectrometry – GC-MS).

Zawartość wyższych kwasów tłuszczowych badano m.in. w przypadku bakterii z podgatunku *E. c.* subsp. *atroseptica* i *E. c.* subsp. *carotovora*. Stwierdzono istotne różnice w ich składzie i opisano profile FAMEs dla obu podgatunków. Stwierdzono także, iż wyniki uzyskane metodą FAP są wiarygodne, pewne i powtarzalne oraz metoda ta wykazuje dużą przydatność do identyfikacji i rozróżnienia tych dwóch podgatunków bakterii [30, 51].

Testy patogeniczności. Testy patogeniczności przeprowadza się w celu zbadania zdolności bakterii do wywoływania objawów chorobowych na określonych gatunkach roślin. W zależności od podgatunku badanego patogena bakteryjnego do infekcji wykorzystuje się różne gatunki roślin, jak np. cykoria, begonia, ziemniak. Testy patogeniczności można wykonywać na całych roślinach lub ich częściach. Na wynik testu patogeniczności oprócz różnic genetycznych między badanymi szczepami bakterii wpływają warunki inkubacji, takie jak optymalna temperatura wzrostu, poziom wilgotności, dostęp tlenu, ekspozycja świetlna czy też czas inkubacji [37].

Testy serologiczne

Do wykrywania i identyfikacji bakteryjnych patogenów roślin najczęściej stosowane są metody serologiczne. Metody te opierają się na interakcji antygen-przeciwciało.

Testy szkiełkowe. Najprostszymi testami serologicznymi są precypitacja i aglutynacja szkiełkowa. W pierwszym przypadku test polega na badaniu reakcji surowicy i antygenu rozpuszczonego w roztworze. W drugim przypadku do kropli zawiesiny bakteryjnej dodaje się surowicę zawierającą przeciwciała [20]. Jedną z takich technik – RPH (ang. Reverse Passive Haemagglutination), wykorzystano do wykrywania bakterii z podgatunku *E. c.* subsp. *carotovora* [32].

Test ELISA (ang. Enzyme Linked Immunosorbent Assay). Najpowszechniej stosowaną metodą do wykrywania i identyfikacji patogenów roślin jest immunoenzymatyczny test ELISA oraz jego modyfikacje. Badania zróżnicowania serologicznego bakterii z gatunku *E. carotovora* oparto na uzyskaniu przeciwciał dla głównej determinanty antygenowej, którą jest lipopolisacharyd (LPS) [10]. Inną stosowaną determinantą antygenową jest flagellina (białko budujące rzęski) [33].

W zależności od tego czy w pierwszym etapie zastosujemy specyficzne przeciwciała sprzęgnięte z enzymem czy też użyjemy przeciwciał skierowanych przeciwko antygenowi (kompleks antygen-przeciwciało), a dopiero w drugim etapie przeciwciał sprzęgniętych z enzymem, możemy wyróżnić dwa typy testu ELISA: bezpośredni lub pośredni. W obu przypadkach, w kolejnym etapie dodaje się roztwór substratu. W wyniku rozkładu substratu przez enzym następuje zmiana barwy roztworu, która może być obserwowana gołym okiem. Zwykle jednak stosuje się czytniki pozwalające na spektrofotometryczny pomiar absorpcji światła, a tym samym wykrycie i ilościowe oznaczenie poziomu antygenu.

Przykładem testu typu pośredniego jest DAS-ELISA (ang. Double Antibody Sandwich – DAS). W pierwszym etapie na płytce umieszcza się specyficzne przeciwciała, a następnie nanosi się zawiesinę badanego szczepu bakteryjnego. W kolejnym etapie testu DAS-ELISA stosuje się specyficzne przeciwciała połączone z enzymem. W ten sposób powstaje konjugat przeciwciało-antygen-przeciwciało-enzym. Wykrycie i identyfikacja bakterii następuje po dodaniu substratu i przeprowadzeniu reakcji enzymatycznej.

Oprócz opisanych testów ELISA wykorzystuje się inne modyfikacje tej metody, jak: „dot-blot ELISA" lub „ELISA reverse blot", „TAS-ELISA" (ang. Triple Antibody Sandwich) czy "Immunoprinting-ELISA" (IP-ELISA) [5].

Do wykrywania i identyfikacji szczepów bakterii z podgatunku *E. c.* subsp. *atroseptica* oraz *E. c.* subsp. *carotovora* z zastosowaniem testu ELISA wykorzystywano przeciwciała monoklonalne [23] oraz poliklonalne [2]. Do identyfikacji ponad 862 polskich szczepów *E. c.* subsp. *atroseptica* zastosowano test indirect ELISA z przeciwciałami monoklonalnymi (Plant Diagnostics, Spain) reagującymi z serogrupą I.

Otrzymane wyniki wskazały, że 65% badanej kolekcji izolatów zidentyfikowanych jako bakterie *E. c.* subsp. *atroseptica* reprezentuje serogrupę I. Stwierdzono także nieznacznie wyższy udział bakterii *E. c.* subsp. *atroseptica*, należących do serogrupy I w przypadku bakterii izolowanych z bulw (72%) w porównaniu z izolatami pochodzącymi z łodyg ziemniaka (63%) [57].

Niewątpliwą zaletą testu ELISA jest możliwość wykrycia i zidentyfikowania patogena bez wcześniejszej izolacji, to znaczy bezpośrednio w homogenacie tkanki roślinnej, w wyciągu glebowym lub w wodzie. Zaletą jest także możliwość zbadania na jednej płytce typu ELISA dużej liczby prób. Wadą testu ELISA jest niska czułość. Testy te pozwalają na wykrycie bakterii jeżeli ich ilość jest większa niż 10^3– 10^6 j.t.k. w jednym gramie badanego materiału biologicznego (w zależności od jakości przeciwciał) [28]. Podjęto próby podwyższenia czułości testu ELISA poprzez zastosowanie wstępnej inkubacji badanych prób na selektywnych dla określonego patogena podłożach przed wykonaniem testu – ang. Enrichment ELISA. Pozwoliło to na zwiększenie czułości testu, a wykrycie komórek bakterii z podgatunku *E. c.* subsp. *atroseptica* możliwe było w przypadku obecności około 10^2 j.t.k. w 1 ml badanej próby [36]. Istotną wadą testu ELISA jest fakt, iż nie pozwala na odróżnienie żywych i martwych komórek patogena.

Metody immunofluorescencyjne. Metody immunofluorescencyjne (ang. Immunofluorescent method – IF) polegają na znakowaniu komórek patogena specyficznymi przeciwciałami sprzężonymi ze związkami fluorescencyjnymi (ang. Immunofluorescence Antibody Staining – IFAS). Najczęściej do znakowania przeciwciał stosuje się izotiocyjanian fluoresceiny (ang. Fluorescein Isothiocyanate – FITC). Komórki bakteryjne obserwuje się pod mikroskopem jako obiekty emitujące światło fluorescencyjne koloru zielonożółtego. Tak jak w przypadku testu ELISA, rozróżnia się dwa typy metody, tj. bezpośredni – IFAS i pośredni – IFAS. Metodę IFAS wykorzystano w wykrywaniu i identyfikacji m.in. bakterii z podgatunku *E. c.* subsp. *atroseptica* [41].

Do tej grupy metod zalicza się także immunofluorescencyjne barwienie kolonii (ang. Immunofluorescence Colony Staining – IFC) [66]. Metoda ta polega na hodowli bakterii wysiewanych z homogenatu zainfekowanej tkanki roślinnej na podłożu stałym, a następnie znakowaniu kolonii bakteryjnych barwnikami fluorescencyjnymi sprzężonymi ze specyficznymi przeciwciałami. Metoda IFC została wykorzystana do identyfikacji bakterii z podgatunku *E. c.* subsp. *atroseptica* [31, 67]. W obu pracach poziom wykrywalności bakterii tą techniką określono na około 10^2 j.t.k. w 1 ml. Jednak jak wynika z danych Van der Wolfa i in. [64] identyfikacja bakterii z podgatunku *E. c.* subsp. *atroseptica* przy użyciu metody IFC powinna być weryfikowana ze względu na możliwość zachodzenia tzw. reakcji krzyżowych (wiązania się przeciwciał z antygenami obecnymi na powierzchni komórek innych gatunków bakterii).

Ponadto do wykrywania i identyfikacji z zastosowaniem metod serologicznych wykorzystuje się: zmodyfikowane testy aglutynacyjne [43], immunodyfuzję [13], podwójną immunodyfuzję [11] oraz metodę separacji bakterii z zastosowaniem spe-

cyficznych przeciwciał utrwalonych na płytce Petriego (ang. Immunosorbent Dilution Plating – ISDP) [20, 64].

Główną wadą metod serologicznych oprócz często zbyt niskiej czułości jest występowanie reakcji krzyżowych pomiędzy przeciwciałami i bakteriami saprofitycznymi obecnymi w badanych próbach. Powszechne stosowanie przeciwciał poliklonalnych do wykrywania i identyfikacji patogenów obniża specyficzność metod serologicznych [3]. Z kolei wadą przeciwciał monoklonalnych może być zjawisko zbyt wysokiej specyficzności która powoduje, iż przeciwciała mogą reagować tylko z niektórymi szczepami bakterii należącymi do tego samego gatunku czy podgatunku [2].

Metody molekularne

W wykrywaniu i identyfikacji patogenów roślin coraz częściej wykorzystuje się metody molekularne opierające się na badaniu kwasów nukleinowych [12, 20, 30, 38, 52]. Badania te polegają na poszukiwaniu podobieństw i różnic (badanie heterogeniczności) w budowie poszczególnych genów lub pewnych grup genów. W identyfikacji wykorzystuje się geny kodujące, np. syntezę izoenzymów, sekwencje kwasów nukleinowych charakterystycznych (specyficznych) dla określonych gatunków czy podgatunków patogena, markery molekularne lub tzw. sondy molekularne umożliwiające szybką i efektywną identyfikację patogena. Efektywna identyfikacja patogennych organizmów często zależy od techniki pobierania zainfekowanego materiału i oczyszczania kwasów nukleinowych patogena [34]. Molekularne metody służące do wykrywania i identyfikacji oraz różnicowania czynników patogennych można podzielić na trzy główne grupy: techniki oparte na hybrydyzacji kwasów nukleinowych, trawieniu DNA endonukleazami restrykcyjnymi i amplifikacji kwasów nukleinowych. Opracowywane są nowe metody molekularne będące połączeniem technik molekularnych i technik serologicznych czy enzymatycznych w celu zwiększenia poziomu specyficzności i czułości.

Hybrydyzacja kwasów nukleinowych. Metoda hybrydyzacji polega na wykorzystaniu sond molekularnych (sond hybrydyzacyjnych), czyli fragmentów kwasów nukleinowych znakowanych izotopowo lub coraz częściej związkami fluorescencyjnymi oraz enzymami. W pierwszym etapie przeprowadza się izolację kwasów nukleinowych patogena. Natywne lub poddane trawieniu enzymami restrykcyjnymi kwasy nukleinowe rozdziela się z zastosowaniem elektroforezy agarozowej lub poliakryloamidowej, a następnie przenosi się na filtry nylonowe lub nitrocelulozowe. Filtry te umieszcza się w roztworze zawierającym znakowane sondy molekularne, które hybrydyzują z sekwencjami komplementarnymi obecnymi w badanych fragmentach kwasów nukleinowych patogena. Hybrydyzacja może zachodzić pomiędzy cząstkami DNA i DNA, RNA i RNA lub DNA i RNA [20]. Jeśli z filtrem związana jest cząsteczka DNA, hybrydyzację określa się jako typu „Southern", natomiast jeśli RNA jest to typ „Northern" [52, 56]. Po wypłukaniu nadmiaru sondy molekularnej prze-

prowadza się autoradiografię (w przypadku sond znakowanych izotopowo), bądź analizuje filtry celulozowe w świetle UV (w przypadku sond znakowanych fluorescencyjnie) lub obserwuje się reakcję barwną katalizowaną przez enzym (sondy molekularne sprzężone z enzymem).

W wykrywaniu mikroorganizmów chorobotwórczych roślin uprawnych stosuje się także różne modyfikacje opisanej powyżej klasycznej metody hybrydyzacji. Jedną z nich jest hybrydyzacja *in situ* (ang. Genomic *in situ* Hybridization – GISH), w której wykorzystuje się specyficzne krótkie sondy molekularne znakowane związkiem fluorescencyjnym (ang. Fluorescent in situ Hybridization – FISH), składające się z około 30 oligonukleotydów komplementarnych do sekwencji genów kodujących 16S i 23S rRNA. Sondy te ze względu na swoją wielkość mogą łatwo dyfundować przez membrany i ściany komórkowe mikroorganizmów, a następnie hybrydyzować z komplementarnymi sekwencjami kwasów nukleinowych patogena. Obecność patogena w preparatach przygotowanych z homogenizowanej tkanki roślinnej lub ekstraktu glebowego można wykrywać przy zastosowaniu mikroskopu fluorescencyjnego.

Inną modyfikacją jest metoda hybrydyzacji kolonii (ang. Colony Blotting) wykorzystywana do identyfikacji lub różnicowania czystych kultur patogenów wyizolowanych z badanego materiału roślinnego, glebowego lub wody. Bakteryjne patogeny wysiewa się na podłoża mikrobiologiczne, a następnie otrzymane kolonie przenosi się na filtry nitrocelulozowe lub nylonowe wykonując tzw. replikę płytki. Kolejnym etapem jest utrwalanie kolonii bakteryjnych na filtrach, przeprowadzenie lizy komórek oraz denaturacja DNA *in situ*. Następnie prowadzi się hybrydyzację znakowanych sond molekularnych z kwasami nukleinowymi utrwalonymi na filtrze. Ostatni etap to wykonanie np. autoradiografii lub badanie fluorescencji, która pozwala na identyfikację patogena w badanym materiale.

Metody opierające się na hybrydyzacji kwasów nukleinowych znalazły zastosowanie w badaniu genomowego DNA w celu określenia charakterystycznych (specyficznych) regionów m.in. bakterii z gatunku *E. carotovora*. Informacje tego rodzaju wykorzystano do opracowania specyficznych starterów stosowanych w reakcji amplifikacji do identyfikacji bakterii *E. c.* subsp. *atroseptica* [71, 72]. Metodę hybrydyzacji DNA-DNA wykorzystano także do porównania i opisania pokrewieństwa pomiędzy szczepami należącymi do *E. carotovora* (subspecies *atroseptica*, *betavasculorum*, *carotovora*, *odoriferum* i *wasabiae*) i oraz *E. chrysanthemi*, *E. cacticidum* i *Brenneria paradisiaca* [22]. Wadą metod hybrydyzacyjnych, szczególnie w przypadku ich wykorzystania do badania zróżnicowania szczepów, może być ich niepełna specyficzność związana z faktem, iż proces hybrydyzacji może czasami zachodzić nawet przy częściowej komplementarności nukleotydów.

Reakcja łańcuchowa polimerazy (ang. Polymerase Chain Reaction – PCR, PCR–based) i jej modyfikacje. Jedną z podstawowych metod molekularnych stosowanych do identyfikacji lub różnicowania fitopatogenów jest PCR oraz różne modyfikacje tej metody. Metoda PCR polega na powielaniu (amplifikacji) wybranych, za-

zwyczaj specyficznych fragmentów DNA, o przewidywanej długości, w warunkach *in vitro* [53] lub *in situ* [59]. Trzeba dysponować: wyizolowanym tzw. matrycowym DNA lub próbą zawierającą materiał genetyczny czynnika patogennego (ekstrakt roślinny, glebowy, woda) oraz dwoma najlepiej specyficznymi oligonukleotydami – starterami (ang. primers), które zapoczątkują powielanie sekwencji nukleotydowych amplifikowanego odcinka DNA. Czasami do mieszaniny amplifikacyjnej dodawany jest glicerol lub inne związki niwelujące działanie inhibitorów polimerazy obecnych w ekstraktach z tkanek roślinnych i gleby. Jak podaje De Boer i in. [15] związek BLOTTO dodany do mieszaniny amplifikacyjnej skutecznie niwelował działanie inhibitorów podczas wykrywania bakterii z podgatunku *E. c.* subsp. *atroseptica* w homogenacie z bulw ziemniaka.

Stosowanie metody PCR do identyfikacji patogenów wymaga wcześniejszej znajomości specyficznych, unikatowych dla gatunku lub nawet podgatunku sekwencji DNA. Sekwencje starterów stosowanych w identyfikacji patogenów roślin projektuje się wykorzystując różne grupy genów, np. kodujące biosyntezę charakterystycznych enzymów (liazy kwasu poligalakturonowego) czy strukturalne podjednostki rybosomów 16S i 23S rRNA lub ITS (ang. Intergenic Transcribed Spacer region). Metodę PCR zastosowano do identyfikacji patogenów roślin m.in. takich jak *E. carotovora* [62], *E. c.* subsp. *atroseptica* [12], *E. c.* subsp. *carotovora* [74], *E. chrysanthemi* [29].

Metoda PCR-RFLP (PCR-RFLP została opisana w dalszej części pracy) zastosowana do identyfikacji bakterii z gatunku *E. carotovora* została oparta m.in. na sekwencji genu z rodziny *pelY* [7, 57], a bakterii z gatunku *E. chrysanthemi* na sekwencjach genów *pelA*, *pelD* i *pelE* [44] lub *pelL* [29], kodujących liazy kwasu poligalakturonowego. Analiza PCR-RFLP polimorfizmu genu *recA*, pozwoliła na opracowanie metody umożliwiającej identyfikację szeregu gatunków z rodzaju *Erwinia* i wszystkich podgatunków z gatunku *Erwinia carotovora* [70].

W celu identyfikacji różnych gatunków bakterii z rodzaju *Erwinia*, Toth i in. [60], zastosowali metodę ITS-PCR-RFLP (ang. Intergenic Transcribed Space region) opartą na analizie restrykcyjnej amplifikowanych regionów zlokalizowanych pomiędzy genami kodującymi 16 i 23S rDNA. Metoda ta nie pozwoliła jednak na odróżnienie bakterii *E. c.* subsp. *atroseptica* i *E. c.* subsp. *carotovora*.

Modyfikacją klasycznej metody PCR jest „multiplex PCR". Technika ta polega na zastosowaniu w tej samej mieszaninie amplifikacyjnej dwóch (lub więcej) par starterów specyficznych dla dwóch patogenów należących do różnych gatunków lub podgatunków. W takim przypadku możliwa jest jednoczesna identyfikacja różnych patogenów w badanym materiale (uzyskanie dwóch lub więcej produktów amplifikacji). „Multiplex PCR" można też wykorzystać do wykrywania i identyfikacji bakterii w obrębie jednego gatunku *E. carotovora* [57].

Metoda PCR jest jedną z najszybszych technik identyfikacji patogena, a jednocześnie jest metodą specyficzną i bardzo czułą. Pozwala na wykrywanie około 10^2 j.t.k. w 1 ml próby. Natomiast metoda PCR w połączeniu z tzw. preinkubacją bakterii na

podłożach mikrobiologicznych tzw. „wzbogacony" PCR (ang. Enrichment PCR, E-PCR lub BIO-PCR) pozwala na wykrycie jeszcze mniejszej liczby mikroorganizmów w badanej próbie – od 30 do 70 j.t.k. w 1 ml [36]. Zwiększenie czułości metody PCR można również uzyskać poprzez zastosowanie „wewnętrznego" („zagnieżdżonego") PCR (ang. Nested PCR). Nested PCR polega na wykorzystaniu kolejno dwóch par starterów. Pierwsza para (zazwyczaj o niezbyt wysokiej specyficzności) pozwala na amplifikację dłuższego fragmentu DNA. W kolejnym etapie stosuje się drugą parę starterów amplifikujących krótszy fragment powstałej wcześniej nici DNA. Wykrywanie i identyfikację z zastosowaniem Nested PCR prowadzono m.in. dla *E. amylovora*.

Czułość metody PCR można także zwiększyć stosując w pierwszym etapie technikę określaną jako „magnetic capture". Polega ona na specyficznym wychwytywaniu z zawiesin wodnych lub ekstraktów roślinnych, całych komórek patogena za pomocą przeciwciał sprzęgniętych z czynnikami żelazowymi (ang. immunomagnetic separation – IMS) lub wychwytywaniu DNA patogena poprzez stosowanie sond molekularnych związanych z czynnikami magnetycznymi. Następnie uzyskany materiał wykorzystuje się w teście PCR. Zaletą stosowania tej techniki jest możliwość wyeliminowania zawartych w ekstraktach tkankowych inhibitorów reakcji amplifikacji w pierwszym etapie testu. Technikę „magnetic capture" wykorzystano w wykrywaniu bakterii *Ralstonia solanacearum* i *E. c.* subsp. *atroseptica* [19, 64].

Zastosowanie klasycznej metody PCR daje możliwość szybkiego wykrycia patogena, ale liczba komórek bakterii w badanej próbie jest nieokreślona. Modyfikacją metody PCR mającą na celu nie tylko wykrycie, identyfikację patogena, ale także określenie liczby j.t.k. lub ilość DNA patogena jest „ilościowy" PCR (ang. Quantitative PCR – Q-PCR). Technika Q-PCR została opracowana dla bakterii z podgatunku *E. c.* subsp. *atroseptica* [27]. Polega na dodaniu do badanego ekstraktu tkankowego, znanej liczby komórek bakterii z gatunku *E. coli* zawierających plazmid z wklonowanym fragmentem DNA specyficznym dla podgatunku *E. c.* subsp. *atroseptica*. Plazmid ten określa się jako tzw. „plazmid współzawodniczący". Do identyfikacji patogena stosuje się jedną parę starterów specyficznych dla bakterii z podgatunku *E. c.* subsp. *atroseptica*. Produkt PCR amplifikowany na plazmidowym „współzawodniczącym" DNA jest krótszy o około 100 pz od produktu głównego powielanego na DNA genomowym patogena, fakt ten umożliwia łatwe ich odróżnienie. Technika Q-PCR pozwala na określenie liczby j.t.k. bakterii w badanej próbie (w przedziale od 10^2–10^5 j.t.k. w 1 ml) poprzez porównanie ilości DNA amplifikowanego na bazie obu matryc z zastosowaniem elektroforezy agarozowej [27].

Na podstawie danych literaturowych można stwierdzić, iż metody oparte na reakcji PCR nie pozwalają na odróżnienie komórek martwych i żywych. Jakkolwiek są doniesienia, iż wolne DNA jest degradowane w środowisku w okresie około 3 dni to inni badacze wykazali obecność w glebie, wolnego niezdegradowanego DNA bakteryjnego

jeszcze po 5 miesiącach od wprowadzenia. Kolejną wadą metody, PCR jest możliwość uzyskania fałszywie pozytywnych wyników w przypadku kontaminacji prób.

Zestawy diagnostyczne oparte na metodzie PCR. Techniki molekularne wykorzystywane do wykrywania i identyfikacji patogenów roślin są szybsze, bardziej specyficzne i czulsze niż klasyczne metody mikrobiologiczne lub serologiczne. Jednak dość wysokie koszty (komercyjne użycie techniki PCR jest objęte ochroną patentową) i potrzeba wykonywania oznaczeń przez wykwalifikowany personel przyczynia się do ograniczenia zastosowania metod molekularnych w masowej diagnostyce chorób roślin. Jedyną z metod bazujących na technice PCR jest zestaw komercyjny Probelia™ do wykrywania bakterii z podgatunku *E. c.* subsp. *atroseptica* [21]. Powielony metodą PCR, poddaje się hybrydyzacji z sondą utrwaloną w studzienkach płytek typu ELISA. Sonda jest skonstruowana w ten sposób, aby jej wolny koniec był komplementarny tylko do jednego z końców zamplifikowanego fragmentu. Następny etap to hybrydyzacja drugiej sondy molekularnej, posiadającej sekwencje komplementarne do drugiego końca zamplifikowanego fragmentu DNA i sprzężonej z peroksydazą. Dodanie do mieszaniny reakcyjnej substratu – tetrametylobenzydyny, powoduje zmianę zabarwienia mieszaniny reakcyjnej. Odczyt wyniku następuje poprzez pomiar absorpcji światła badanej mieszaniny w czytniku do testu ELISA.

Identyfikacja bakterii z podgatunku *E. c.* subsp. *atroseptica* tą metodą nie wymaga izolacji DNA z czystych kultur bakterii, oznaczenia można wykonywać bezpośrednio z homogenatu zakażonej tkanki. Zastosowanie sond molekularnych zwiększa czułość metody, co oznacza możliwość wykrycia nawet bardzo małych ilości amplifikowanych fragmentów DNA. Zaletą tej metody jest również fakt, iż można dokonać odczytu ilościowego bez potrzeby wykonywania elektroforezy w celu wykrycia powielanego produktu.

Badanie zróżnicowania szczepów bakteryjnych należących do gatunku *E. carotovora*

Metody pozwalające na badanie zróżnicowania pomiędzy szczepami można podzielić na biologiczne i molekularne.

Metody biologiczne

Do metod biologicznych można zaliczyć testy, w których bada się właściwości biochemiczno-fizjologiczne badanych szczepów: wzrost na tzw. szeregach biochemicznych w wybranych podłożach mikrobiologicznych oraz testy patogeniczności prowadzone na różnych gatunkach roślin. Testy tego typu omówiono w poprzednim rozdziale.

Kolejną metodą jest typowanie bakteriofagami (ang. Phage Typing). Pierwszym etapem jest selekcja bakteriofagów specyficznych dla danego gatunku lub nawet podgatunku bakterii, tj. takich które będą powodować lizę komórek należących do określonych grup taksonomicznych. Następnie badane szczepy bakterii infekuje się szczepami bakteriofagów. Przykładem może być bakteriofag ϕM1 wykorzystywany w genetycznej analizie bakterii z podgatunku *E. c.* subsp. *atroseptica* [63]. Technikę typowania bakteriofagami zastosowano do badania zróżnicowania kilkudziesięciu szczepów bakterii z podgatunku *E. c.* subsp. *atroseptica* należących do serogrupy I. Toth i in. [61], zastosowali do badania zróżnicowania kolekcji bakterii *E. c.* subsp. *atroseptica* izolowanych z terenu Europy Zachodniej test opierający się na wykorzystaniu 22 szczepów bakteriofagów. Około 59% szczepów posiadało indywidualny profil bakteriofagowy, a szczepy reprezentujące grupę inną niż serogrup I w większości przypadków nie były wrażliwe na stosowane bakteriofagi. Analiza profili pozwoliła na podzielenie szczepów *E. c.* subsp. *atroseptica* na dwie główne grupy, w obrębie których niezgodność wyniosła około 62%.

Natomiast Gross i in. [24] zastosowali 14 szczepów bakteriofagów do przebadania populacji 275 szczepów z podgatunku *E. c.* subsp. *carotovora* reprezentujących różne serogrupy oraz 114 szczepów z podgatunku *E. c.* subsp. *atroseptica* należących do serogrupy I. W tym przypadku populacja bakterii *E. c.* subsp. *atroseptica* wykazała znaczną homogenność, gdyż około 82% szczepów reagowało identycznie z zastosowanymi bakteriofagami.

Podobne badania przeprowadzono na 157 szczepach bakterii *E. c.* subsp. *atroseptica* należących do serogrupy I i izolowanych z roślin i bulw ziemniaka w Polsce [57]. Do testu wykorzystano 20 szczepów bakteriofagów opisanych jako specyficzne dla *E. c.* subsp. *atroseptica* i wyizolowanych przez Toth i in. [63]. W efekcie analizy wyników uzyskano 69 charakterystycznych profili bakteriofagowych. Około 30% przebadanej kolekcji posiadało charakterystyczny i unikalny profil bakteriofagowy.

Typowanie bakteriofagami pozwala na opisanie zróżnicowania badanych populacji bakterii pod warunkiem dysponowania ich jednorodnymi kulturami, jest też wymagane posiadanie kolekcji bakteriofagów zdolnych do lizy komórek bakteryjnych określonego gatunku lub podgatunku.

Metody molekularne

Metody te stosuje się do badania różnicowania populacji, w przypadku której dysponujemy czystymi jednorodnymi kulturami bakteryjnymi.

Badanie sekwencji repetytywnych. W DNA organizmów prokariotycznych i eukariotycznych występują sekwencje repetytywne (powtarzalne), które wykorzystano do badania zróżnicowania genetycznego patogenów roślin metodą rep-PCR (powtarzalne pozagenowe sekwencje palindromiczne ang. Repetitive Extragenic Palindromic Sequence – PCR) [68]. Wśród ewolucyjnie konserwowanych sekwencji repe-

tytywnych rozrzuconych po całym genomie wyróżnia się sekwencje typu: BOX – boxA (57 pz), boxB (43 pz) i boxC (50 pz) [42], powtarzalne międzygenowe sekwencje, o długości około 124–127 pz, charakterystyczne dla bakterii z rodziny *Enterobacteriaceae* ang. Enterobacterial Repetitive Intergenic Consensus lub Intergenic Repeat Units ERIC (IRUs) [55, 68] i REP (PUs) – (ang. palindromic units) długości około 38 pz [26, 68]. Startery komplementarne do sekwencji repetytywnych powielają różnej długości fragmenty DNA. Po przeprowadzeniu rozdziału elektroforetycznego powielonych produktów uzyskuje się różne profile genetyczne (ang. DNA fingerprinting) dla poszczególnych szczepów bakterii.

Badania zróżnicowania genetycznego bakterii *E. c.* subsp. *atroseptica* z zastosowaniem starterów komplementarnych do sekwencji repetytywnych typu ERIC wskazały, iż badane mikroorganizmy należały do trzech grup genetycznych, wśród których jedna była reprezentowana aż przez około 77% badanej populacji [61]. Zdaniem Toth i in. [61], pomimo wspomnianej możliwości wykorzystania metody ERIC do odróżnienia dwóch podgatunków bakterii *E. c.* subsp. *atroseptica* i *E. c.* subsp. *carotovora*, technika ta nie jest wystarczająca do badania zróżnicowania genetycznego bakterii *E. c.* subsp. *atroseptica* ze względu na niewielkie różnice pomiędzy poszczególnymi profilami.

Badania z użyciem testu ERIC-PCR wykonano także dla 128 polskich izolatów *E. c.* subsp. *atroseptica* pochodzących z kolekcji Zakładu Ochrony i Biotechnologii Roślin, Międzyuczelnianego Wydziału Biotechnologii UG i AMG w Gdańsku (ZOBR) [57]. W tym przypadku wyróżniono 37 profili ERIC charakterystycznych dla badanego podgatunku bakterii. Metoda ERIC-PCR jakkolwiek pozwala na obserwację zróżnicowania genetycznego w obrębie *E. c.* subsp. *atroseptica* to jednak ze względu na potrzebę analizy licznych produktów PCR (nie zawsze łatwych do zaobserwowania) jest trudnym do zastosowania narzędziem w opisywaniu genetycznej zmienności izolatów reprezentujących ten podgatunek. Należy także podkreślić, iż nowoczesne i bardzo zaawansowane komercyjne programy komputerowe do analizy profili genetycznych są narzędziem ułatwiającym stosowanie omawianej metody. Poważnym jednak ograniczeniem jest wysoka cena takiego oprogramowania.

Reakcja łańcuchowa polimerazy z arbitralnie wybranymi starterami (ang. Random Amplified Polymorphic DNA – RAPD, Random Primed PCR), (ang. Arbitrarily Primed PCR – AP-PCR) i (ang. DNA Amplification Fingerprinting – DAF). W metodzie RAPD wykorzystuje się krótkie, zazwyczaj 10-cio nukleotydowe startery o losowych sekwencjach [73]. Stosując metodę RAPD do zbadania zróżnicowania genetycznego szczepów należących do określonych gatunków czy podgatunków musimy koniecznie dysponować DNA wyizolowanym z czystych kultur patogena. Technika RAPD nie wymaga natomiast posiadania szczegółowych informacji na temat sekwencji DNA badanego mikroorganizmu, ponieważ stosowane startery są z definicji przypadkowe. Zastosowanie bardzo krótkich starterów pozwala na przyłączanie startera do sekwencji komplementarnych w obrębie całego genomu. W meto-

dzie RAPD stosuje się pojedyncze startery, które powielają odcinki DNA posiadające końce komplementarne do zastosowanego startera.

W reakcji typu AP-PCR stosowane są nieco dłuższe startery (około 20 pz). Profil powielanych produktów jest bardziej skomplikowany niż uzyskiwany w metodzie RAPD. Pierwsze cykle reakcji charakteryzują się niską temperaturą wiązania starterów lub wysokim stężeniem jonów magnezu. W tych warunkach dochodzi do przyłączania się starterów do dużej liczby komplementarnych do nich sekwencji, a następnie powielenia odcinków między przyłączonymi starterami. Po podwyższeniu temperatury wiązania starterów w kolejnych cyklach, następuje amplifikacja produktów uzyskanych w wyniku pierwszych cykli.

Trzecim typem metody jest reakcja DAF. W reakcji typu DAF przy niskiej temperaturze wiązania stosowany jest krótki starter (5–8 pz) w stężeniach 10-krotnie wyższych niż w technikach RAPD i AP-PCR, a stopień skomplikowania profilu jest bardzo wysoki.

Różne odmiany opisanych powyżej strategii powielania fragmentów DNA ze względu na wielokrotną i przypadkową naturę miejsc docelowych dla starterów i amplifikację szeregu produktów określa się mianem Multiple Arbitrary Amplicon Profiling – MAAP. Metody MAAP zastosowano do różnicowania patogenów z podgatunku: *E. c.* subsp. *atroseptica* i *E. c.* subsp. *carotovora* [40, 45]. Maki-Valkama i Karjalainen [40], po zastosowaniu tej techniki do badania zróżnicowania genetycznego szczepów *E. c.* subsp. *atroseptica* wyizolowanych z terenu Finlandii stwierdzili, iż zróżnicowanie genetyczne badanej populacji jest znaczne. Metoda RAPD z starterami OPB-07, OBP-11 i 91300 (startery komercyjne, Operon Co.) została również zastosowana przez Toth i in. [61], do badania zróżnicowania genetycznego izolatów *E. c.* subsp. *atroseptica* izolowanych w krajach Europy zachodniej, także ci badacze stwierdzili duże zróżnicowanie badanej populacji bakterii. W przypadku badań przeprowadzonych w Polsce największe zróżnicowanie polskich izolatów *E. c.* subsp. *atroseptica* otrzymano w wyniku reakcji PCR z zastosowaniem startera OPB-07 [57].

Analiza restrykcyjna produktów reakcji łańcuchowej polimerazy (ang. Polymerase Chain Reaction- Restriction Fragment Length Polymorphism – PCR-RFLP lub Cleaved Amplified Polymorphic Sequences – CAPS. PCR-RFLP łączy dwie techniki: powielanie fragmentu DNA, a następnie trawienie kilkoma enzymami restrykcyjnymi. Wzór otrzymany po elektroforezie uzyskanych produktów amplifikacji pozwala na identyfikację patogena oraz zbadanie zróżnicowania w obrębie amplifikowanego fragmentu DNA.

Metodę PCR-RFLP zastosowano w celu zbadania zróżnicowania genetycznego 198 szczepów *E. c.* subsp. *atroseptica* wyizolowanych z terenu Polski [57]. W pierwszym etapie powielano fragment genu z rodziny *pelY*, kodującego liazę kwasu poligalakturonowego, a następnie uzyskany produkt trawiono czterema enzymami restrykcyjnymi: *AluI*, *HaeII*, *HpaII*, *Sau*3aI. Analiza otrzymanych wyników pozwoliła na zakwalifikowanie szczepów do dwóch grup charakteryzujących się odmiennymi profi-

lami restrykcyjnymi. Darrasse i in. [7], którzy przebadali populację 32 szczepów *E. c.* subsp. *atroseptica* pochodzących z Francji, Holandii, Niemiec, Peru, Szwajcarii, USA i Wielkiej Brytanii także stwierdzili, iż należą one do dwóch grup RFLP. Stwierdzono, że w obu badanych populacjach występowały nie tylko te same grupy RFLP, ale profil I był dominujący i charakterystyczny dla prawie 80% badanych izolatów[57].

Analiza wyników uzyskanych metodą PCR-RFLP sugeruje, iż bakterie *E. c.* subsp. *atroseptica* stanowią grupę mało zróżnicowaną. Należy podkreślić, iż badania polimorfizmu fragmentu genu *rec*A kodującego rekombinazę, również wykazały występowanie tylko dwóch specyficznych grup RFLP w populacji bakterii z tego podgatunku [70]. Natomiast *E. c.* subsp. *carotovora* i gatunek *E. chrysanthemi* charakteryzowały się dużą zmiennością sekwencji genu *rec*A, w przypadku *E. c.* subsp. *carotovora* wyróżniono 18 profili restrykcyjnych, a w przypadku *E. chrysanthemi* 15 charakterystycznych profili PCR-RFLP [70].

Amplifikacja fragmentów restrykcyjnych (ang. Amplified Fragment Length Polymorphism – AFLP; Selektywna amplifikacja fragmentów restrykcyjnych – ang. Selective Restriction Fragment Amplification – SFRA). W pierwszym etapie DNA trawione jest dwoma enzymami restrykcyjnymi: pierwszym trawiącym z dużą i drugim – z małą częstotliwością. Następnie do uzyskanych fragmentów DNA dołącza się (proces ligacji) tzw. adaptery czyli dwu-niciowe DNA, zawierające sekwencję rdzeniową i sekwencję nukleotydów rozpoznawanych przez daną restryktazę. W oparciu o sekwencje adapterów projektuje się startery powielające fragmenty DNA. Kolejnym etapem metody AFLP jest powielanie DNA z użyciem zaprojektowanych starterów [69].

W metodzie AFLP ilość powielanych fragmentów zależy zarówno od właściwości badanego genomu jak również od zastosowanych enzymów restrykcyjnych i liczby nukleotydów w części selekcyjnej starterów (im więcej nukleotydów, tym mniej powielanych fragmentów i tym samym większa specyficzność testu).

Metoda znalazła zastosowanie m.in. w badaniu zróżnicowania genetycznego *E. carotovora* [16]. Do badań użyto cDNA szczepów *E. c.* subsp. *atroseptica* i *E. c.* subsp. *carotovora*.

Podsumowanie i perspektywy

Z przeprowadzonego w niniejszej pracy przeglądu metod służących do wykrywania, identyfikacji i badania metod zróżnicowania genetycznego *E. carotovora* wynika, iż w chwili obecnej dysponujemy szeroką gamą metod immunologicznych i molekularnych pozwalających na wykonanie tych zadań. Dobór metody zależy od celu badań i wymaganej specyficzności i czułości wyników. Lepsze poznanie zróżnicowania bakterii z obrębie danej populacji pozwala na zastosowanie prostszych metod do wy-

krywania bakterii. W krajach, w których, ponad 90% stanowi serogrupa I *E. c.* subsp. *atroseptica*, test ELISA z przeciwciałami specyficznymi dla tej serogupy jest testem spełniającym oczekiwania producentów ziemniaków. W Polsce do wykrywania tego podgatunku niezbędne jest zastosowanie testów serologicznych z dodatkowymi przeciwciałami bądź metod opartych na reakcji PCR ze starterami specyficznymi dla podgatunku *E. c.* subsp. *atroseptica* [70].

Obecnie do wykrywania i identyfikacji patogenów roślin opracowuje się nowe wersje testów serologicznych w formie paska nitrocelulozowego, na powierzchni którego umieszcza się specyficzne przeciwciała mono- lub poliklonalne [8, 20]. Opracowane i skomercjalizowane przez Central Science Laboratory (York, UK) oprzyrządowanie pozwala na przeprowadzenie badania bezpośrednio na polu uprawnym. Dostępnych jest kilka zmodyfikowanych i uproszczonych komercyjnych testów określanych ogólnie jako ang. Lateral-Flow Assays/Devices (LFD) czy ang. Rapid Immunofilter Paper Assays (RIPA). Testy te opracowano przede wszystkim do identyfikacji wirusowych patogenów roślin [8]. Komercyjne testy LFD opracowano także dla bakterii z gatunku *R. solanacearum* i *Xanthomonas* sp. (www.pdiag.cls.gov.uk).

Testem, który może być wykorzystywany w masowym wykrywaniu i identyfikacji patogenów jest PCR w czasie rzeczywistym (ang. Real-Time PCR, Fluorogenic PCR). Technika ta polega na hybrydyzacji amplifikowanego DNA z sondą molekularną połączoną z barwnikiem. TaqMan PCR zastosowano już do identyfikacji bakterii z gatunku *R. solanacearum* w ekstrakcie z ziemniaków, a czułość testu określono na 10^2 j.t.k. w 1 ml [61]. Obecnie realizowany jest projekt Port Check, w którym uczestniczy także zespół, zmierzający do wykorzystania przenośnego aparatu do Real-Time PCR do wykonywania testów bezpośrednio w polu (www.portcheck.eu.com).

Nowe możliwości stwarza coraz częściej stosowana cytometria przepływowa (ang. Flow Cytometry – FCM), bazująca na zastosowaniu związków fluorescencyjnych i specyficznych przeciwciał do wykrywania i identyfikacji patogenów roślin. Metoda ta pozwala na odróżnianie żywych i martwych komórek bakterii, a także wykrywanie infekcji latentnych, czyli wykrywanie żywych komórek, które w danej chwili nie dzielą się, bądź dzielą się bardzo wolno, a w efekcie nie powodują objawów chorobowych [50]. Metoda FCM z zastosowaniem specyficznych przeciwciał monoklonalnych znalazła zastosowanie w identyfikacji *X. c.* pv. *campestris*, *R. solanacearum* [6, 65].

Precyzyjne wykrywanie patogenów roślin stwarza technologia określana jako ang. Microarray technology (Microchips) [39]. Polega ona na zastosowaniu różnego rodzaju mikropłytek – nośników takich jak: membrany nylonowe (ang. Nylon Membrane), szklane płytki (ang. Glass slide) czy specjalnie skonstruowane podłoża (ang. Porus Metal Oxide), na powierzchni których immobilizowane są specyficzne oligonukleotydy (od kilkuset do około miliona na 1 cm^2), które hybrydyzują z DNA zawieszonym w mieszaninie reakcyjnej. Obecnie prowadzone są prace nad zastosowaniem tej technologii do wykrywania i identyfikacji bakterii z gatunku *R. solanacearum*

i *C. michiganensis* subsp. *sepedonicus* oraz *E. carotovora* subs. *atroseptica* i *Erwinia chrysanthemi*. Zespół Zakładu Ochrony i Biotechnologii Roślin uczestniczy w projekcie (www.cost853.ch) zmierzającym do wykorzystania zmienności w obrębie sekwencji tzw. houskeeping genes (*rec*A, *gyr*A, *gyr* B, *rpo*S) do opisania oligonukleotydów przydatnych do wykorzystania w microchipach do wykrywania patogenów ziemniaka.

Literatura

[1] Agrios G.N. 1997. Plant Pathology. 4th. (Ed.) New York. Academic Press: 635.

[2] Alarcon B., Gorris M.T., Cambra M., Lopez M.M. 1995. Serological characterisation of potato isolates of *Erwinia carotovora* subsp. *atroseptica* and subsp. *carotovora* using polyclonal and monoclonal antibodies. *Journal of Applied Bacteriology* 79: 592–602.

[3] Bain R.A., Perombelon M.C.M., Tsror L., Nachmias A. 1990. Blackleg development and tuber yield in reaction to numbers of *Erwinia carotovora* subsp. *atroseptica* on seed tubers. *Plant Pathology* 39: 125–133.

[4] Bergey. 1989. Bergey's Manual of Systematic Bacteriology. Vol. 1. Krieg N.R., Holt J.G. (red.). Williams & Willins.

[5] Cambra M., Cambra M.A., Gorris M.T., Lopez M.M. 1992. Localization of phytopathogenic bacterial antigens in plant tissue sections by immunoprinting ELISA using biotinilated monoclonal antibodies. *Plant Pathogenic Bacteria* 66: 331–335.

[6] Chitarra L.G., Langerak C.J., Bergervoet J.H., Van Den Bulk R.W. 2002. Detection of the plant pathogenic bacterium *Xanthomonas campestris* pv. *campestris* in seed extracts of *Brassica* sp. applying fluorescent antibodies and flow cytometry. *Cytometry* 47: 118–26.

[7] Darrasse A., Priou S., Kotoujansky A., Bertheau Y. 1994. PCR and restriction fragment length polymorphism of pel gene as a tool to identify *Erwinia carotovora* in relation to potato diseases. *Applied and Environmental Microbiology* 60: 1437–1443.

[8] Danks C., Baker I. 2000. On-site detection of plant pathogens using lateral-flow devices. *OEPP/EPPO Bulletin* 30: 421–426.

[9] Deutsche Sammlung von Mikroorganismen und Zellkulturen GmbH (German Collection of Microorganisms and Cell Cultures, <http://www.dsmz.de/bactnom/nam1159.htm>; <http://www.dsmz.de/ bactnom/nam2237.htm>.

[10] De Boer S.H., Bradshaw-Rouse J.J., Sequeira L., McNaughton M.E. 1985. Sugar composition and serological specificity of *Erwinia carotovora* lipopolysaccharides. *Canadian J. Microbiology* 31: 583–586.

[11] De Boer S.H., Kelman A. 1975. Evaluation of procedures for detection of pectolytic *Erwinia* spp. on potato tuber. *American Potato Journal* 52: 117–123.

[12] De Boer S.H., Ward L.J. 1995. PCR detection of *Erwinia carotovora* subsp. atroseptica associated with potato tissue. *Phytopathology* 85: 854–858.

[13] De Boer S.H., Copeman R.J., Vruggink H. 1979. Serogroups of *Erwinia carotovora* potato strains determined with diffusable somatic antigens. *Phytopahtology* 69: 316–319.

[14] De Boer S.H., Verdonck L., Vruggink H., Harju P., Bang H.O., De Ley J. 1987. Serological and biochemical variation among potato strains of *Erwinia carotovora* subsp. *atrosep-*

tica and their taxonomic relationship to other *E. carotovora* strains. *J. of Applied Bacteriology* 63: 487–495

[15] De Boer S.H., Ward L.J., Li X., Chittaranjan S. 1995. Attenuation of PCR inhibition in the presence of plant compounds by addition of BLOTTO. *Nucleic Acids Research* 23: 2567–2568.

[16] Dellagi A., Brich P.R.J., Heilbronn J., Lyon G., Toth I.K. 2000. cDNA-AFLP analysis of differential gene expression in the bacterial plant pathogen *Erwinia carotovora*. *Microbiology* 146: 165–171.

[17] Dickey R.S., Kelman A. 1988. Erwinia carotovora or soft rot group. W: Laboratory guide for identification of plant pathogenic bacteria 2nd edn. Schaad N.W. (red.), St. Paul MN: APS Press: 44–59.

[18] Dye D.W. 1969. A taxonomic study of the genus *Erwinia*. II. The „carotovora" group. *New Zealand J. Science* 12: 81–97.

[19] Expert J.M., Noublanche F., Poliakoff F., Caffier D. 2000. Evaluation of magnetic capture for the detection of *Ralstonia solanacearum* in various substrates. *OEPP/EPPO Bulletin* 30: 385–389.

[20] Fox R.T.V. 1998. Plant Diseases Diagnosis. The Epidemiology of Plant Diseases. Kluwer Publishers, Dordrecht: 14–41.

[21] Fréchon D., Exbrayat P., Helias V., Hyman L.J., Jouan B., Llop P., Lopez M.M., Payet N., Pérombelon M.C.M., Toth I.K., Van Beckhoven J.R.C.M., Van der Wolf J.M., Bertheau Y. 1998. Evaluation of a PCR kit for the detection of Erwinia carotovora subsp. atroseptica on potato tubers. *Potato Res.* 41: 163–173.

[22] Gardan L., Gouy C., Christen R. Samson R. 2003. Elevation of three subspecies of *Pectobacterium carotovorum* to species level: *Pectobacterium atrosepticum* sp. nov., *Pectobacterium betavasculorum* sp. nov., *Pectobacterium wasabiae* sp. nov. *Inter. J. System. Evol. Microbiol.* 53: 381–391.

[23] Gorris M.T., Alarcon B., Lopez M.M., Cambra M. 1994. Characterization of monoclonal antibodies specific for *Erwinia carotovora* subsp. atroseptica and comparison of serological methods for its sensitive detection on potato tubers. *Applied and Environmental Microbiology* 60: 2076–2085.

[24] Gross D.C., Powelson M.L., Regner K.M., Radamaker G.K. 1991. A bacteriophage typing system for surveying the diversity and distribution of strains of *Erwinia carotovora* in potato fields. *Phytopathology* 81: 220–226.

[25] Hauben L., Moore E.R.B., Vauterin L., Steenackers M., Verdonck L., Swings J. 1998. Phylogenetic position of phytopathogens within the *Enterobacteriacae*. *System and Applied Microbiology* 21: 384–397.

[26] Higgins C.F., Ames G.F.L., Barnes W.M., Clement J.M., Hofnung M. 1982. A novel intercistronic regulatory element of prokaryoyic operons. *Nature* 298: 760–762.

[27] Hyman L.J., Brich P.R.J., Dellagi A., Avrovra A.O., Toth I.K. 2000. Development of a quantitative PCR-based detection system for *Erwinia carotovora* subsp. *atroseptica* on potato tubers. *OEPP/EPPO Bulletin* 30: 409–411.

[28] Hyman L.J., Perombelon M.C.M. 1990. Sensitivity of the ELISA method to detect potato seed contamination by *Erwinia carotovora* subsp. *atroseptica* below the threshold level for blackleg development. W: Proceedings of a Conference on Crop Protection in Northern Britain, Williams G.H., William Culross. Coupar Angus (red.): 219–224.

[29] Jafra S., Bielawski K., Łojkowska E.1998. Application of the pelL gene based primers for PCR diagnostics of Erwinia chrysanthemi. Abstracts of The 13th Symposium of the Polish Genetics Society. *Journal of Applied Genetics* 39A: 167.

[30] Janse J.D. 1995. New methods in plant pathology – perspectives and pitfalls. *OEPP/EPPO Bulletin* 25: 5–17.

[31] Jones D.A.C., Hyman L.J., Tumeseit M., Smith P., Perombelon M.C.M. 1994. Blackleg potential of potato seed: determination of tuber contamination by *Erwinia carotovora* subsp. *atroseptica* by immunofluorescence colony staining and stock and tuber sampling. *Annals of Applied Biology* 124: 557–568.

[32] Kohm B., Eggers-Schumacher G. 1994. Rapid and simple detection of plant pathogens by reverse passive haemagglutination (RPH): Detection of the bacteria *Clavibacter michiganensis* (ssp. *sepedonicus*) and *Erwinia carotovora* (ssp. *carotovora*) with RPH in potato tubers. *Journal of Plant Disease and Protection* 102: 58–62.

[33] Kunicki-Goldfinger W.J.H. 1998. Życie bakterii. Wydawnictwo Naukowe PWN, Warszawa, Polska.

[34] Kuske C.R., Banton K.L., Adorada D.L., Stark P.C., Hill K.K., Jackson P.J. 1998. Small-scale DNA sample preparation method for field PCR detection of microbial cells and spores in soil. *Applied and Environmental Microbiology* 7: 2463–2472.

[35] Lelliott R.A., Dickey R.S. 1984. Genus VII. *Erwinia* Winslow, Broadhurst, Buchanan, Krumwiede, Rogers and Smith 1920. W: Bergey's Manual of Systematic Bacteriology, Vol. 1. Krieg N.R., Holt J.G. (red.). Baltimore, Williams & Wilkins: 469–476.

[36] Lopez M.M., Gorris M.T., Llop P., Cubero J., Vicedo B., Cambra M. 1997. Selective enrichment improves isolation, serological and molecular detection of plant pathogenic bacteria. W: Diagnosis and identification of plant pathogenes. Dehne H.-W. et al. (red.), Kluwer Academic Publishers, The Netherlands: 117–121.

[37] Łojkowska E. 1992. Charakterystyka czynników warunkujących patogeniczność bakterii z rodzaju *Erwinia* na ziemniaku. *Postępy Mikrobiologii* 2: 227–238.

[38] Łojkowska E. 2001. Diagnostyka molekularna roślin. Wykrywanie obecności czynników chorobotwórczych. Biotechnologia Roślin, PWN: 141–155.

[39] Macas J., Nouzova M., Galbraith D.W. 1998. Adapting the Biomek? 2000 laboratory automation work-station for printing DNA microarrays. *BioTechniques* 25: 106–110.

[40] Maki-Valkama T., Karjalainen R. 1994. Differentiation of *Erwinia carotovora* subsp. *atroseptica* and *carotovora* by RAPD-PCR. *Annual Applied of Biology* 125: 301–309.

[41] Malec K., Mierzwa Z., Brychczyńska M., Szymańska T. 1987. Wykrywanie i identyfikacja bakterii *Erwinia carotovora* subsp. *atroseptica* w zewnętrznie zdrowych bulwach ziemniaka metodą immunofluorescencji pośredniej. *Biuletyn Instytutu Ziemniaka* 35: 87–90.

[42] Martin B., Humbert O., Camara M., Guenzi E., Walker J., Mitchell T., Andrew P., Prudhomme M., Alloing G., Hakenbeck R., Morrison D.A., Boulnois G.J., Claverys J.-P. 1992. A highly conserved repeated DNA element located in chromosome of *Streptococcus pneumoniae*. *Nucleic Acids Researce* 20: 3479–3483.

[43] McLeod G., Perombelon M.C.M. 1992. Rapid detection and identification of *Erwinia carotovora* subsp. atroseptica by conjugated *Staphylococcus aureus* slide agglutination test. *J. of Applied Bacteriology* 72: 273–280.

[44] Nassar A., Darrasse, A., Lemattre M., Kotoujansky A., Dervin C., Vedel R., Bertheau Y. 1996. Characterisation of *Erwinia chrysanthemi* by pectinolytic isozyme polymorphism

and Restriction Fragment Length Polymorphism analysis of PCR-amplified fragments of pel genes. *Applied and Environmental Microbiology* 62(7): 2228–2235.

[45] Parent J.-G., Lacroix M., Page D., Vezina L. 1996. Identification of *Erwinia carotovora* from soft rot diseased plant by random amplified polymorphic DNA (RAPD) analysis. *Plant Disease* 5: 494–499.

[46] Perombelon M.C.M. 2000. Blackleg risk potential of seed potatoes determined by quantification of tuber contamination by the causal agent and *Erwinia carotovora* subsp. *atroseptica*: a critical review. *OEPP/EPPO Bulletin* 30: 413–420.

[47] Perombelon M.C.M., Burnett E.M. 1991. Two modified crystal violet pectate (CVP) media for the detection, isolation and enumeration of soft rot erwinias. *Potato Research* 34: 79–85.

[48] Perombelon M.C.M., Hyman L.J. 1992. Control of potato blackleg: production of healthy seed. *Aspects of Applied Biology* 33: 77–84.

[49] Perombelon M.C.M., Kelman A. 1980. Ecology of the soft rot erwinias. *Annual Review of Phytopathology* 18: 361–387.

[50] Perombelon M.C.M., Kelman A. 1987. Blackleg and other potato diseases caused by soft rot erwinias: Proposal for revision of terminology. *Plant Disease* 71: 283–285.

[51] Persson P., Sletten A. 1995. Fatty acid analysis for the identification of *Erwinia carotovora* subsp. *atroseptica* and *Erwinia carotovora* subsp. *carotovora*. *OEPP/EPPO Bulletin* 25: 151–156.

[52] Puławska J., Sobiczewski P. 1997. Zastosowanie metod biologii molekularnej w diagnostyce bakteryjnych chorób roślin. *Post. Nauk Rol.* 1: 73–96.

[53] Saiki R.K., Gelfand D.H., Stoffel S., Scharf S. J., Higuchi R., Horn G.T., Mullis K.B., Erlich H.A. 1988. Primer directed enzymatic amplification of DNA with thermostable DNA polymerase. *Science* 239: 487–491.

[54] Schaad N.W. 1994. Laboratory guide for identification of plant pathogenic bacteria. (red.) American Phytopathological Society Press. Minneapolis.

[55] Sharples G.J., Loyd R.G. 1990. A novel repeated DNA sequence located in the intergenic regions of bacterial chromosomes. *Nucleic Acids Research* 18: 6503–6508.

[56] Southern E.M. 1975. Detection of specific sequences among DNA fragments separated by gel electrophoresis. *Journal of Molecular Biology* 98: 503–517.

[57] Śledź W. 2002. Praca doktorska. Zakład Ochrony i Biotechnologii Roślin, Międzyuczelniany Wydział Biotechnologii UG i AMG, Uniwersytet Gdański.

[58] Śledź W., Jafra S., Waleron M., Łojkowska E. 2000. Genetic diversity of *Erwinia carotovora* strains isolated from infected plants grown in Poland. *OEPP/EPPO Bulletin* 30: 403–407.

[59] Tani K., Kurokawa K., Nasu M. 1998. Development of a direct *in situ* PCR method for detection of specific bacteria in natural environments. *Applied and Environmental Microbiology* 64: 1536–1540.

[60] Toth I.K., Avarova A.O., Hyman L.J. 2001. Rapid identification and differentation of soft Erwinias by 16S–23S Intergenic Transcribed Spacer – PCR and Restriction Fragment Length Polymorphism Analyses. *Applied and Environmental Microbiology* 67: 4070–4076.

[61] Toth I.K., Bertheau Y., Hyman L.J., Laplaze L., Lopez M.M., McNicol J., Niepold F., Persson P., Salmond G.P.C., Sletten A., Van der Wolf J.M., Perombelon M.C.M. 1999.

Evaluation of phenotypic and molecular typing techniques for determining diversity in *Erwinia carotovora* subsp. *atroseptica*. *Journal of Applied Microbiology* 87: 770–781.

[62] Toth I.K., Hyman L.J., Wood J.R. 1999. A one step PCR-based method for the detection of economically important soft rot *Erwinia* species on micropropagated potato plants. *Journal Applied of Microbiology* 87: 158–166.

[63] Toth I.K., Mulholland V., Cooper V., Bentley S., Shih Y.-L., Perombelon M.C.M., Salmond G.P.C. 1997. Generalised transduction in the blackleg pathogen *Erwinia carotovora* subsp. *atroseptica* by bacteriophage ϕM1. *Microbiology* 143: 2433–2438.

[64] Van der Wolf J.M., Kastelein P., Van Beckhoven J.R.C.M., Van den Brink M., De Vries P.M. 1996. Verification of immunofluorescence colony-staining of *Erwinia carotovora* subsp. *atroseptica* by reisolation and immunodiffusion or PCR. *OEPP/EPPO Bulletin* 26: 707–715.

[65] Van der Wolf J.M., Śledź W., Van Elsas J.D., Van Overbeek L., Bergervoet J.H.W. 2005. Flow cytometry to detect *Ralstonia solanacearum* and to assess viability. W: Bacterial Wilt Disease and the *Ralstonia Solanacearum* Species Complex. Allen C., Prior P. & Hayward A.C. The American Phytopathological Society, St. Paul, Minesota USA: 479–484.

[66] Van Vuurde J.W.L. 1987. New approach in detection phytopathogenic bacteria by combined immunoisolation and immunoidentification assays. *OEPP/EPPO Bulletin* 17: 139–140.

[67] Van Vuurde J.W.L., Roozen N.J.M. 1990. Comparison of immunofluorescence colony staining in media, selective isolation on pectate medium. ELISA and immunofluorescence cell staining for detection of *Erwinia carotovora* subsp. *atroseptica* and *Erwinia chrysanthemi* in cattle manure slurry. *Netherlands Journal of Plant Pathology* 96: 75–89.

[68] Versalovic J., Koeuth T., Lupski J.R. 1991. Distribution of repetitive DNA sequences in eubacteria and application to fingerprinting of bacterial genomes. *Nucleic Acids Research* 19: 6823–6831.

[69] Vos P., Hogers R., Bleeker M., Reijans M., Van de Lee T., Horners M., Frijters A., Pot J., Peleman J., Kuiper M., Zabeau M. 1995. AFLP: a new technique for DNA fingerprinting. *Nucleic Acids Research* 23: 4407–4414.

[70] Waleron M., Waleron K., Podhajska A., Łojkowska E. 2002. Genotyping of bacteria belonging to the former *Erwinia* genus by PCR-RFLP analysis of a recA gene fragment. *Microbiology* 148: 583–595.

[71] Ward L.J., De Boer S.H. 1990. A DNA probe specific for serologically diverse strains of *Erwinia carotovora*. *Phytopathology* 80: 665–669.

[72] Ward L.J., De Boer S.H. 1994. Specific detection of *Erwinia carotovora* subsp. *atroseptica* a di'goxigenin-labeled DNA probe. *Phytopathology* 84: 180–186.

[73] Welsh J., McClelland M. 1990. Fingerprinting genomes using PCR with arbitrary primers. *Nucleic Acids Research* 18: 7213.

[74] Żołobowska L., Pośpieszny H. 1998. PCR detection of *Erwinia carotovora* ssp. *carotovora* from various plant in Poland. W: Proceedings of a 7th International Congress of Plant Pathology. Edinburgh. 3.3.43.

Methods for detection, identification and differentiation of the bacteria *Erwinia carotovora* (*Pectobacterium carotovorum*)

Key words: *Erwinia carotovora* (*Pectobacterium carotovorum*), genetic differentiation, soft rot

Summary

The species *Erwinia carotovora* (*Pectobacterium carotovorum*) consists of several subspecies of gram-negative, non-spore-forming, peritrichous, fermentative rod-shaped bacteria and belongs to the *Enterobacteriaceae* family. *E. carotovora* causes highest losses of agricultural crops, vegetables and fruits of which the potato is economically most important. The prevention and control strategies for this dangerous bacterial pathogen is possible only through application of early and efficient detection and identification methods. Biochemical, serological and molecular methods suitable for the diagnosis of the pathogen were described. Application of several methods, including molecular markers, for genetic differentiation of the bacteria belonging to the same species or subspecies was also presented.