

KARAKTERIZACIJA SLOVENSКИH IZOLATOV *Pectobacterium* IN *Dickeya* spp. IZ KROMPIRJA

Tanja DREO¹, Tina NAGLI², Matjaž PETERKA³, Maja RAVNIKAR⁴

^{1,4} Nacionalni inštitut za biologijo, Oddelek za biotehnologijo in sistemsko biologijo, Ljubljana in Center odli nosti za biosenzoriko, instrumentacijo in procesno kontrolo, Solkan
^{2,3} Center odli nosti za biosenzoriko, instrumentacijo in procesno kontrolo, Solkan

IZVLE EK

Pektinoliti ne bakterije rodov *Pectobacterium* in *Dickeya* spp. (ex *Erwinia chrysanthemi*) povzro ajo gnitje rastlin in njihovih plodov in lahko resno vplivajo na donosnost pridelave in skladiš no kakovost krompirja. V zadnjem desetletju so bili na krompirju najpogostejši izolati *D. dianthicola*, poleg njih so se pojavljali tudi agresivnejši izolati, ki so zaenkrat neuradno poimenovani kot '*D. solani*' in so se s pomo jo distribucije semenskega krompirja razširili po ve jem delu EU. Rezultati novjših raziskav iz Nizozemske in Belgije kažejo na to, da se te bakterije lahko v velikem obsegu pojavljajo in so zastopane tudi v pridelavi semenskega krompirja. Velik delež semenskega krompirja, ki se uporablja v Sloveniji, izvira iz držav, ki imajo težave z bakterijskimi mehкими gnilobami, zato ni presenetljivo, da so gnilobe pogostejše in bolj izrazite tudi pri nas. V prispevku predstavljamo karakterizacijo bakterij rodov *Dickeya* in *Pectobacterium*, ki se pojavljajo v Sloveniji, s poudarkom na izolatih iz krompirja.

125

Ključne besede: bakterijska gniloba, *Dickeya*, krompir, PCR v realnem času, *Pectobacterium*, sekvenciranje DNA

ABSTRACT

CHARACTERIZATION OF SLOVENIAN *PECTOBACTERIUM* AND *DICKEYA* ISOLATES FROM POTATO

Pectinolytic bacteria of *Pectobacterium* and *Dickeya* spp. (ex *Erwinia chrysanthemi*) cause rotting of plants and their fruits and can seriously affect the profitability of production and storage quality of potatoes. *D. dianthicola* used to be the most common species occurring in potato. In the last decade, more aggressive isolates occurred that are tentatively and informally named as '*D. solani*' and have been spread across much of the EU by seed potatoes trade. Results of recent research from the Netherlands and Belgium suggest that these bacteria occur and are spread in seed potato production. Genus *Pectobacterium* also seems to be gaining in its importance in potato production. A large proportion of seed potatoes that is used in Slovenia come from countries that have problems with bacterial soft rots and so it is not surprising that soft rots are becoming more frequent and pronounced also in our country. In this contribution we present the characterization of bacterial isolates of genera *Dickeya* and *Pectobacterium* isolated in Slovenia with an emphasis on potato isolates.

¹ dr. biotehn. znan., Večna pot 111, SI-1000 Ljubljana in Velika pot 22, SI-5250 Solkan

² dipl. uni. mikrobiol., Velika pot 22, SI-5250 Solkan

³ dr. mikrobiol. znan., prav tam

⁴ dr. biol. znan., Večna pot 111, SI-1000 Ljubljana in Velika pot 22, SI-5250 Solkan

Key words: bacterial rot, *Dickeya*, DNA sequencing, *Pectobacterium*, potato, real-time PCR

1 UVOD

Gniloba krompirjevih rastlin in gomoljev za karantenskimi boleznimi krompirja povzro a največjo ekonomsko škodo. Gnilobo lahko povzroajo različni organizmi, med bakterijskimi se najpogosteje pojavljajo vrste rodu, ki se je v preteklosti imenoval *Erwinia* t.i. erwinije mehkih gnilob. Gnitje predvsem gomoljev pa lahko povzroajo tudi nekatere druge bakterije npr. *Pseudomonas*, *Bacillus*, *Clostridium*, *Aerobacter*, *Flavobacterium* in *Rhodococcus*. Vse te bakterije so sposobne oblikovati encime, ki razgrajujejo rastlinsko tkivo. *Pectobacterium* in *Dickeya* se smatrajo za najpomembnejše in najagresivnejše ter primarne patogene bakterije; medtem ko so bakterije ostalih rodov navadno sposobne le povzročiti razgradnjo tkiva, ko je do gnilobe že prišlo zaradi drugih vzrokov (Perombelon in Lowe, 1975).

Rod *Erwinia* je bil oblikovan leta 1920 (Winslow s sod., 1920). Sprva je veljalo, da je *Erwinia chrysanthemi* patogen krizantem (Burkholder s sod., 1953), kasneje pa se je izkazalo, da lahko okuži vrsto različnih rastlin (Samson s sod., 1987). Mnoge taksonomske spremembe tega rodu so vodile do današnje razvrstitve v rod *Pectobacterium* in *Dickeya* s šestimi podvrstami (*dianthicola*, *dadantii*, *zeae*, *chrysanthemi* (biovarja *chrysanthemi* in *parthenii*), *paradisiaca* in *dieffenbachiae*; Samson s sod., 2005). Vrste se delno skladajo z razvrstitvijo v različne patovarje in kažejo določeno specializiranost na gostiteljske rastline. Novejše raziskave kažejo na pojav več drugih vrst rodu *Dickeya* (vključno z '*D. solani*') (Parkinson s sod., 2009; Slawiak s sod., 2009), vendar nobena od teh vrst še ni bila uradno opisana (EFSA Panel on Plant Health (PLH), 2013).

126

Izolati, ki so bili v preteklosti najpogostejši na krompirju v Evropi, večinoma pripadajo vrstam *D. dadantii*, *D. dianthicola* in *D. zeae*. Na krompirju so našli tudi izolate vrst *D. chrysanthemi* in *D. dieffenbachiae*.

V zadnjih letih se na različnih rastlinah v Evropi pojavljajo posebej agresivni izolati vrst *Dickeya*, ki so jih začasno poimenovali '*D. solani*'. Za te izolate je znano, da gnilobe povzročajo tako pri nizkih kot tudi pri visokih temperaturah in v pogojih različne vlage. Pri višjih temperaturah (nad 27 °C) so še posebej agresivni in s svojimi encimi hitro razgrajujejo gomolje in zelene dele rastlin (Toth s sod., 2011). Podatki kažejo, da so se ti izolati s krompirjem uspešno razširili po večini Evropskih držav (Toth s sod., 2011). Poleg '*D. solani*' so v nekaterih državah opazili večjo razširjenost gnilob, ki jih povzročajo bakterije rodu *Pectobacterium*. Prihaja tudi do širjenja bakterij med različnimi rastlinami in preskoka bakterij med gostitelji, npr. z japonskega hrena na krompir (*P. wasabiae* izvorno iz *Eutrema japonica*; Pitman s sod., 2010).

Izolati vrste s starim poimenovanjem *Erwinia chrysanthemi* so se že pred desetletji močno razširili in bili zato odstranjeni s karantenskih list, diagnostične metode pa se niso razvijale naprej. Za identifikacijo izolatov v skladu z novo taksonomsko razvrstitvijo v podvrste rodu *Dickeya* klasični pristopi ne zadostujejo. Njihova pravilna identifikacija temelji na molekularnih metodah, kot so PCR v realnem času (Brierley s sod., 2008) in sekvenciranje odsekov DNA (Parkinson s sod., 2009; Slawiak s sod., 2009; Van Vaerenbergh s sod., 2012).

V prispevku opisujemo uvedbo in preverjanje izbranih metod detekcije in identifikacije in njihovo uporabo na izolatih bakterij rodov *Pectobacterium* in *Dickeya* izoliranih iz različnih gostiteljskih rastlin mednarodno diagnostiko na Nacionalnem inštitutu za biologijo med leti 2001 in 2010. Poleg določanja genomskih odtisov z repetitivnim PCR (BOX-PCR; Versalovic s sod., 1994) in PCR v realnem času (Brierley s sod., 2008) smo za identifikacijo izolatov iz rodu *Dickeya* uvedli sekvenciranje gena *fliC* (Venkatesh s sod., 2006; Van Vaerenbergh s sod., 2012).

2 MATERIALI IN METODE

2.1 Bakterijski izolati

V študijo smo vklju ili izolate bakterij mehkih gnilob iz zbirke bakterij Nacionalnega inštituta za biologijo, nekatere sorodne izolate in referen ne izolate pomembnejših vrst iz drugih zbirk. Izolati iz zbirke NIB izvirajo iz vzorcev rastlin in gomoljev z bolezenskimi znamenji, ki smo jih analizirali v okviru službe za varstvo rastlin ali jih je v zbirko deponiral mag. Andrej Poto nik (Poto nik, 1993). Bakterije smo hranili na sistemu MicroBank™ pri temperaturi pod -76 °C. Bakterije smo gojili na trdnih gojiš ih King's B, PDA in CPG pri temperaturi 25-28 °C.

2.2 Izolacija DNA iz bakterij

Za izolacijo DNA smo bakterije namnožili na gojiš u CPG pri temperaturi 25 °C. Istost kulture smo preverili s pregledom morfologije zraslih kolonij. Iz kolonij smo pripravili bakterijske suspenzije v 0,01 M fosfatnem pufru z dodanim NaCl s približno koncentracijo bakterij 10⁹ celic/mL. DNA smo iz bakterijskih suspenzij izolirali s kuhanjem in iš enjem s Chelex-om 100 (Bio-Rad 142-2832). 1 mL bakterijske suspenzije smo vorteksirali in bakterije skoncentrirali v pelet s 5-minutnim centrifugiranjem pri 9900 g. Peletu smo nato dodali 300 µL sveže suspenzije Chelex-a v sterilni vodi (6 % w/v), vorteksirali, inkubirali 20 minut pri 56 °C, vorteksirali, inkubirali 8 minut pri 99 °C, vorteksirali 10 sekund, takoj ohladili na ledu in centrifugirali 7 minut pri 14000 g. Supernatant, ki vsebuje DNA, smo prenesli v novo mikrocentrifugirko in spektrofotometri no izmerili koncentracijo in istost DNA (Nanodrop, ThermoScientific). DNA smo umerili na koncentracijo 25 ng/µL in do uporabe shranili zamrznjeno pod -15 °C.

2.3 Repetitivni PCR (BOX-PCR)

Generi no metodo repetitivnega PCR smo izvedli po protokolu (Rademaker s sod., 1998) z uporabo BOX A1R. PCR smo izvajali na aparatu Applied Biosystems 9700 in pri tem uporabljali naslednje pogoje pomnoževanja: za etna denaturacija 2 minuti pri 95 °C, 35 ciklov iz 4 korakov (94 °C, 3 sekund; 92 °C, 30 sekund; 50 °C, 1 minuto; 65 °C, 8 minut) ter kon no podaljševanje 65 °C, 8 minut. Reakcijska mešanica v skupnem volumnu 25 µL je vsebovala: 12,65 µL vode primerne za molekularno biologijo, 5 µL 5xGitschier pufer, 0,2 µL BSA (20 mg/mL), 2,5 µL DMSO (100 %), 1,25 µL dNTP (100 mM), 1 µL za etnika BOX A1R (20 µM; sekvenca), 0,4 µL Taq Platinum polimearze (5U/µL; Invitrogen) in 2 µL vzorca (DNA). Produkta PCR smo lo ili s kapilarno elektroforezo z uporabo aparata Agilent 2100 Bioanalyzer in Agilent DNA 7500 chip-a. Rezultate smo analizirali s programom 2100 Expert (Agilent).

2.4 PCR v realnem asu za dolo anje in karakterizacijo bakterij mehkih gnilob

Bakterijsko DNA smo pomnoževali s tremi različnimi PCR v realnem asu, ki so bili razviti v laboratoriju FERA (Brierley s sod., 2008), v lo enih reakcijah: PEC, ECH in ECA. PEC detektira vse pektinoliti ne bakterije rodu *Erwinia* vklju no z *Erwinia chrysanthemi* in *Erwinia carotovora* subspecies *atroseptica*, *carotovora*, *betavascularum*, *oderifera* in *wasabiae*. ECH je specifi en za *Erwinia chrysanthemi* (*Dickeya* spp.), zazna vse znane biovarje in patovarje razen *E. chrysanthemi* pv. *paradisiaca* iz banan (zdaj *Dickeya paradisiaca*). ECA je specifi en za *Erwinia carotovora* subsp. *atroseptica* (*Pectobacterium atrosepticum*). PCR v realnem asu smo izvajali na aparatu ABI PRISM® 7900 HT Sequence Detection System (Applied Biosystems) in pri tem uporabljali univerzalne pogoje pomnoževanja [2 min 50 °C (aktivacija AmpErase® UNG), 10 min 95 °C (aktivacija AmpliTaq Gold polimearze), ki jima sled 45 ciklov sestavljenih iz dveh korakov (15 s pri 95 °C in 1 min pri 60 °C)]. Reakcijsko mešanico v skupnem volumnu 10 µL so sestavljali (kon ne koncentracije): 900 nm

oligonukleotidni za etniki (Eurofins MWG Operon), 200 nm sonda označena z barvilom FAM in dušilcem TAMRA (Eurofins MWG Operon), 1 × TaqMan® Universal PCR Master Mix (Applied Biosystems) in 2 µL DNA vzorca.

2.5 Sekvenciranje izbranih odsekov DNA (fliC)

Za analizo odnosov med izolati rodu *Dickeya* smo uporabili sekveniranje dela gena fliC (van Vaerenbergh, 2012). Fragment gena fliC smo pomnožili z oligonukleotidnimi za etniki za PCR, fliC-1 in fliC-2, ki so oblikovani na osnovi sekvence gena izolata 3937 vrste *Dickeya dadantii*. PCR smo izvajali na aparatu Applied Biosystems 9700 in pri tem uporabljali naslednje pogoje pomnoževanja: za etna denaturacija 4 minute pri 95 °C, 35 ciklov iz 3 korakov (95 °C, 30 sekund; 55 °C, 1 minuto; 72 °C, 45 sekund) ter končno podaljševanje 72 °C, 7 minut. Reakcijska mešanica v skupnem volumnu 25 µL je vsebovala: 19,8 µL vode primerne za molekularno biologijo, 2,5 µL 10xPCR reaction buffer with 20 mM MgCl₂ (Roche), 0,5 µL vsakega oligonukleotidnega za etnika (delovna koncentracija 10 µM), 0,2 µL FastStart Taq DNA polimeraze in 1 µL vzorca (izolirane DNA). PCR produkte smo ločili z nanosom celotnega reakcijskega volumna (25 µL) na 1 % agarozni gel z vključitvijo etidijevim bromidom. Produkte ustrezne velikosti smo izrezali iz gela in očistili z Montage Gel Extraction Kit (Millipore). Sekveniranje PCR produktov v obeh smereh smo izvedli pri GATC Biotech Lightrun Seq.

3 REZULTATI IN RAZPRAVA

128

V prispevku opisujemo uvedbo ter preverjanje metod detekcije in identifikacije za bakterije rodov *Pectobacterium* in *Dickeya* izoliranih iz različnih gostiteljskih rastlin med uradno diagnostiko na Nacionalnem inštitutu za biologijo med leti 2001 in 2010.

Z repetitivnim PCR smo uspeli določiti profil pri večini testiranih izolatov. Profili so bili zelo raznoliki in so omogočili razdelitev izolatov v tri večje skupine. V eni, dokaj homogeni skupini, najdemo več izolatov iz krompirja, ki so bili v Sloveniji izolirani med leti 2004 in 2009. Vsi ti izolati so bili s PCR v realnem času identificirani kot *Dickeya* spp. Homogenost profilov nakazuje, da imajo izolati zelo verjetno skupni izvor, kar se sklada z domnevo, da njihovemu širjenju botruje predvsem širjenje s semenskim krompirjem. V drugi homogeni skupini najdemo starejši izolat *P. atrosepticum* iz krompirja, dva izolata iz bujarice (*Pectobacterium* sp.) in izolat iz paradižnika (*Dickeya* sp.). Preostali izolati so imeli zelo raznolik profil, kar se sklada s podatki iz literature. Izredna raznolikost profilov tudi pomeni, da je generična metoda BOX-PCR, ki temelji na primerjavi dobljenega profila s profili izolatov, ki naj bi predstavljali raznolikost celotnega kompleksa/vrste, manj primerna za namene diagnostike.

Repetitivni PCR (BOX-PCR) se je po priporočilih izkazal za metodo, ki odraža veliko raznolikost bakterij teh rodov. Metoda temelji na identifikaciji novih izolatov s primerjanjem novega genskega odtisa z genskimi odtisi v naši knjižnici. Velika raznolikost določila njihove genske odtise pomeni, da je ta metoda identifikacije manj uporabna v praksi. Poleg težavne standardizacije metode, ki je nujna za ponovljivost določanja genskih odtisov, je verjetno, da bomo z analizo novih izolatov pogosto določili nove odtise, ki jih ne bomo mogli identificirati z obstoječo knjižnico. Kljub veliki raznolikosti, smo lahko z uporabo repetitivnega BOX-PCR med analiziranimi izolati identificirali dve večji skupini. To kaže na zelo verjeten skupen izvor izolatov obeh skupin.

S PCR v realnem času za določanje in razlikovanje rodov *Dickeya* in *Pectobacterium* (Brierley s sod., 2008) smo uspešno pomnožili DNA izolirano iz bakterij. Izolati, kot je npr. NIB Z 744, ki reagirajo s PEC in ECH, ne pa tudi z ECA, so identificirani kot *Dickeya* spp. Izolati, kot je NIB Z 1460, ki so pozitivni le v PEC PCR v realnem času, so identificirani kot

Pectobacterium (izlo ena je tudi možnost *P. atrosepticum*, ker je negativen rezultat ECA). Izolati, kot je NIB Z 1798, so identificirani kot *P. atrosepticum* in dajejo pozitiven signal tudi s PEC PCR v realnem asu.

Rezultati analize s PCR v realnem asu so pokazali, da trije izolati iz zbirke spadajo v vrsto *Pectobacterium atrosepticum*. Skupno osem izolatov bakterij mehkih gnilob izoliranih iz krompirja se uvrš a v rod *Dickeya*, skupaj z referen nim izolatom NIB Z 8 (NCPFB 402), ki je bil izoliran iz *Chenopodium morifolium* in izolatom iz paradižnika NIB Z 1436, ki smo ga izolirali v letu 2010. PCR v realnem asu ne razlikuje med posameznimi vrstami rodu *Dickeya*, zato na osnovi teh rezultatov ne moremo zaklju iti, v katero vrsto spadajo.

Sedem izolatov, ki smo jih izolirali iz krompirja v Sloveniji, se je skupaj z izolati iz drugih rastlin (bu a, ciklama, krizantema) uvrstilo v rod *Pectobacterium*, pri emer je izklju ena vrsta *P. atrosepticum*. Na osnovi pojavljanja tega rodu na krompirju gre najverjetneje za vrsto *Pectobacterium carotovorum*, vendar niso izklju ene tudi druge vrste tega rodu (npr. *P. wasabie*, *P. brasiliensis*, *P. betavascularum*)

Z analizo manjšega števila drugih bakterij, ki imajo zapis za pektinoliti ne encime in le-te v ustreznih razmerah tudi tvorijo, smo pokazali, da opisani PCR v realnem asu z njimi ne reagirajo navzkrižno.

PCR v realnem asu, ki je bil razvit še na osnovi starejše taksonomske razdelitve bakterijskih povzro iteljev mehkih gnilob, se je izkazal za zelo uporabnega za detekcijo in identifikacijo širših skupin: *P. atrosepticum*, *P. carotovorum* (vse vrste razen *P. atrosepticum*) in rodu *Dickeya*. Poleg hitre in natan ne identifikacije, PCR v realnem asu omogo a kvantifikacijo teh bakterij, kar bi bilo pomembno pri uvedbi metode za analizo kvalitete semenskega krompirja torej dolo anja koncentracije teh bakterij tudi v prikriti obliki.

129

Z uporabo PCR v realnem asu smo potrdili, da so pri nas v krompirju zastopani izolati vseh treh skupin, ki jih dolo amo z izbranim PCR v realnem asu, pri emer smo ve ino izolatov iz krompirja (8/14, 57 %) identificirali kot *Dickeya* spp. V ostalih gostiteljskih rastlinah smo dolo ili skupine *Dickeya* spp. (v enem vzorcu paradižnika) in *P. carotovorum* (bu a, ciklama, krizantema; mogo e vse vrste razen *P. atrosepticum*).

Natan no identifikacijo izolatov rodu *Dickeya* do vrste je od uvedenih metod omogo ila le metoda sekvenciranja dela gena *fliC* (Van Vaerenbergh s sod., 2012). Z njo smo potrdili, da je vseh sedem analiziranih izolatov *Dickeya* spp. prakti no identi nih referen nemu izolatu '*Dickeya solani*', medtem ko se na ve nukleotidnih mestih razlikujejo od referen nih izolatov ostalih vrst tega rodu. Rezultat potrjuje, da so ti, še posebej agresivni izolati, zastopani v slovenski pridelavi krompirja že vsaj od leta 2001 naprej. Identifikacija teh izolatov kot '*Dickeya solani*' se sklada s pojavljanjem izrazitejših gnilob (Anon, 2006) na poljih in kaže na pomembnost spremljanja pojavljanja novih izolatov v pridelavi krompirja.

Za razliko od ostalih molekularnih metod je metoda sekvenciranja gena *fliC* generi na za ta rod in omogo a ne le detekcijo že znanih vrst temve tudi pojav novih razli kov, kot so '*Dickeya solani*' in nekateri razli ki iz okrasnih rastlin (UDL-3 in UDL-4).

4 SKLEPI

Rezultati potrjujejo, da so poleg rodu *Pectobacterium* v slovenski pridelavi krompirja zastopani tudi še posebej agresivni izolati iz rodu *Dickeya*, '*Dickeya solani*'. Ti se pojavljajo vsaj od leta 2001 naprej. Potrditev teh izolatov se sklada s pojavljanjem izrazitejših gnilob na poljih in kaže na pomembnost spremljanja pojavljanja novih izolatov v pridelavi krompirja. Prilagoditev diagnosti nih in identifikacijskih metod je bila nujna za nadaljnje uspešno, zanesljivo in hitro identifikacijo vrst v skladu s spremenjeno taksonomijo, ki je bivšo vrsto *Erwinia chrysanthemi* razdelila na šest vrst znotraj rodu *Dickeya*.

5 ZAHVALA

Rastlinski material, iz katerega smo izolirali bakterije uporabljene v tej študiji, je bil nabran v okviru uradnega nadzora zdravja rastlin, ki sta ga izvajali Uprava za varno hrano, veterinarstvo in varstvo rastlin RS. Posebej se zahvaljujemo vzor evalcema mag. Andreju Poto niku, ki je prispeval tudi nekatere referen ne izolate, in g. Marjanu Južniku in Petru Dolni arju (Kmetijski inštitut Slovenije) za vzor enje, vse koristne informacije s terena in odgovore na vprašalnik o pojavljanju mehkih gnilob v Sloveniji v letu 2006. Za tehni no in laboratorijsko pomo se zahvaljujemo dr. Mancu Pirc, Špeli Prijatelj Novak, Lidiji Mati i , Jani Erjavec in Alešu Blatniku. Raziskavo sta financirala UVHVVR in Center odli nosti COBIK.

6 LITERATURA

- Anon. 2006. Questionnaire on *Erwinia chrysanthemi* occurrence in Slovenia.
- Brierley, J, A Lees, A Hilton, S Wale, J Peters, J Elphinstone, and N Boonham. Improving decision making for the management of potato diseases using real-time diagnostics. Final report, 2008. http://www.potato.org.uk/sites/default/files/%5Bcurrent-page%3Aarg%3A%3F%5D/20086%20Diagnostics%20Final%20Report%20R253_0.pdf.
- Burkholder W, McFadden LA and Dimock E, 1953. A bacterial blight of chrysanthemums. *Phytopathology*, 43, 522–526.
- EFSA Panel on Plant Health (PLH). Scientific Opinion on the risk of *Dickeya dianthicola* for the EU territory with identification and evaluation of risk reduction options. *EFSA Journal* 2013;11 (1):3072. [115 pp.]. doi:10.2903/j.efsa.2013.3072. Available online: www.efsa.europa.eu/efsajournal
- Elphinstone J, 2008. Revised investigation of *Erwinia chrysanthemi* (*Dickeya dianthicola* and other *Dickeya* spp.) able to infect potatoes. Final report. Project Report 2008/7, October 2008. Potato Council, Kenilworth, Warwickshire, UK, 30 pp.
- Parkinson N, Stead D, Bew J, Heeney J, Tsrer L and Elphinstone J, 2009. *Dickeya* species relatedness and clade structure determined by comparison of recA sequences. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*, 59, 2388–2393.
- Perombelon M, Lowe R, 1975. Studies on the initiation of bacterial soft rot in potato tubers. *Potato Research* 18, 64–82.
- Pitman AR, Harrow S, and Visnovsky SB. Genetic Characterisation of *Pectobacterium wasabiae* Causing Soft Rot Disease of Potato in New Zealand. *European Journal of Plant Pathology* 126, no. 3 (March 1, 2010): 423–435.
- Poto nik, A. Osamitev povzro iteljev krompirjeve rne noge (*Erwinia carotovora* subs. *atroseptica* in mehke gnilobe (*Ewinia carotovora* subs. *carotovora*) na kultivarjih doma ega in uvoženega krompirja: Magistrsko delo. A. Poto nik, 1993.
- Samson R, Legendre JB, Christen R, Fischer-Le Saux M, Achouak W and Gardan L, 2005. Transfer of *Pectobacterium chrysanthemi* (Burkholder s sod. 1953) Brenner s sod. 1973 and *Brenneria paradisiaca* to the genus *Dickeya* gen. nov. as *Dickeya chrysanthemi* comb. nov. and *Dickeya paradisiaca* comb. nov. and delineation of four novel species, *Dickeya dadantii* sp. nov., *Dickeya dianthicola* sp nov., *Dickeya dieffenbachiae* sp nov and *Dickeya zeae* sp nov. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*, 55, 1415–1427.
- Samson R, Poutier F, Saily M and Jouan B, 1987. Characterisation of *Erwinia chrysanthemi* Strains from Potato and Other Hosts Using Biovars and Serogroups. *Bulletin OEPP*, 17, 11–16.
- Slawiak M, Beckhoven JRCMv, Speksnijder AGCL, Czajkowski R, Grabe G and Wolf JMvd, 2009. Biochemical and genetical analysis reveal a new clade of biovar 3 *Dickeya* spp. strains isolated from potato in Europe. *European Journal of Plant Pathology*. 125, 2, 245–261.
- Toth, I.K., Van der Wolf, J.M., Saddler, G., Lojkowska, E., Hélias, V., Pirhonen, M., Tsrer (Lahkim), L., Elphinstone, J.G., 2011. *Dickeya* species: an emerging problem for potato production in Europe. *Plant Pathology* 60, 385–399.
- Van Vaerenbergh, J., Baeyen, S., De Vos, P., Maes, M., 2012. Sequence Diversity in the *Dickeya* fliC Gene: Phylogeny of the *Dickeya* Genus and TaqMan® PCR for “*D. solani*”, New Biovar 3 Variant on Potato in Europe. *PLoS ONE* 7, e35738.
- Venkatesh, Balakrishnan, Lavanya Babujee, Hui Liu, Pete Hedley, Takashi Fujikawa, Paul Birch, Ian Toth, and Shinji Tsuyumu. “The *Erwinia chrysanthemi* 3937 PhoQ Sensor Kinase Regulates Several Virulence Determinants.” *Journal of Bacteriology* 188, no. 8 (April 15, 2006): 3088–3098. doi:10.1128/JB.188.8.3088-3098.2006.

- Versalovic, M. Schneider, F. J. De Bruijn, and J. R. Lupski. "Genomic Fingerprinting of Bacteria Using Repetitive Sequence-based Polymerase Chain Reaction." *Methods in Molecular and Cellular Biology* 5, no. 1 (1994): 25–40.
- Winslow CEA, Broadhurst J, Buchanan R, Krumwiede Jr C, Rogers L and Smith G, 1920. The families and genera of the bacteria. Final report of the Committee of the Society of American Bacteriologists on Characterisation and Classification of Bacterial Types. *Journal of Bacteriology*, 5, 191–229.