

**Joanna Puławska<sup>1\*</sup>, Krzysztof Kielak<sup>2\*</sup>, Piotr Sobiczewski<sup>1</sup>**

<sup>1</sup>Instytut Sadownictwa i Kwiaciarnictwa, ul. Pomologiczna 18, 96-100 Skierniewice

<sup>2</sup>Ministerstwo Rolnictwa i Rozwoju Wsi, Departament Hodowli i Ochrony Roślin, ul. Wspólna 30, 00-930 Warszawa

Wpłynęło w styczniu 2009 r.

1. Wstęp. 2. Analiza cech fenotypowych. 2.1 Rośliny-gospodarze i wirulencja *E. amylovora*. 2.2. Biochemiczne i fizjologiczne właściwości *E. amylovora*. 2.3. Analiza kwasów tłuszczowych i białek. 2.4. Oporność na streptomycynę. 3. Analiza kwasów nukleinowych. 3.1. Analiza plazmidowego DNA. 3.2. Analiza chromosomalnego DNA. 3.2.1. Analiza sekwencji powtarzalnych – Rep-PCR. 3.2.2. Rybotypowanie. 3.2.3. Analiza restrykcyjna – RFLP. 3.2.4. Losowo wzmożone polimorficzne DNA – RAPD. 3.2.5. Polimorfizm długości amplifikowanych fragmentów – AFLP. 3.2.6. Elektroforeza w zmiennym polu elektrycznym – PFGE. 4. Podsumowanie

#### **Biodiversity of *Erwinia amylovora* – the causal agent of fire blight**

**Abstract:** Strains of *Erwinia amylovora*, the causal agent of fire blight of *Rosaceae* plants, form very homogenous species, regarding both biochemical and genotypic characters. However, they show diversity of virulence. The differences in phenotype and genotype of this bacterium have been observed only between strains originating from *Rubus* and those from *Maloidae* plants. In regions where streptomycin was used to control fire blight, the presence of streptomycin resistant strains was found. However strains highly and moderately resistant to streptomycin can be distinguished depending on their mechanism of resistance. Strains originating from North America, where fire blight was described for the first time, are generally more genetically heterogeneous than those from Europe. It was found that *E. amylovora* isolates can differ in plasmid content. Moreover, some of plasmids, like pEI70 discovered in Spain, can possess genes essential for pathogenicity and different than presently known ones – responsible for synthesis of siderophores, exopolysaccharides and proteins eg. harpin.

1. Introduction. 2. Analysis of phenotypic properties. 2.1. Host-plants and virulence of *E. amylovora*. 2.2. Biochemical and physiological properties of *E. amylovora*. 2.3. Analysis of fatty acids and protein patterns. 2.4. Resistance to streptomycin. 3. Nucleic acid based methods. 3.1. Analysis of plasmid DNA. 3.2. Analysis of chromosomal DNA. 3.2.1. Analysis of repetitive extragenic palindromic elements. 3.2.2. Ribotyping. 3.2.3. Restriction Fragment Length Polymorphism – RFLP. 3.2.4. Random Amplified Polymorphic DNA – RAPD. 3.2.5. Amplified Fragment Length Polymorphism – AFLP. 3.2.6. Pulsed-Field Gel Electrophoresis – PFGE. 4. Summary

---

**Słowa kluczowe:** DNA chromosomalny, DNA plazmidowy, *Erwinia amylovora*, wirulencja, zróżnicowanie genetyczne i fenotypowe  
**Key words:** chromosomal DNA, plasmid DNA, *Erwinia amylovora*, genotypic and phenotypic diversity, virulence

---

## **1. Wstęp**

Bioróżnorodność bakteryjnych patogenów roślin jest efektem ich zmienności spowodowanej zarówno warunkami środowiskowymi, prowadzącymi do niedziedzicznych zmian fenotypu, jak i zmiennością w materiale genetycznym, przekazywaną na kolejne pokolenia. Zmiany genotypu mogą prowadzić do zmian patogeniczności bakterii np. zmniejszenia lub wzrostu ich wirulencji, w tym uzyskania zdolności porażania odmian czy gatunków roślin uprawnych dotychczas odpornych na chorobę, której dana bakteria jest sprawcą. Stanowi to główną przeszkodę w wyhodowaniu odmian odpornych. Zmienność patogenów może być również przyczyną powstawania oporności na środki ochrony roślin, zwłaszcza antybiotyki.

Ocena genetycznego zróżnicowania patogenów jest ważna w badaniach epidemiologicznych, m.in. nad ich rozprzestrzenianiem się, w hodowli odporno-

ciowej roślin na choroby, ochronie roślin i kwarantanie, w tym selekcji grup patogenów do oceny efektywności różnych czynników biologicznej ochrony roślin przed chorobami. Dane pochodzące z badań nad genetycznym zróżnicowaniem mogą być wykorzystywane do monitorowania występowania szczepów patogenicznych, wykrywania i identyfikacji możliwych źródeł infekcji pierwotnej, mapowania genów bakterii i roślin, identyfikacji poszczególnych szczepów w badaniach nad genetyką populacji i studiach filogenetycznych czy fizjografią chorób. Techniki używane w badaniach nad genetycznym zróżnicowaniem mają dać informacje pomocne w rozróżnianiu szczepów, jak i o ich pokrewieństwie.

Rozwój technik molekularnych pozwolił na ujawnienie zmienności w materiale genetycznym bakterii patogenicznych dla roślin i to zarówno w ich chromosomalnym, jak plazmidowym DNA. Prowadzone są intensywne prace w tym zakresie nad *Erwinia*

---

\* Autor korespondencyjny: 1) Instytut Sadownictwa i Kwiaciarnictwa, ul. Pomologiczna 18, 96-100 Skierniewice; e-mail: jpulaw@insad.pl; 2) Ministerstwo Rolnictwa i Rozwoju Wsi, Departament Hodowli i Ochrony Roślin, ul. Wspólna 30, 00-930 Warszawa

*amylovora*, patogenem powodującym straty o znaczeniu gospodarczym w wielu rejonach uprawy jabłoni i gruszy oraz innych roślin.

## 2. Analiza cech fenotypowych

### 2.1. Rośliny-gospodarze i wirulencja *E. amylovora*

Bakteria *E. amylovora* jest patogenem ponad 130 gatunków roślin, zaliczanych do 40 rodzajów, głównie z rodziny *Rosaceae* [75]. W Polsce, poza gruszą (*Pyrus*), jabłonią (*Malus*) i pigwą (*Cydonia*) chorobę stwierdzono dotychczas na głogu (*Crataegus*), jarządzie (*Sorbus*), irdze (*Cotoneaster*), świdośliwie (*Amelanchier*) oraz ogniku (*Pyracantha*). Generalnie uważa się, że *E. amylovora* jest gatunkiem jednorodnym i nie wykazuje specjalizacji patogenicznej co oznacza, że potencjalnie każdy z izolatów tego patogena jest w stanie zakazić każdą z dotychczas poznanych roślin-gospodarzy [53]. Jednak De L e y i wsp. [13] na podstawie badań z zastosowaniem sztucznej inokulacji roślin udowodnili, że poszczególne izolaty mogą wykazywać pewne różnice w zakresie porażanych roślin. Na uwagę zasługują izolaty wyosobnione z roślin rodzaju *Rubus*, niezdolne do porażania jabłoni i gruszy [1, 13, 17, 62, 71]. Jednocześnie większość izolatów pochodzących z drzew ziarnkowych okazała się niepatogeniczna w stosunku do maliny i jeżyny [13, 62]. Jedynie E v a n s [17] donosił o udanej inokulacji pędów malin izolatem *E. amylovora* z jabłoni. Ze względu na wymienione różnice S t a r r i wsp. [71] postulowali utworzenie dla izolatów porażających krzewy z rodzaju *Rubus*, odrębnego taksonu – *Erwinia amylovora* f.sp. *rubi*.

Poszczególne izolaty *E. amylovora* mogą natomiast różnić się znacznie między sobą wirulencją w stosunku do tego samego genotypu rośliny [7, 26, 59, 67]. O patogeniczności tej bakterii decyduje głównie jej zdolność do biosyntezy egzopolisacharydu (EPS) oraz białek, zwłaszcza harpiny. EPS jest związkiem kompleksowym i może zawierać amyloworan, lewan i glukan [22]. Stanowi on główny składnik wycieku bakteryjnego, towarzyszącego często nekrozom i zgorzelom na porażonych roślinach. Wokół komórki bakteryjnej EPS tworzy otoczkę chroniącą ją przed niekorzystnym wpływem otoczenia, a także przed rozpoznaniem patogena przez system obronny zaatakowanej rośliny. Utrata tej otoczki wpływa także na aktywność harpiny – białka zbudowanego głównie z glicyny, które jest induktorem reakcji nadwrażliwości, a ponadto, co jest najważniejsze, działa jako cząsteczka sygnałowa indukująca zaprogramowaną śmierć komórki rośliny-gospodarza [24].

Badane przez N o r e l l e g o i wsp. [56] szczepy *E. amylovora* wykazywały różne zdolności cho-

robotwórcze wobec kilku odmian jabłoni. Z kolei S c h w a r t z i wsp. [68] wykazali, że tylko niektóre izolaty tej bakterii hamowały wzrost komórek gruszy w pożywce agarowej, co wiązało się z ich zdolnością do wytwarzania toksycznej dla roślin dihydrofenyloalaniny (DPH). Poszczególne izolaty mogą się również różnić patogenicznością na zawiązkach owoców gruszy oraz zdolnością indukowania reakcji nadwrażliwości na tytoniu. Jakkolwiek dla większości z nich otrzymuje się na ogół pozytywny wynik obu testów, w niektórych przypadkach uzyskiwano wynik negatywny jednego lub obu z nich [13, 77].

### 2.2. Biochemiczne i fizjologiczne właściwości *E. amylovora*

Izolaty *E. amylovora* stanowią dość jednorodną grupę pod względem właściwości biochemicznych i fizjologicznych [15, 27, 50, 58]. Pewne różnice mogą jednak występować między poszczególnymi izolatami w zdolności wykorzystania niektórych węglowodanów jako źródła węgla. Analiza numeryczna profili metabolicznych różnych izolatów *E. amylovora* wykonana w oparciu o system BIOLOG, umożliwiający określenie zdolności utylizacji 95 organicznych związków węgla, pozwoliła na odróżnienie, tworzących jednorodną grupę izolatów wyosobnionych z roślin należących do podrodziny *Pomoideae*, od izolatów pochodzących z roślin należących do rodzaju *Rubus*. Wśród tych ostatnich wyróżniono dwie podgrupy: *Rubus* I i *Rubus* II [33]. Nasze badania nad opracowaniem charakterystyki fenotypowej polskich izolatów *E. amylovora* z zastosowaniem zestawów API 50CH, API ZYM i API 20NE wykazały, że na 87 badanych cech, niektóre z testowanych izolatów różniły się tylko w zdolności utylizacji melibiozy, celobiozy, sorbitolu, D-glukozy i L-arabinozy [59].

### 2.3. Analiza kwasów tłuszczowych i białek

Komórki większości izolatów *E. amylovora*, niezależnie od ich pochodzenia geograficznego i rośliny-gospodarza, mają podobną procentową zawartość kwasów tłuszczowych, reprezentujących poszczególne klasy. Jedynie izolaty wyosobnione z roślin rodzaju *Rubus* posiadają nieznacznie więcej kwasów cyklopropanowych. Natomiast izolaty odporne na streptomycynę mają mniej tych kwasów, a więcej kwasów nasyconych, niż izolaty wrażliwe na ten antybiotyk [76]. Zdaniem Ż a r n o w s k i e g o i wsp. [85] różnice obserwowane w profilach kwasów tłuszczowych poszczególnych izolatów *E. amylovora* są wystarczające do ich rozróżniania, a G a r r e t t i wsp. [21] stwierdzili nawet pewną korelację między uzyskiwanymi profilami, a wirulencją badanych izolatów. Szersze

zastosowanie analizy kwasów tłuszczowych w badaniach epidemiologicznych i taksonomicznych wymaga jednak bardzo ścisłego przestrzegania procedur, gdyż na uzyskiwane profile może mieć wpływ między innymi wiek kolonii bakteryjnych oraz skład pożywki, na jakiej zostały wyhodowane [8]. Natomiast profile, uzyskane w wyniku rozdziału białek bakteryjnych w żelu poliakrylamidowym, wskazują na dużą jednorodność europejskich izolatów *E. amylovora*, wyosobnionych z roślin należących do podrodziny *Pomoideae*. Wśród obserwowanych sporadycznie różnic wśród izolatów nie stwierdzono korelacji z ich wirulencją, pochodzeniem geograficznym i rośliną gospodarzem [13, 77].

## 2.4. Oporność na streptomycynę

Streptomycyna, zaledwie 8 lat po jej odkryciu przez Schatza i wsp. [65] w 1944 roku, została w USA zarejestrowana jako środek ochrony roślin. Jej skuteczność w zwalczaniu zarazy ogniowej potwierdzono w szeregu badaniach na różnych kontynentach. Również w Polsce, w latach 2002–2004, zarejestrowany był środek przeciwko zarazie ogniowej środek o nazwie Hortocyna 18 SP, bazujący na siarczanie streptomycyny [70]. Szczepy *E. amylovora*, odporne na streptomycynę wykryto po raz pierwszy w USA. Pierwsze doniesienie na ten temat pochodzi z Kaliforni z roku 1971 [51], niedługo później pojawiły się podobne informacje ze stanów Oregon i Waszyngton [12], a w kolejnych latach z innych rejonów USA, w których również stosowano streptomycynę, jako środek przeciw zarazie ogniowej. Ostatnio szczepy *E. amylovora* odporne na ten antybiotyk odkryto również poza Ameryką Północną m.in. w Egipcie [16], Nowej Zelandii [73], Izraelu [45], Libanie [64]. Wśród szczepów opornych wyróżniono dwa główne fenotypy – o wysokiej i o średniej oporności [11, 12, 47]. Szczepy o niskim poziomie oporności występują w naturze bardzo rzadko [69]. Oporność na streptomycynę u bakterii może mieć dwojakie podłoże: jako wynik punktowej mutacji w genie *rpsL* kodującym rybosomalne białko S12 lub też poprzez nabycie genów związanych z opornością zlokalizowanych na mobilnych elementach genetycznych, jak np. na plazmidach lub transpozonach. Stwierdzono, że u *E. amylovora* o wysokiej oporności na streptomycynę występuje mutacja chromosomalna w genie *rpsL* uniemożliwiająca przyłączenie się antybiotyku do rybosomu, a co za tym idzie inhibicji syntezy białek. Natomiast u szczepów średnio opornych cecha ta jest często związana z nabyciem genów *strA-strB* zlokalizowanych na plazmidach lub transpozonach umożliwiających syntezę enzymów modyfikujących aminoglikozydy, które tak zmieniają strukturę streptomycyny, że nie może ona blokować miejsca przyłączenia antykodonu w tRNA do rybosomu, czyli nie

może hamować syntezy białek [9]. Geny *strA-strB* znaleziono na plazmidzie RSF1010 występującym u różnych bakterii, znalezionym w klinicznych szczepach bakterii Gram-ujemnych. Dalsze badania wykazały, że geny te również znaleziono na transpozonie Tn5393 zlokalizowanym na koniugacyjnym plazmidzie pEA34 występującym u bakterii *E. amylovora* [10]. Do roku 1994, oporność na streptomycynę związana z genami *strA-strB* była obserwowana wśród szczepów izolowanych tylko w stanie Michigan w USA. Później znaleziono szczepy *E. amylovora* zawierające plazmid pEa8.7 z tymi genami w Kaliforni [57].

## 3. Analiza kwasów nukleinowych

### 3.1. Analiza plazmidowego DNA

Zastosowanie technik molekularnych w badaniach nad zmiennością *E. amylovora* pozwoliło m.in. na wykazanie różnej wielkości charakterystycznego dla gatunku plazmidu pEA29, która waha się od ok. 27,6 do ok. 34,9 kbp [46]. Analiza restrykcyjna tego plazmidu ujawniła natomiast dość dużą jednorodność izolatów pochodzących z drzew owocowych, umożliwiając jednocześnie łatwe ich odróżnienie od izolatów z malin oraz izolatów *Erwinia pyrifoliae* – gatunku, do którego zaklasyfikowano bakterie powodujące objawy podobne do zarazy ogniowej na azjatyckich odmianach gruszy [34]. Bakterie te różnią się od typowych szczepów m.in. patogenicznością i zakresem roślin-gospodarzy. Pierwotnie istniała wśród badaczy zgodność, co do tego, że plazmid pEA29 jest obecny we wszystkich izolatach *E. amylovora* [4, 18]. Brak genów odpowiedzialnych za transfer i mobilizację w obrębie sekwencji tego plazmidu w powiązaniu z jego wysoką stabilnością wywołało przekonanie, że powinien on występować u wszystkich dzikich szczepów *E. amylovora*. W związku z tym pierwsze próby zastosowania analizy DNA do identyfikacji i wykrywania patogena były oparte na analizie DNA plazmidu pEA29 [4, 38, 48]. Jednak z czasem zaczęło pojawiać się przypuszczenie, że bakterie *E. amylovora* mogą łatwo zgubić pEA29 nie tracąc przy tym patogeniczności [3]. Brown i wsp. [6] nie otrzymali żadnego produktu z 5 izolatami wyosobnionymi z maliny, gruszy i jabłoni po przeprowadzeniu amplifikacji ze starterami komplementarnymi do tego plazmidu, co ich zdaniem, świadczyło o jego braku. Co więcej, jeden z pozyskanych Gram-dodatnich, niezidentyfikowanych izolatów także reagował z tymi starterami, co może świadczyć o wcześniejszym pozyskaniu pEA29 od bakterii *E. amylovora*. Natomiast w Hiszpanii, Lopez i wsp. [39] wyizolowali z głogu izolat *E. amylovora* pozbawiony plazmidu pEA29. Stwierdzili także,

występowanie u tego izolatu innego plazmidu o wielkości około 70 kbp (pEI70) nie wykazującego homologii z pEA29. Na podstawie analizy składu plazmidowego europejskich szczepów *E. amylovora* stwierdzono, że plazmid pEI70 występuje dość powszechnie u *E. amylovora* na naszym kontynencie. W niektórych rejonach, np. w Polsce stwierdzono go u ok. 10% spośród ponad 100 badanych szczepów, a w innych np. w Belgii plazmid ten znaleziono we wszystkich testowanych izolatach. Przypuszcza się, że plazmid pEA29 może nieść geny istotne dla wirulencji *E. amylovora* [40].

Spośród starterów komplementarnych do plazmidowego DNA najpowszechniej stosowane są startery A i B, zaprojektowane przez Bereswillla i wsp. [4], pozwalające na amplifikację odcinka o długości 0,9 kbp powstałego po trawieniu plazmidu pEA29 restryktazą *Pst*I lub też inne startery w obszarze tego fragmentu DNA [38, 48]. Niektórzy badacze otrzymywali jednak z niektórymi z tych starterów produkty o innej długości [6, 33, 37]. Poddanie produktów amplifikacji analizie restrykcyjnej wykazało, że w omawianym fragmencie pojawia się insercja wielkości od 30 do 90 bp [37]. Sekwencjonując amplifikowany fragment, Schnabel i Jones [66] oraz Kim i Geider [35] opisali równoległe ośmionukleotydy, powtarzającą się sekwencję (Short Sequence Repeats – SSR), która może występować u różnych izolatów w liczbie od 4 do 15 kopii. Opisywana cecha oceniona jednak została jako niestabilna, na przykład w warunkach stresowych [31]. W związku z tym analiza SSR nie jest polecana w badaniach epidemiologicznych i diagnostycznych [31, 35, 66]. Odmienne obserwacje zostały odnotowane przez Ruppitscha i wsp. [63]. Analizowali oni 104 austriackie szczepy *E. amylovora* pod kątem stabilności liczby powtórzeń wcześniej opisanych ośmionukleotydydowych sekwencji, w warunkach laboratoryjnych po wielokrotnym pasażowaniu oraz w warunkach stresowych. W zdecydowanej większości badań liczba powtórzeń badanych SSR była niezmienna. W zależności od rejonu Austrii izolowano szczepy o różnej liczbie SSR i na podstawie wyników wyciągnięto wniosek, że zaraza ognio-wa nie rozprzestrzeniła się z jednego źródła, lecz na przestrzeni kilku lat od pierwszego pojawienia się tej choroby w 1993 roku, nastąpiło wielokrotne wprowadzenie źródła infekcji do tego kraju.

Intensywne badania nad genomem *E. amylovora* wykazały obecność również innych plazmidów w komórkach niektórych izolatów tego gatunku. Foster i wsp. [19] określili sekwencję nukleotydydową oraz dystrybucję plazmidów pEU30 wielkości 30,314 kbp i pEL60 wielkości 60,145 kbp. Obecność plazmidu pEU30 stwierdzono u izolatów pochodzących z zachodniej części USA, natomiast pEL60 u izolatów

z Libanu. Sekwencje plazmidów i rodzaj genów w nich zlokalizowanych sugerują, że mniejszy z nich jest podobny do innych plazmidów izolowanych z bakterii związanych z roślinami, natomiast większy – do plazmidów występujących u ludzkich bakterii jelitowych.

## 3.2. Analiza chromosomalnego DNA

### 3.2.1. Analiza sekwencji powtarzalnych – Rep-PCR

Jedną z pierwszych prób zastosowania analizy genomowego DNA w badaniach zmienności genetycznej *E. amylovora* opierała się na amplifikacji obszarów położonych między sekwencjami powtarzalnymi typu REP (ang. Repetitive Extragenic Palindromic sequences), ERIC – (Enterobacterial Repetitive Intergenic Consensus) oraz sekwencjami repetetywnymi BOX [49]. Technika ta jest wykorzystywana obecnie zarówno w diagnostyce bakteriologicznej, jak i badaniach epidemiologicznych [41, 42, 74, 78]. Zastosowanie metody na bazie sekwencji powtarzalnych pozwoliło McManus i Jones [49] na łatwe odróżnienie izolatów pochodzących z malin i jeżyn od izolatów pochodzących z roślin należących do podrodziny *Pomoideae*. Te ostatnie okazały się mało zróżnicowane. Amplifikacja DNA ponad 170 izolatów, pochodzących głównie z kontynentu północnoamerykańskiego, pozwoliła na uzyskanie jedynie od 2 do 3 profili, w zależności od zastosowanych starterów (największe zróżnicowanie uzyskano stosując startery komplementarne do sekwencji typu ERIC). Warto przy tym zaznaczyć, że niezależnie od zastosowanych starterów, zawsze jeden z otrzymanych profili był dominujący. Dla większości izolatów pochodzących z roślin należących do rodzaju *Rubus* otrzymano inne profile niż dla izolatów pochodzących z drzew owocowych. Wyjątek stanowił 1 izolat, dla którego otrzymano profile typowe dla izolatów wyosobnionych z drzew owocowych. Rico i wsp. [60] również stwierdzili małą użyteczność techniki rep-PCR do określenia związków filogenetycznych między szczepami *E. amylovora*. Zróżnicowanie uzyskanych produktów amplifikacji było niewielkie, lecz nieliczne obserwowane produkty polimorficzne pozwoliły na opracowanie starterów amplifikujących markerowe fragmenty DNA. Mogą one posłużyć jako narzędzie w badaniach epidemiologicznych – np. do śledzenia dróg rozprzestrzeniania się patogena z określonego ogniska choroby.

### 3.2.2. Rybotypowanie

McManus i Jones [49] amplifikowali również obszar DNA leżący w operonie *rnm*, pomiędzy genami kodującymi 16S rRNA i 23S rRNA (rybotypowanie – ribotyping) [25]. Amplifikacja obszaru między genami 16S rDNA i 23S rDNA izolatów *E. amylovora* pozwoliła na łatwe wyróżnienie tworzących jednolitą

grupę izolatów wyosobnionych z roślin należących do rodzaju *Rubus*. Również izolaty pochodzące z drzew owocowych okazały się mało zróżnicowane – amplifikacja DNA około 170 izolatów umożliwiła uzyskanie jedynie 3 różnych profili [49]. Podobne wyniki rybotypowania uzyskali J e n g i wsp. [28] – izolaty wyosobnione z krzewów z rodzaju *Rubus*, oraz izolaty pochodzące z roślin podrodziny *Pomoideae* tworzyły dwie jednorodne grupy. M o m o l i wsp. [55] zastosowali modyfikację rybotypowania, polegającą na dodatkowym trawieniu otrzymanych produktów za pomocą enzymów restrykcyjnych – ARDREA (Amplified Ribosomal DNA Restriction Enzyme Analysis). Umożliwiło to jedynie odróżnienie izolatów pochodzących z malin i jeżyn od izolatów wyosobnionych z innych roślin-gospodarzy. Natomiast G a r b e v a i wsp. [20], stosując tę samą technikę, wykazali zróżnicowanie również wśród izolatów z drzew owocowych. Odmienne profile uzyskali jednak dla tylko 2 izolatów, spośród 14 badanych.

### 3.2.3. Analiza restrykcyjna – RFLP

K i m i wsp. [33] trawili genomowy DNA wybranych izolatów *E. amylovora* wykorzystując w tym celu enzym *EcoRI*, a następnie przeprowadzili hybrydizację otrzymanych produktów z sondą, obejmującą grupę genów *hrp*. Dla wszystkich izolatów pochodzących z drzew owocowych otrzymali jeden profil, podczas gdy dla izolatów wyosobnionych z krzewów należących do rodzaju *Rubus* otrzymali dwa odmienne profile. Technikę RFLP (Restriction Fragment Length Polymorphism) stosowali również W a l e r o n i wsp. [81], amplifikując gen *recA* kodujący rekombinazę A dziesięciu izolatów *E. amylovora*, wyosobnionych z drzew owocowych w różnych rejonach świata. Produkty amplifikacji poddano następnie trawieniu czterema enzymami restrykcyjnymi. Dla wszystkich izolatów otrzymano jednak jednakowe profile. Podobne wyniki uzyskano stosując analizę RFLP *recA* i dodatkowo 2 innych genów: *gyrA* i *rpoS*. Tylko jeden z siedmiu enzymów restrykcyjnych zastosowanych do trawienia fragmentu genu *recA* pozwolił na odróżnienie 5 od pozostałych 12 testowanych szczepów *E. amylovora*. Wszystkie pozostałe wzory restrykcyjne były identyczne dla *E. amylovora*, ale umożliwiały odróżnienie tego gatunku od bakterii *Erwinia* wyizolowanych z podobnych do zarazy ogniowej symptomów na gruszkach w Japonii [80].

### 3.2.4. Losowo wzmocnione polimorficzne DNA – RAPD

Do badania zmienności genetycznej *E. amylovora* M o m o l i wsp. [54] zastosowali technikę RAPD (Random Amplified Polymorphic DNA) [43, 82]. Profile, uzyskane w wyniku amplifikacji DNA 16 izolatów *E. amylovora* pochodzących z różnych rejonów

geograficznych, z sześcioma przypadkowymi starterami pozwoliły na odróżnienie każdego z izolatów. Jednocześnie izolaty wyosobnione z roślin z rodzaju *Rubus* i drzew z podrodziny *Pomoideae* tworzyły dwie grupy, przy czym podobieństwo między nimi, określone metodą UPGMA i wyrażone za pomocą współczynnika Nei-Li wynosiło około 0,7 [54]. Te same startery zastosowali B r e n n a n i wsp. [5] do badania izolatów pochodzących głównie z Irlandii. Wprawdzie podobieństwo większości uzyskanych profili wynosiło powyżej 0,9 (współczynnik Nei-Li, metoda UPGMA), to jednak niektóre z nich znacznie różniły się od pozostałych. Technika RAPD wykazała także wysoką jednorodność izolatów *E. amylovora*, pochodzących z innych rejonów geograficznych [32, 44, 72].

Technikę RAPD zastosowano również do badania zróżnicowania izolatów *E. amylovora* pochodzących z Polski. Badaniem objęto 64 izolaty, spośród których 50 izolowano w latach 1983–2002 z odmiennych roślin gospodarzy (jabłoń, grusza, pigwa, ognik, głóg i irga) z różnych rejonów kraju. Pozostałe 12 izolatów pochodziło z innych krajów europejskich, w tym 2 z Bliższego Wschodu. We wstępnych badaniach DNA wzorcowego izolatu 691 amplifikowano w reakcjach z 87 różnymi starterami RAPD (OPERON). Do dalszych badań wybrano 3 startery: U19, W20 i AR03, które w wyniku reakcji amplifikacji pozwalały na uzyskanie największej liczby produktów. Dodatkowo wykorzystano 2 startery CUGEA 1 i CUGEA 5, które zostały wcześniej opisane przez innych autorów jako umożliwiający różnicowanie izolatów *E. amylovora*. Na podstawie uzyskanych wyników stwierdzono, że różnicowanie izolatów *E. amylovora* umożliwiły jedynie startery AR03, CUGEA 1 i CUGEA 5, podczas gdy profile uzyskane w reakcji ze starterami W20 i U19 były jednakowe dla wszystkich izolatów. Przeprowadzone badania potwierdziły wysoką jednorodność testowanych izolatów *E. amylovora*, choć część z nich wykazywała znaczne różnice w wirulencji badanej zarówno na liściach jabłoni, jak i na pędach jabłoni, gruszy i głogu. Nie znaleziono również korelacji między zróżnicowaniem genetycznym izolatów a ich pochodzeniem geograficznym lub rośliną, z której zostały wyosobnione. Brak zróżnicowania badanych szczepów stwierdzono również na podstawie analizy restrykcyjnej fragmentu genu *amsB* (biorącego udział w produkcji specyficznego dla *E. amylovora* polisacharydu – amyloworanu) o długości około 1600 pz z użyciem gęsto tnących enzymów *BsuRI* i *HpaII*, [59].

### 3.2.5. Polimorfizm długości amplifikowanych fragmentów – AFLP

W prowadzonych we Włoszech badaniach epidemiologicznych posłużono się techniką AFLP (Amplified Fragment Length Polymorphism) [79]. Zastosowanie

tej techniki pozwoliło na stwierdzenie, że wystąpienie zarazy ogniowej w prowincjach Modena i Ferrara, było spowodowane jednym szczepem *E. amylovora* [52]. Podobnie, analiza austriackich i węgierskich izolatów tej bakterii, wykonana w oparciu o technikę AFLP, nie wykazała między nimi żadnych różnic [32].

W Hiszpanii podjęto próbę rozróżnienia izolatów *E. amylovora* pochodzących z różnych krajów zarówno technikami tzw. odcisku palca (fingerprinting) ze starterami komplementarnymi do sekwencji powtarzalnych (tzw. Rep-PCR): ERIC, BOX, IS50 i starterem M13 oraz techniką AFLP. Spośród 23 testowanych izolatów 18 nie było rozróżnialnych z zastosowaniem rep-PCR. Na ich rozróżnienie pozwoliło natomiast zastosowanie AFLP z 6 kombinacjami starterów posiadających po 1 nukleotydzie różnicującym. Dla wszystkich, oprócz 2 szczepów, otrzymano unikalne kombinacje profili AFLP [61]. Poszerzone badania nad charakterystyką zarówno fenotypową, jak i genotypową 63 szczepów wyizolowanych w różnych rejonach Hiszpanii potwierdziły, że spośród wszystkich technik największe rozróżnienie uzyskano przy zastosowaniu AFLP. Technika ta pozwoliła na rozróżnienie bakterii w zależności od ich pochodzenia geograficznego. Uzyskane wyniki wskazują, że nowe ogniska zarazy ogniowej w Hiszpanii są efektem wielokrotnego wprowadzenia zakażonego materiału roślinnego lub innych źródeł inokulum z różnych państw Europy [14].

### 3.2.6. Elektroforeza w zmiennym polu elektrycznym – PFGE

Obiecujące wyniki uzyskano stosując technikę PFGE [36] (Pulsed Field Gel Electrophoresis) [2, 29, 83, 84]. Technika ta pozwoliła na wyróżnienie wśród europejskich izolatów *E. amylovora* 6 typów i przedstawienie hipotetycznych dróg rozprzestrzeniania się choroby: z Wysp Brytyjskich do Europy Środkowej; z Wysp Brytyjskich do Francji i dalej, na Półwysep Iberyjski oraz do północnych Włoch, z zachodniej Francji do północno-wschodniej Hiszpanii, z Egiptu, przez Bliski Wschód do Azji Mniejszej i na Bałkany [2, 29, 83, 84].

W przeciwieństwie do szczepów europejskich, profile PFGE szczepów pochodzących z Ameryki Północnej były dużo bardziej zróżnicowane. Europejskie izolaty można zaklasyfikować do 6 różnych grup na podstawie profili restrykcyjnych, natomiast wśród północnoamerykańskich izolatów tylko część miała profil identyczny, jak izolaty *E. amylovora* pochodzące z północy Hiszpanii, zachodniej Francji i Anglii. Inna grupa była identyczna jak izolaty z Europy Centralnej, a pozostałe charakteryzowały się profilami o dużym stopniu zróżnicowania, niespotykanymi w Europie. Ta obserwacja doprowadziła do hipotezy, że zaraza ogniowa rozprzestrzeniła się po świecie „uciekając” z Ameryki Płn. tylko kilka razy [29]. Na jeszcze większe rozróżnienie bakterii pozwoliło badanie liczby SSR plazmidu pEA29. Liczba tych

Tabela I

Zróżnicowanie izolatów *E. amylovora* na podstawie analizy ich DNA chromosomalnego

Metoda	Wynik	Piśmiennictwo
Rep-PCR	Odróżnienie izolatów z roślin rodzaju <i>Rubus</i> od izolatów z rodziny <i>Pomoidae</i>	[49]
	Nieliczne produkty polimorficzne posłużyły do opracowania starterów amplifikujących markerowe fragmenty DNA	[60]
	18 z 23 izolatów z Hiszpanii nie było rozróżnialnych	[61]
Rybotypowanie	Odróżnienie izolatów z roślin rodzaju <i>Rubus</i> od izolatów z rodziny <i>Pomoidae</i>	[25, 28, 55]
	Niewielkie zróżnicowanie wśród izolatów z drzew owocowych	[20]
RFLP genomu + hybrydyzacja z sondą komplementarną do genów <i>hrp</i>	Odróżnienie izolatów z roślin rodzaju <i>Rubus</i> od izolatów z rodziny <i>Pomoidae</i> . Jednorodny izolaty z drzew owocowych, natomiast z <i>Rubus</i> – 2 grupy	[33]
RFLP genomu + PFGE	Wyróżnienie wśród europejskich izolatów <i>E. amylovora</i> 6 typów i przedstawienie hipotetycznych dróg rozprzestrzeniania się choroby do różnych krajów	[2, 29, 83, 84]
	Duże zróżnicowanie wśród izolatów z Ameryki Północnej	[29]
RFLP <i>recA</i> , <i>gyr</i> , <i>rpoS</i>	5 izolatów spośród 12 zostało odróżnionych tylko na podstawie genu <i>recA</i>	[80]
RFLP <i>amsB</i>	Brak zróżnicowania wśród 14 izolatów pochodzących z Polski	[59]
RAPD	Rozróżnienie wszystkich spośród 16 badanych izolatów. Odróżnienie izolatów z roślin rodzaju <i>Rubus</i> od izolatów z rodziny <i>Pomoidae</i> .	[54]
	Duża jednorodność wśród badanych izolatów	[5, 32, 44, 59, 72]
AFLP	Brak rozróżnienia wśród izolatów pochodzących z Modeny i Ferrary (Włochy)	[52]
	Brak różnic wśród izolatów pochodzących z Węgier	[32]
	Rozróżnienie izolatów, zależnie od ich pochodzenia geograficznego w Hiszpanii	[14, 61]

powtórzeń była dużo bardziej zróżnicowana niż profile PFGE lecz z nimi nie korelowała. Również analiza sekwencji genu *hrpN* kodującego harpinę, jak i sekwencji aminokwasowej tego białka wydedukowanej na podstawie sekwencji nukleotydów, potwierdziła większą różnorodność szczepów amerykańskich niż europejskich, których sekwencje tego genu były prawie identyczne [30]. Badania przeprowadzone przez Giorgi i Scortichini [23] z izolatami europejskimi, jak i pochodzącymi spoza Europy, również potwierdziły większe zróżnicowanie genu *hrpN* u bakterii wyizolowanych w Ameryce Północnej, gdzie zaraza ogniowa była wykryta i opisana po raz pierwszy na świecie. Zarówno w przypadku analizy genu *hrpN*, jak i rejonu genów *dspA/E* kodujących czynniki wirulencji, obserwowano znaczne różnice w profilach RFLP oraz sekwencjach między szczepami izolowanymi z roślin rodzajów *Amelanchier* i *Rubus*, a bakteriami pochodzącymi z roślin należących do rodziny *Maloidae* [23].

#### 4. Podsumowanie

Szczepy bakterii *Erwinia amylovora*, chociaż zróżnicowane pod względem wirulencji, należą do jednego z bardziej homogennych pod względem biochemicznym i genetycznym gatunków. Wyraźne różnice zaobserwowano jedynie między izolatami pochodzącymi z malin i jeżyn, a izolatami wyisobnionymi z jabłoni i grusz oraz innych roślin-gospodarzy (Tabela I). W rejonach, gdzie stosowano środki na bazie streptomycyny przeciwko zarazie ogniowej, u części szczepów zaobserwowano pojawienie się oporności na ten antybiotyk. Zależnie od rodzaju mechanizmu odpowiedzialnego za oporność, bakterie podzielono na szczepy o wysokiej i średniej oporności. Badania nad zróżnicowaniem genetycznym *E. amylovora* wykazały większą różnorodność wśród szczepów pochodzących z Ameryki Północnej, gdzie zarazę ogniową opisano po raz pierwszy, niż wśród szczepów europejskich. Najnowsze badania wykazują, że bakterie *E. amylovora* mogą się różnić zawartością DNA plazmidowego. Co więcej, niektóre plazmidy, jak odkryty w Hiszpanii pEI70, mogą nieść ze sobą geny istotne dla patogeniczności bakterii inne niż dotychczas poznane odpowiedzialne za syntezę: egzopolisacharydów, sideroforów, białek np. harpiny. Pomimo znacznego postępu w badaniach funkcji poszczególnych genów ich całościowe znaczenie nie zostało dotychczas rozpoznane. Wykorzystywane coraz powszechniej nowoczesne techniki, np. Real-time PCR, powinny dostarczyć więcej informacji na temat genów *E. amylovora* związanych z patogenicznością i wirulencją bakterii.

#### Piśmiennictwo

- Asselin J.E., Yip K.N., Beer S.V.: *eopI* differs in strains of *Erwinia amylovora* that differ in host specificity. *Acta Hort.* **793**, 213–214 (2008)
- Bazzi C., Merighi M., Lopez M.M., Zhang Y., Jock S., Geider K.: Differentiation of *Erwinia amylovora* strains isolated in southern Europe by PFGE analysis. *Acta Hort.* **489**, 197–200 (1999)
- Bereswill S., Bugert P., Bruchmüller I., Geider K.: Identification of fire blight pathogen, *Erwinia amylovora*, by PCR assays with chromosomal DNA. *Appl. Environ. Microbiol.* **61**, 2636–2642 (1995)
- Bereswill S., Pahl A., Bellemann P., Zeller W., Geider K.: Sensitive and species-specific detection of *Erwinia amylovora* by polymerase chain reaction analysis. *Appl. Environ. Microbiol.* **58**, 3522–3526 (1992)
- Brennan J.M., Doohan F.M., Egan D., Scanlan H., Hayes D.: Characterisation and differentiation of Irish *Erwinia amylovora* isolates. *J. Phytopathology*, **150**, 414–422 (2002)
- Brown E.W., Janisiewicz W., Van der Zwet T.: Preliminary phenotypic and genetic differentiation of the fire blight bacterium, *Erwinia amylovora*. *Acta Hort.* **411**, 199–203 (1996)
- Cabrefiça J., Montesinos E.: Analysis of aggressiveness of *Erwinia amylovora* using disease-dose and time relationships. *Phytopath.* **95**, 1430–1437 (2005)
- Casano F.J.: Effect of growth medium and physiological age on the fatty acid analysis of *Erwinia amylovora*. *Acta Hort.* **217**, 41–42 (1986)
- Chiou Ch-S., Jones A.L.: The analysis of plasmid-mediated streptomycin resistance in *Erwinia amylovora*. *Phytopath.* **81**, 710–714 (1991)
- Chiou C.S., Jones A.L.: Nucleotide sequence analysis of a transposon (Tn5393) carrying streptomycin resistance genes in *Erwinia amylovora* and other gram-negative bacteria. *J. Bacteriol.* **175**, 732–740 (1993)
- Chiou C-S, Jones A.L.: Molecular analysis of high-level streptomycin resistance in *Erwinia amylovora*. *Phytopath.* **85**, 324–328 (1995)
- Coyier D.L., Covey R.P.: Tolerance of *Erwinia amylovora* to streptomycin sulphate in Oregon and Washington. *Plant Disease Report*, **59**, 849–852 (1975)
- De Lay J., Vantomme R., Swings J., Kersters K., Rijckaert C., Goor M., Mergaert J., Green J.: Research report on *Erwinia amylovora*. *Acta Hort.* **151**, 241–248 (1984)
- Donat V., Biosca E.G., Peñalver J., López M.M.: Exploring diversity among Spanish strains of *Erwinia amylovora* and possible infection sources. *J Appl Microbiol.* **103**, 1639–1649 (2007)
- Dye D.W.: A numerical taxonomic study of the genus *Erwinia*. *New Zealand J. Agric. Res.* **24**, 223–229 (1981)
- El-Goorani M.A., El-Kasheir H.M.A., Shoeib A.A., Hasanein F.M.: Distribution of Streptomycin Resistant Strains of *Erwinia amylovora* in Egypt during 1988. *J. Phytopath.* **127**, 69–74 (1989)
- Evans I.R.: Fire blight of raspberries in Alberta. *Acta Hort.* **411**, 69–72 (1996)
- Falkenstein H., Bellemann P., Walter S., Zeller W., Geider K.: Identification of *Erwinia amylovora*, the fireblight pathogen, by colony hybridisation with DNA from plasmid pEA29. *Appl. Env. Microbiol.* **54**, 2798–2802 (1988)
- Foster G.C., McGhee G.C., Jones A.L., Sundin G.W.: Nucleotide sequences, genetic organization, and distribution of pEU30 and pEL60 from *Erwinia amylovora*. *Appl. Environ. Microbiol.* **70**, 7539–7544 (2004)

20. Garbeva P., Crepel C., Maes M.: Genomic variation within the *Erwinia amylovora* species. *Med. Fac. Landbouww. Univ. Gent.* **62/3b**, 937–942 (1997)
21. Garrett C.M.E., Blake P.S., Fletcher D.A., Austin D.J.: Preliminary discrimination of *Erwinia amylovora* strains by fatty acid profiling. *Acta Hort.* **217**, 63–69 (1987)
22. Geider K.: Exopolysaccharides of *Erwinia amylovora*: structures, biosynthesis, regulation, role in pathogenicity of amylovoran and levan (w) Fire blight. The disease and its causative agent, *Erwinia amylovora* red. Vanneste J.L. CABI Publ., Wallingford, U.K., 2000, s. 141–162
23. Giorgi S., Scortichini M.: Molecular characterization of *Erwinia amylovora* strains from different host plants through RFLP analysis and sequencing of *hrpN* and *dspA/E* genes. *Plant Pathol.* **54**, 789–798 (2005)
24. Greenberg J.T.: Programmed cell death: a way of life for plants. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **93**, 12094–12097 (1996)
25. Gürtler V., Stanisich V.A.: New approaches to typing and identification of bacteria using the 16S-23S rDNA spacer region. *Microbiology*, **142**, 3–16 (1996)
26. Hevesi M., Papp J., Jámbor-Benczúr E., Kaszáné-Csizsár K., Pozsgai I., Gazdag G., Balla I.: Testing the virulence of some Hungarian *Erwinia amylovora* strains on *in vitro* cultured apple rootstocks. *Int. J. Hort. Sci.* **6**, 52–55 (2000)
27. Holt J.G., Krieg N.R., Sneath P.H.A., Stanley J.T., Williams S.T.: *Bergey's Manual of Determinative Bacteriology*. Ninth Edition. Williams & Wilkins, Baltimore, Maryland, USA 1994, s. 787
28. Jeng R.S., Belivera L., Hubbes M., Svircev A.M., Myers A.L.: The use of 16S and 16S-23S rRNA internal transcribed spacers to detect and differentiate *Erwinia amylovora*. *Acta Hort.* **489**, 49–54 (1999)
29. Jock S., Donat V., López MM., Bazzi C., Geider K.: Following spread of fire blight in Western, Central and Southern Europe by molecular differentiation of *Erwinia amylovora* strains with PFGE analysis. *Environ. Microbiol.* **4**, 106–114 (2002)
30. Jock S., Geider K.: Molecular differentiation of *Erwinia amylovora* strains from North America and of two Asian pear pathogens by analyses of PFGE patterns and *hrpN* genes. *Environ. Microbiol.* **6(5)**, 480–490 (2004)
31. Jock S., Jacob T., Kim W.-S., Hildebrand M., Vosberg H.-P., Geider K.: Instability of short-sequence DNA repeats of pear pathogenic *Erwinia* strains from Japan and *Erwinia amylovora* fruit tree and raspberry strains. *Mol. Gen. Genomics*, **268**, 739–749 (2003).
32. Keck M., Hevesi M., Ruppitsch W., Ströger A., Richrer S.: Spread of fire blight in Austria and Hungary – variability of *Erwinia amylovora* strains. *Plant Prot. Sci.* **38**, Special Issue, **1**, 49–55 (2002)
33. Kim J.H., Beer S.V., Zumoff C.H., Laby H.L., Gustafson H.L., Aldwinckle H.S.: Characterization of *Erwinia amylovora* strains from different hosts and geographical areas. *Acta Hort.* **411**, 183–185 (1996)
34. Kim, W.S., Rhim, S.L., Völksch, B., Gardan, L., Paulin, J.P., Jock, S., Geider, K.: Characterization of a new *Erwinia* species affecting Asian pear trees. *Acta Hort.* **489**, 201–205 (1999)
35. Kim W.S., Geider K.: Analysis of variable short-sequence DNA repeats on the 29kb plasmid of *Erwinia amylovora*. *Europ. J. Plant Path.* **103**, 703–713 (1999)
36. Kur J.: *Podstawy inżynierii genetycznej. Teoria, ćwiczenia, testy.* Wyd. Politechniki Gdańskiej, Gdańsk, 1994, s. 227
37. Lecomte P., Manceau Ch., Paulin J-P., Keck M.: Identification by PCR analysis on plasmid pEA29 of isolates of *Erwinia amylovora* responsible of an outbreak in Central Europe. *Europ. J. Plant. Path.* **103**, 91–98 (1997)
38. Llop P., Bonaterra A., Peñalver J., López M.M.: Development of a highly sensitive nested-PCR procedure using single closed tube for detection of *Erwinia amylovora* in asymptomatic plant material. *Appl. Env. Microbiol.* **66**, 2071–2078 (2000)
39. Llop P., Donat V., Rodríguez M., Cabrefiga J., Ruz L., Palomo J.L., Montesinos E., López M.M.: An indigenous virulent strain of *Erwinia amylovora* lacking the ubiquitous plasmid pEA29. *Phytopath.* **96**, 900–907 (2006)
40. Llop P., González R., Pulawska J., Bultreys A., Dreó T., López M.M.: The new plasmid pEI70 is present in *Erwinia amylovora* European strains. *Acta Hort.* **793**, 131–136 (2008)
41. Louws F.J., Rademaker J.L.W., Bruijn F.J.: The three Ds of PCR-based genomic analysis of phyto bacteria: Diversity, Detection, and Disease Diagnosis. *Ann. Rev. Phytopath.* **37**, 81–125 (1999)
42. Lupski J.R., Weinstock G.M.: Short, interspersed repetitive DNA sequences in prokaryotic genomes. *J. Bacteriol.* **174**, 4525–4529 (1992)
43. Łojkowska E.: *Diagnostyka molekularna roślin (w) Biotechnologia Roślin*, red. S. Malepszy, Wyd. Naukowe PWN, Warszawa, 2001, s. 462–485
44. Manulis S., Kleitman F., Dror O., Davis I., Zutra D.: Characterisation of *Erwinia amylovora* population in Israel. *Phytoparasitica*, **26**, 39–46 (1998)
45. Manulis S., Zutra D., Ga'ash D., Kleitman F., Dror O., Elisha S., David I., Rav-David D., Zilberstaine M., Herzog Z., Shabi E.: Streptomycin resistance of *Erwinia amylovora* in Israel and occurrence of blossom blight in the autumn. *Phytoparasitica*, **24**, 161 (1996)
46. McGhee G.C., Jones A.L.: Complete nucleotide sequence of ubiquitous plasmid pEA29 from *Erwinia amylovora* strain ea88: gene organisation and interspecies variation. *Appl. Environ. Microbiol.* **66**, 4897–4907 (2000)
47. McManus P.S., Jones A.L.: Epidemiology and genetic analysis of streptomycin resistant *Erwinia amylovora* from Michigan and evaluation of oxytetracycline for control. *Phytopath.* **84**, 627–633 (1994)
48. McManus P.S., Jones A.L.: Detection of *Erwinia amylovora* by nested PCR, PCR-dot-blot and reverse-blot hybridisation. *Phytopath.* **85**, 618–623 (1995)
49. McManus P.S., Jones A.L.: Genetic fingerprinting of *Erwinia amylovora* strains isolated from tree-fruit crops and *Rubus* spp. *Phytopath.* **85**, 1547–1553 (1995)
50. Mergaret J., Verdonock L., Kersters K., Swings J., Boeufgras J-M., de Lay J.: Numerical taxonomy of *Erwinia amylovora* species using API systems. *J. Gen. Microbiol.* **130**, 1893–1910 (1984)
51. Miller T.D., Schroth M.N.: Monitoring the epiphytic population of *Erwinia amylovora* on pear with selective medium. *Phytopath.* **62**, 1175–1182 (1972)
52. Minardi T.F., Stefani P., Mazzucchi U.: *Erwinia amylovora* isolates associated with 1997 fireblight epidemic in the Po Valley derived from the same clone (w) Book of Abstracts 9<sup>th</sup> Congress Europ. Foundation for Plant Pathology, "Biodiversity in Plant Pathology", Taromina, 18 September 2000, s. 37
53. Momol M.T., Aldwinckle H.S.: Genetic diversity and host range of *Erwinia amylovora* (w) Fire blight. The disease, and it's casual agent *Erwinia amylovora*. CABI Publ. Wallingford UK, 2000, s. 55–72.
54. Momol M.T., Momol E.A., Lamboy W.F., Norelli J.L., Beer S.V. Aldwinckle H.S.: Characterisation of *Erwinia*



- amylovora* strains using random amplified polymorphic DNA fragments (RAPDs). *J. Appl. Microbiol.* **82**, 339–398 (1997)
55. Momol E.A., Momol M.T., Norelli J.L., Beer S.V., Burr T.J., Aldwinckle H.S.: Relatedness of *Erwinia amylovora* strains based on amplified 16S-23S ribosomal DNA restriction enzyme analysis-ARDREA. *Acta Hort.* **489**, 55–59 (1999)
  56. Norelli J.L., Aldwinckle H.S., Beer S.V.: Differential susceptibility of *Malus* spp. Robusta 5, Novole, and Ottawa 523 to infection by *Erwinia amylovora*. *Plant Dis.* **70**, 1017–1019 (1986)
  57. Palmer E. L., Teviotdale B. L., Jones A. L.: A relative of the broad-host-range plasmid RSF1010 Detected in *Erwinia amylovora*. *Appl. Environ. Microbiol.* **63**, 4604–4607 (1997)
  58. Paulin J.P.: *Erwinia amylovora*: general characteristic (w) Fire blight. The disease, and its casual agent *Erwinia amylovora*. CABI Publ. Wallingford UK, 2000, s. 87–115.
  59. Puławska J., Kielak K., Sobiczewski P.: Study of phenotypic and genetic diversity of selected Polish *Erwinia amylovora* strains. *Acta Hort.* **704**, 439–444 (2006)
  60. Rico A., Fuhrer M.E., Ortiz-Barredo A., Murillo J.: Polymerase Chain Reaction Fingerprinting of *Erwinia amylovora* has a Limited Phylogenetic Value but Allows the Design of Highly Specific Molecular Markers. *Phytopath.* **98**, 260–269 (2008)
  61. Rico A, Ortiz-Barredo A, Ritter E, Murillo J.: Genetic characterization of *Erwinia amylovora* strains by amplified fragment length polymorphism. *J. Appl. Microbiol.* **96**, 302–210 (2004)
  62. Ries S.M., Otterbacher A.G.: Occurrence of fire blight on thornless blackberry in Illinois. *Plant Dis. Rep.* **61**, 232–235 (1977)
  63. Ruppitsch W., Stoeger A., Keck M.: Stability of short sequence repeats and their application for the characterization of *Erwinia amylovora* strains. *FEMS Microbiol. Lett.* **234**, 1–8 (2004)
  64. Saad A.T., Hana L., Choueiri E.: Evaluation of streptomycin and oxytetracycline resistance of *Erwinia amylovora* populations in Lebanon. *Phytopath.* **90**, S68 (2000)
  65. Schatz A., Bugie E., Waksman S.A.: Streptomycin, a substance exhibiting antibiotic activity against Gram-positive and Gram-negative bacteria. *Proc. Soc. Exp. Biol. Med.* **55**, 66–69 (1944)
  66. Schnabel E.L., Jones A.L.: Instability of pEA29 marker in *Erwinia amylovora* previously used for strain classification. *Plant Dis.* **82**, 1334–1336 (1998)
  67. Sholberg P.L., Bedford K.E., Haag P., Randall P.: Survey of *Erwinia amylovora* isolates from British Columbia for resistance to bactericides and its virulence on apple. *Can. J. Pl. Path.* **23**, 60–67 (2001)
  68. Schwartz T., Brenhard F., Theiler R., Geider K.: Diversity of the fire blight pathogen in production of dihydrophenylalanine, a virulence factor of some *Erwinia amylovora* strains. *Phytopath.* **81**, 873–878 (1991)
  69. Schroth M.N., Thomson S.V., Moller W.J.: Streptomycin resistance in *Erwinia amylovora*. *Phytopath.* **69**, 565–568 (1979)
  70. Sobiczewski P., Berczynski S., Streptomycin for control of fire blight (*Erwinia amylovora*) in Poland. *Phytopath. Pol.* **20**, 171–174 (2000)
  71. Starr M.P., Cardona C., Folsom D.: Bacterial fire blight of raspberry. *Phytopath.* **41**, 915–919 (1951)
  72. Taylor R.K., Hale C.N.: Identification and characterisation of isolates of *Erwinia amylovora* from cotoneaster in Australia. *Austr. Biotechnol.* **6**, 353–356 (1998)
  73. Thomson S.V., Gouk S.C., Vanneste J.L., Hale C.N., Clark R.G.: The presence of streptomycin resistant strains of *Erwinia amylovora* in New Zealand. *Acta Hort.* **338**, 223–230 (1993)
  74. Ugorski M., Chmielewski R.: Powtórzone sekwencje DNA typu REP i ERIC u bakterii – znaczenie diagnostyczne. *Post. Hig. Med. Doś.* **54**, 3–15 (2000)
  75. Van der Zwet T., Keil H.L.: Fire blight – a bacterial disease of rosaceous plants. Agric. Handbook 510, U.S. Dept. of Agriculture, Washington D.C., 1979, s. 200.
  76. Van der Zwet T., Wells J.M.: Application of fatty acid class analyses for the detection and identification of *Erwinia amylovora*. *Acta Hort.* **338**, 233 (1993)
  77. Vantomme R., Swings J., Goor M., Kersters K., De Ley J.: Phytopathological, serological, biochemical and protein electrophoresis characterisation of *Erwinia amylovora* strains isolated in Belgium. *Phytopath. Z.* **103**, 349–360 (1982)
  78. Versalovic J., Koeuth T., Lupski J.R.: Distribution of repetitive DNA sequences in eubacteria and application to fingerprinting of bacterial genomes. *Nucleic Acids Res.* **19**, 6923–6831 (1991)
  79. Vos P., Hogers R., Bleeker M., Reijans M., van de Lee T., Hornes M., Frijters A., Pot J., Peleman J., Kuiper M., Zabeau M.: AFLP: a new technique for DNA fingerprinting. *Nucleic Acids Res.* **23**, 4407–4414 (1995)
  80. Waleron M., Waleron K., Geider K., Łojkowska E.: Application of RFLP analysis of *recA*, *gyrA* and *rpoS* gene fragments for rapid differentiation of *Erwinia amylovora* from *Erwinia* strains isolated in Korea and Japan. *Eur. J. Plant Pathol.* **121**, 161–172 (2008)
  81. Waleron M., Waleron K., Podhajska A.J., Łojkowska E.: Molecular comparison of pathogenic bacteria from pear trees in Japan and the fire blight pathogen *Erwinia amylovora*. *Microbiology* **147**, 2951–2959 (2002)
  82. Williams J.G.K., Kubelik A.R., Livak K.J., Rafalski J.A., Tingey S.V.: DNA polymorphism amplified by arbitrary primers are useful as genetic markers. *Nucleic Acid Res.* **18**, 6531–6535 (1990)
  83. Zhang Y., Geider K.: Differentiation of *Erwinia amylovora* strains by pulsed-field gel electrophoresis. *Appl. Environ. Microb.* **63**, 4421–4426 (1997)
  84. Zhang Y., Merighi M., Bazzi C., Geider K.: Genomic analysis by pulsed-field gel electrophoresis of *Erwinia amylovora* strains from the Mediterranean region including Italy. *J. Plant Path.* **80**, 225–232 (1998)
  85. Żarnowski R., Lewicka T., Ellis R.J.: Evaluation of natural diversity among *Erwinia amylovora* isolates on the basis of total cellular protein and fatty acid patterns. *Acta Hort.* **590**, 185–192 (2002)