

Protokoły diagnostyczne dotyczące agrofagów podlegających przepisom¹ Protocoles de diagnostic pour les organismes réglementés

Xanthomonas axonopodis pv. *dieffenbachiae*

Zakres

Standard opisuje protokół diagnostyczny dla *Xanthomonas axonopodis* pv. *dieffenbachiae*.

Zatwierdzanie i nowelizacja

Pierwsze zatwierdzenie w 2003-09. Rewizja 200X-09.

Wprowadzenie

Bakteryjna plamistość obrazkowatych wywoływana przez *Xanthomonas axonopodis* pv. *dieffenbachiae* zanotowana została po raz pierwszy na *Dieffenbachia maculata* w szklarniach w stanie New Jersey (US) przez McCulloch & Pirone (1939) i opisana przez nich jako *Bacterium dieffenbachiae*. Od tego czasu choroba jest notowana w szerokim zakresie na ozdobnych i jadalnych gatunkach z rodziny *Araceae*, włącznie z *Aglaonema* (*A. commutatum*, *A. crispum*), *Anthurium* (*A. amnicola*, *A. andraeanum*, *A. crystallinum*, *A. scherzerianum*), *Caladium* (*C. bicolor*, *C. lindenii*), *Colocasia esculenta*, *Dieffenbachia maculata*, *Epipremnum aureum*, *Philodendron* (*P. bipinnatifidum*, *P. scandens*, *P. scandens* ssp. *oxycardium*), *Rhaphidophora*, *Scindapsus pictus*, *Spathiphyllum* (*S. floribundum*, *S. wallisii*), *Syngonium podophyllum* i *Xanthosoma* (*X. caracu*, *X. sagittifolium*). Głównym żywicielem jest *Anthurium*, zanotowane po raz pierwszy w 1971 na Hawajach (US) na wyspie Kauai. Od tego czasu bakteryjna plamistość stała się głównym problemem na Hawajach, w Gwadelupie i na Martynice. W obrębie regionu EPPO, patogen izolowano z *Anthurium* importowanego do Holandii, a później z roślin w szklarniach produkcyjnych z tego kraju, i z Włoch i Turcji. Choroba jest obecna w różnych krajach Centralnej i Południowej Ameryki, w kilku krajach Oceanu Spokojnego, w Południowej Afryce i w USA (California, Florida).

Wyróżnia się co najmniej trzy grupy szczepów porażających *Araceae*: (1) szczepy z *Anthurium*, które są bardziej zjadliwe dla *Anthurium* niż pozostałe szczepy i mają szerszy zakres roślin żywicielskich (2) określone szczepy dla *Syngonium*, serologicznie blisko spokrewnione ze szczepami *Anthurium*, również wirulentne dla *Anthurium*, z ograniczonym zakresem roślin żywicielskich; (3) szczepy z innych *Araceae*, włącznie ze szczepami z *Syngonium* innymi niż te wymienione powyżej, które są słabo wirulentne dla *Anthurium* i mają ograniczony zakres roślin żywicielskich. Wystąpienie choroby na *Anthurium* wywołuje wiele uszkodzeń i choroba jest opisywana szczegółowo. Na *Anthurium*, na podstawie hydrolizy skrobi opisane zostały dwa biotypy, na agarze celulozowo skrobiowym: biotyp A (bez hydrolizy) i B (z hydrolizą). Na podstawie oddziaływania z 8 różnymi rodzajami przeciwciał monoklonalnych wyznaczono co najmniej 12 typów serologicznych. Większość szczepów *Anthurium* należy do grup 1–6 i reaguje z dodatkowymi

¹ Ryciny w niniejszym standardzie oznaczone „Web Fig.” zostały opublikowane na stronie internetowej EPPO www.eppo.org.

przeciwciałami Xcd108. Szczepy z innych roślin żywicielskich znajdują się głównie w grupach 7–12 (Lipp *et al.*, 1992; Norman & Alvarez, 1996). Dla określonych szczepów z *Syngonium* zaproponowano nazwę pv. *syngonii* (Chase *et al.*, 1992). Opis poniżej dotyczy głównie szczepów z *Anthurium*.

Procedura diagnostyczna do identyfikacji *X. axonopodis* pv. *dieffenbachiae* jest zaprezentowana na Ryc. 1.

Tożsamość

Nazwa: *Xanthomonas axonopodis* pv. *dieffenbachiae* (McCulloch & Pirone) Vauterin, Hoste, Kersters & Swings.

Synonimy: *Xanthomonas campestris* pv. *dieffenbachiae* (McCulloch & Pirone) Dye. *Xanthomonas dieffenbachiae* (McCulloch & Pirone) Dowson.

Stanowisko taksonomiczne: Bacteria, Gracilicutes, *Proteobacteria* β subdivision. Strains from *Syngonium* have been described as a separate pathovar, viz. pv. *syngonii* (Chase *et al.*, 1988; Dickey & Zumoff, 1987; Lipp *et al.*, 1992). Bacteria, Gracilicutes, *Proteobacteria* β poddział. Szczepy z *Syngonium* zostały opisane jako odrębny patowar, viz. pv. *syngonii* (Chase *et al.*, 1988; Dickey & Zumoff, 1987; Lipp *et al.*, 1992)

Filogeneza oparta na częściowym sekwencjonowaniu genu Gyrase B (Parkinson *et al.*, 2009) znajdującego się w patotypie szczepu *X. axonopodis* pv. *dieffenbachiae* (NCPFB 1833) w kładzie, z *X. axonopodis* pv. *phaseoli*, *X. axonopodis* pv. *manihotis*, *X. campestris* pv. *syngonii*, *X. campestris* pv. *begoniae* i *X. campestris* pv. *passiflorae*.

Kod komputerowy EPPO: XANTDF.

Kategoria fitosanitarna: lista A2 numer 180.

Wykrywanie

Objawy chorobowe

Na *Aglaonema* i *Anthurium*, choroba ma dwa stadia (porażenie liści i porażenie systemiczne), podczas gdy inne rośliny żywicielskie wykazują tylko porażenie liści. Objawy liściowe występują na liściach i ogonkach liściowych. Rozpoczynają się one przy brzegu blaszki liściowej po spodniej stronie liścia w postaci małych, gwiaździstych wodą nasiąkniętych plamek, ewentualnie z żółknięciem wokół plamek. Infekcja następuje na ogół przez hydatory i/lub zranienia oraz okazjonalnie przez aparaty szparkowe. W suchych warunkach, plamki są początkowo małe i suche i mogą stawać się ciemnobrązowe. W stadiach późniejszych patogen zwykle atakuje tkanki przewodzące, a plamki na liściach zlewają się ze sobą, w wyniku czego powstają duże V – kształtne do nieregularnych nekrotyczne powierzchnie z jasno żółtą granicą. Objawy porażenia systemicznego patogenem pojawiają się w postaci żółknięcia starszych liści i ogonków. Systemicznie porażone liście kwiaty dają się łatwo oderwać i mogą wykazywać ciemnobrązowe paski u ich podstawy, stopniowo powiększające się. Czasami na porażonych ogonkach występują kropelki żółtego śluzu bakteryjnego. Po przecięciu ogonka liściowego uwidaczniają się są żółtobrązowe wiązki tkanki przewodzącej. Ostatecznie zamiera cała roślina. Czasami porażenie systemiczne również powoduje powstawanie nowych, nasiąkniętych wodą plamek, kiedy bakterie atakują parenchymę liści z zainfekowanych wiązek przewodzących. Te wodniste plamki występują głównie w pobliżu nerwów głównych.

Objawy powodowane przez *X. axonopodis* pv. *dieffenbachiae* (szczególnie suche nekrotyczne plamki na liściach) można łatwo pomylić z objawami powodowanymi brakiem substancji odżywczych lub zranieniem.

Objawy powodowane przez *X. axonopodis* pv. *dieffenbachiae* mogą zostać pomyłone z objawami powodowanymi przez bakterie z rodzaju *Acidovorax anthurii* (Gardan *et al.*, 2000) (ex *Pseudomonas* sp., szczep odniesienia: CFBP3232, ICMP13404). Są to małe, nieregularne, tłuste, plamki na niższej powierzchni liścia blisko nerwów i brzegu liścia, i na skrzydłokwiacie. Uszkodzenia te mogą rozszerzać się i powstają większe, czarne, nekrotyczne plamy zniekształcające liść. Nekrotyczne plamy otoczone są przez nasiąkniętą wodą brzegi i jasną chlorotyczne strefę halo, lub przez fioletową strefę halo na skrzydłokwiacie. Porażenie może rozwijać się w użytkowaniu powodując miękką zgniliznę. Na porażenie systemiczne roślin może wskazywać żółknięcie wewnętrznej części blaszki i obecność czarnych nekrotycznych powierzchni rozwijających się od ogonków liści w głównych żyłkach, ostatecznie rośliny mogą zamierać. Niemniej jednak, brak jest tworzenia się V-kształtnych nasiąkniętych wodą plamek, i dużej żółtej strefy halo wokół nekrotycznych plamek, jak to jest w przypadku *X. axonopodis* pv. *dieffenbachiae*. Objawy porażenia systemicznego mogą być również łatwo pomyłone z objawami powodowanymi przez bakterie *Ralstonia solanacearum* (Norman i Yuen, 1999).

Testy przesiewowe

Ekstrakcja

Procedurę ekstrakcji w odniesieniu do różnych rodzajów materiału roślinnego zaprezentowano w załączniku 1. Bufory ekstrakcyjne mogą być różne w zależności od przeprowadzanego później rodzaju testu. W przypadku wykorzystania różnych testów do pojedynczego ekstraktu, ekstrakt powinien być przygotowany na bazie sterylnej wody destylowanej, a zawiesiny wodne powinny być suplementowane buforami o odpowiednim stężeniu (tak aby uzyskać koncentrację 1 x w próbce roślinnej, zapobiegać nadmiernemu rozcieńczeniu), zgodnie z testem który ma być wykonany.

Izolacja bezpośrednia, immunofluorescencja, DAS-ELISA i nested-PCR mogą być używane jako testy przesiewowe i zostały opisane dalej iw załącznikach 2, 3 i 4. Podczas stosowania testu nested PCR może wystąpić ryzyko otrzymania fałszywie pozytywnych wyników w przypadku kontaminacji amplikonami uzyskiwanymi w pierwszej rundzie amplifikacji.

Reakcje krzyżowe prowadzące do fałszywie pozytywnych odpowiedzi mogą wystąpić z saprofitami, kiedy testy serologiczne wykonywane są przy braku specyficzności przeciwciał. Do identyfikacji czystych kultur polecany jest pośredni test ELISA z wykorzystaniem przeciwciał monoklonalnych, podczas gdy charakteryzuje się on niską czułością w badaniu materiału roślinnego.

Izolacja

Izolacja z zainfekowanych tkanek (łodygi lub liście) może być łatwa przy zastosowaniu nie selektywnego bogatego podłoża, na przykład YPGA.

Morfologię kolonii bakteryjnych obserwuje się po 2–3 dniach inkubacji w temperaturze 28°C. Kolonie bakterii *X. axonopodis* pv. *dieffenbachiae* na płytkach agarowych są okrągłe, wypukłe, śluzowate i żółte. Zalecane jest porównanie morfologii kolonii z koloniami kultury referencyjnej na tym samym podłożu.

W celu ułatwienia diagnozy zaleca się wykonanie dodatkowego posiewu na podłoża selektywne.

Opracowano różne selektywne podłoża diagnostyczne: podłoże NCTM4, podłoże CS (wykorzystujące celobiozę i skrobię jako źródła węgla) i zmodyfikowane podłoże ET (wykorzystujące eskulinę i trehalozę jako źródła węgla).

Na podłożu NCTM4 kolonie *X. axonopodis* pv. *dieffenbachiae* pojawiają się po około 72 h okrągłe, wypukłe, śluzowate i żółte.

Na podłożu CS powstaje strefa przejaśnienia wokół kolonii hydrolizujących skrobię. Szczepy nie hydrolizujące skrobi na tym podłożu tworzą śluzowate wzniesione kolonie.

Na podłożu ET wokół kolonii hydrolizujących eskulinę powstaje ciemny rozproszony pigment.

Jak opisano powyżej, objawy systemicznego porażenia mogą być łatwo pomyłone z objawami powodowanymi przez bakterie *Ralstonia solanacearum*, ale izolacja bakterii na podłoża pokazuje, że zamiast kolonii o zabarwieniu żółtym, produkują one kolonie o beżowym zabarwieniu.

Identyfikacja

Identyfikacja bakterii *X. axonopodis* pv. *dieffenbachiae* powinna być przeprowadzona z wykorzystaniem co najmniej dwóch testów opartych o różne biologiczne charakterystyki patogenu. Rycina 1 podsumowuje schemat badania dla *X. axonopodis* pv. *dieffenbachiae* w materiale roślinnym wykazującym objawy chorobowe i bez objawów chorobowych.

Opis i testy biochemiczne

Szczepy *X. axonopodis* pv. *dieffenbachiae* są tlenowymi pałeczkami z jedną polarną wicią, produkują żółty, nie rozpuszczalny w wodzie pigment.

Charakterystykę biochemiczną szczepów *X. axonopodis* pv. *dieffenbachiae* przedstawiono w tabeli 1.

Tabela 1 Charakterystyka biochemiczna bakterii *X. axonopodis* pv. *dieffenbachiae*. - wynik ujemny, + wynik dodatni i v wynik zmienny w zależności od szczepu.

Cecha	Wyniki
Reakcja Gram'a	-
Hydroliza skrobi	v (+ biotyp B, - biotyp A)
Tlenowy metabolizm glukozy	+
Beztlenowy metabolizm glukozy	-
Test na katalazę	+
Test na żelatynę	+
Hydroliza kazeiny	+
Hydroliza trójbutryny	+
Wytwarzanie H ₂ S	+
Test nadwrażliwości na tytoniu	+
Wytwarzanie kwasu z:	
arabinozy	+
celobiozy	+
fruktozy	+
D(+) galaktozy	+
glicerolu	+
laktozy	+
maltozy	+
D-mannozy	+
melobiozy	+
rafinozy	+
D-rybozy	+
sacharozy	+
trehalozy	+
ksylozy	+
glutaminianu	+
propionianu	+
bursztynianu	+
dulcitolu	-
erytrytolu	-
inozytolu	-
inuliny	-

mannitolu	-
ramnozy	-
salicyny	-
sorbitolu	-
Redukcja azotanów	-
Oksydaza	-
Test na ureazę	-
Wytwarzanie indolu	-
Wytwarzanie pigmentu fluoryzującego	-

Aktywność pektolityczna jest zmienna: izolaty z *Colocasia*, *Dieffenbachia* i *Philodendron* są wysoce pektolityczne, izolaty z *Xanthosoma* i wiele z *Syngonium* są niepektolityczne.

Izolaty *Syngonium* określone jako pv. *syngonii* mogą być różnicowane do pewnego stopnia na podstawie zakresu roślin żywicielskich, symptomatologii, pigmentacji i wrażliwości na pH (Chase *et al.*, 1992). Hseu & Lin (1998) znaleźli dwie biochemiczne odmiany bakterii badając przy wykorzystaniu systemu Biolog GN Microplate Identification System na Tajwanie 75 izolatów. Grupa A wykorzystywała l-fukozę, α -laktozę, β -methyl d-glukozyd, turanozę, kwas d-glukuronowy, kwas β -hydroksy-masłowy, kwas γ -hydroksy-masłowy, kwas α -ketowalerianowy, kwas chinowy, l-asparaginę, hydroksy-L-prolinę, L-Leucynę, glicerol, D, L- α -fosforan glicerolu i glukozo-6-fosforan, podczas gdy grupa B nie. Kwas malonowy i glukozo-1-fosforan nie były wykorzystywane przez grupę A, podczas gdy grupa B wykorzystywała te składniki.

W celu całkowitej identyfikacji (do patowaru) testy biochemiczne powinny być uzupełnione testami serologicznym lub molekularnym.

Testy serologiczne

Immunofluorescencja

W celu identyfikacji, test ten powinien być przeprowadzony w sposób opisany w Standardzie Diagnostycznym EPPO PM 7/xx (w przygotowaniu) z wykorzystaniem czystej kultury (około 10^6 komórek w 1 mililitrze) w buforze fosforanowym jako próbki. Wynik testu dla podejrzewanych kultur jest dodatni, jeżeli rozmiar i kształt barwionych komórek kultury są równoważne do tych w kontroli pozytywnej izolatu.

ELISA

W celu identyfikacji, powinien być przeprowadzony pośredni test ELISA z wykorzystaniem specyficznych monoklonalnych przeciwciał Xcd 108, w sposób opisany w załączniku 3 z wykorzystaniem czystej kultury (około 10^7 komórek w mililitrze) w specyficznym buforze do ekstrakcji do testu ELISA jako próbce. Wynik testu jest dodatni, gdy dla identyfikowanych podejrzewanych kultur wartość OD jest tego samego rzędu co wartość OD dla kontroli dodatnich. Test DAS-ELISA z wykorzystaniem poliklonalnych przeciwciał nie powinien być stosowany do identyfikacji, z powodu możliwości wystąpienia niespecyficznych reakcji.

Testy molekularne

PCR

Zawiesina zawierająca około 10^8 komórek w 1 mililitrze sterylnej wody do biologii molekularnej jest przygotowywana z 24 godzinnej hodowli kultury na podłożu YPGA. W przypadku używania czystych kultur ekstrakcja DNA nie jest wymagana. Właściwa procedura reakcji PCR jest stosowana w celu amplifikacji specyficznego amplikonu bakterii *X. axonopodis* pv. *dieffenbachiae* jak opisano w załączniku 4 (Robène-Soustrade *et al.*, 2006).

Identyfikacja bakterii *Xanthomonas axonopodis* pv. *dieffenbachiae* polega na przeprowadzeniu pierwszej rundy nested-PCR, a następnie etapu cięcia z wykorzystaniem enzymu restrykcyjnego HincII.

Wynik identyfikacji *X. axonopodis* pv. *dieffenbachiae* jest pozytywny wtedy, gdy amplikon PCR ma taki sam rozmiar jak amplikon uzyskany ze szczepu kontroli pozytywnej, a także posiada taki sam polimorfizm fragmentów restrykcyjnych.

Sekwencjonowanie

Sekwencjonowanie częściowej sekwencji genu Gyrase B i porównanie sekwencji ze wszystkimi ważnymi opisanymi sekwencjami Xanthomonad (Parkinson *et al.*, 2009) pozwala umiejscowić szczepy w kładzie zawierającym tylko (zobacz "Tożsamość"). Nie zostało to do końca wyjaśnione, ponieważ wszystkie patowary mogą podlegać dalszemu różnicowaniu. *X. campestris* pv. *syngonii* jest włączony do kładu. Sekwencjonowanie jest bardzo obiecujące, ale może być przeprowadzane na jednym szczepie. Z tego powodu nie jest zalecane w chwili obecnej.

Testy patogeniczności.

Test ten jest używany jako potwierdzenie diagnozy *X. axonopodis* pv. *dieffenbachiae* (kiedy to niezbędne).

Inokulacja przez rozpylanie nie jest polecana, za wyjątkiem kiedy wyposażenie jest zaadaptowane do powietrznego zatrzymywania organizmów kwarantannowych.

Metody inokulacji prezentuje załącznik 6.

Materiał odniesienia

Kultura odniesienia NCPPB 1833 (= PD 992 =LMG 695).

Raportowanie i dokumentacja

Wskazówki dotyczące raportowania i dokumentacji zostały przedstawione w Standardzie EPPO Standard PM7/77 (1) Dokumentacja i raportowanie diagnozy (EPPO, 2006).

Informacje dodatkowe

Dodatkowe informacje na temat tego organizmu dostępne są w:

National Reference Laboratory Plant Protection Service, PO Box 9102, 6700 HC, Wageningen, the Netherlands Fax 0031 317421701;

CSL Diagnostics, Central Science Laboratory, Sand Hutton, York, UK ;

French National Laboratory for Plant Health (LNPH), Pôle de Protection des Plantes, Station de Ligne Paradis, 7 chemin de l'IRAT, 97410 St Pierre (FR, Reunion Island), e-mail: lnpv.sdqpv.dgal@agriculture.gouv.fr

CIRAD, UMR PVBMT, Pôle de Protection des Plantes, Station de Ligne Paradis, 7 chemin de l'IRAT, 97410 St Pierre (FR, Reunion Island)

Podziękowania

Protokół został pierwotnie przygotowany przez: J.D. Janse, Plant Protection Service, Wageningen (NL) i następnie przejrzany przez A. Chabirand, B. Hostachy, D. Caffier i H. Soubelet

LNPV (FR), E. Jouen, Université de la Réunion, UMR PVBMT (FR), I. Robène-Soustrade, O. Pruvost i L. Gagnevin CIRAD, UMR PVBMT (FR).

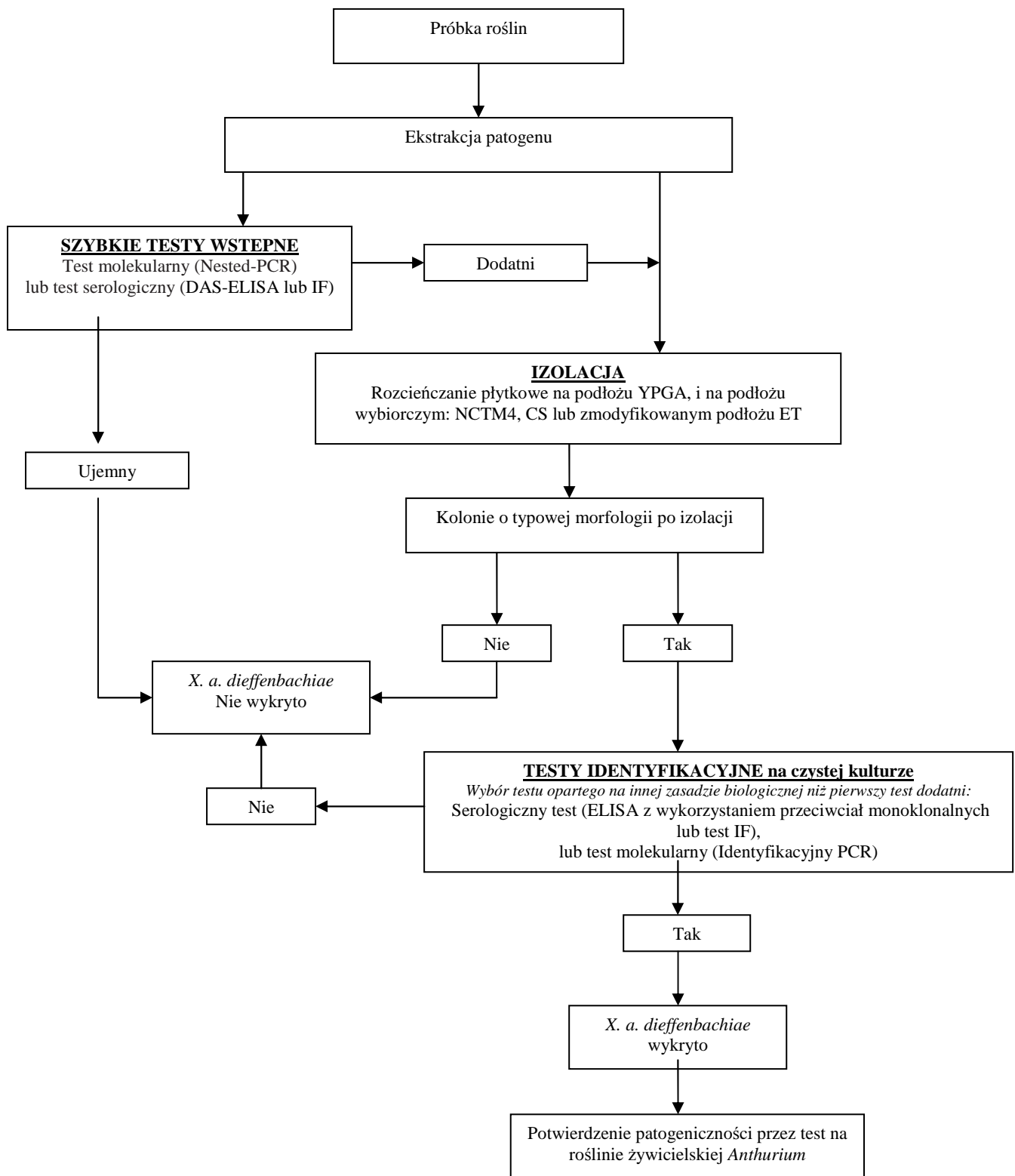
Materialy źródłowe²

- Aysan Y & Sahin F (2003) First report of bacterial blight of anthurium caused by *Xanthomonas axonopodis* pv. *dieffenbachiae* in Turkey. *Plant Pathology* **7**, 783-783.
- Chase AR, Randhawa PS & Lawson RH (1988) New disease of *Syngonium podophyllum* 'White Butterfly' caused by a pathovar of *Xanthomonas campestris*. *Plant Disease* **72**, 74-78.
- Chase AR, Stall RE, Hodge NC & Jones JB (1992) Characterization of *Xanthomonas campestris* strains from aroids using physiological, pathological, and fatty acid analysis. *Phytopathology* **82**, 754-759.
- Dickey RS & Zumoff CH (1987) Bacterial leaf blight of *Syngonium* caused by a pathovar of *Xanthomonas campestris*. *Phytopathology* **77**, 1257-1262.
- EPPO (2006) Documentation and reporting on a diagnosis. *EPPO Bulletin* **36**, 459-460.
- Fukui R, Fukui H, McElhaney R, Nelson SC & Alvarez AM (1996) Relationship between symptom development and actual sites of infection in leaves of Anthurium inoculated with a bioluminescent strain of *Xanthomonas campestris* pv. *dieffenbachiae*. *Applied and Environmental Microbiology* **62**, 1021-1028.
- Gardan L, Dauga C, Prior P, Gillis M & Saddler GS (2000) *Acidovorax anthurii* sp. nov., a new phytopathogenic bacterium which causes bacterial leaf-spot of anthurium. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology* **50**, 235-246.
- Hayward AC (1972) A bacterial new disease of *Anthurium andreanum* in Hawaii. *Plant Disease Reporter* **56**, 904-908.
- Hseu SH & Lin CY (1998) Anthurium Blight in Taiwan and the sensitivity of the pathogen to agrochemicals. *Plant Protection Bulletin (Taiwan)* **40**, 409-417.
- Jouen E, Laurent P, Robène-Soustrade I, Gagnevin L, Pruvost O, Hostachy B, Gateblé G, Amice R & Imbert F (2007) First report in New Caledonia of bacterial blight of anthurium caused by *Xanthomonas axonopodis* pv. *dieffenbachiae*. *Plant Disease* **91**, 462.
- Laurent P, Chabirand A, Jouen E, Robène-Soustrade I, Gagnevin L, Hostachy B & Pruvost O (2009) Evaluation of a new semi-selective medium for the isolation of *Xanthomonas axonopodis* pv. *dieffenbachiae*, the etiological agent of Anthurium Bacterial Blight. *Letters in Applied Microbiology* in press.
- Lelliott RA & Stead D. 1987. *Methods for the Diagnosis of Bacterial Diseases of Plants*. Oxford (GB), Blackwell, Oxfordp.
- Lipp RL, Alvarez AM, Benedict AA & Berestecky J (1992) Use of monoclonal antibodies and pathogenicity tests to characterize strains of *Xanthomonas campestris* pv. *dieffenbachiae* from aroids. *Phytopathology* **82**, 677-682.
- McCulloch L & Pirone PP (1939) Bacterial Leaf Spot of Dieffenbachia. *Phytopathology* **29**, 470-489.
- Moltmann E (2005) Die Bakterienkrankheit *Xanthomonas axonopodis* pv. *dieffenbachiae* an *Anthurium* sp. (Flamingoblume). *Nachrichtenblatt des Deutschen Pflanzenschutzdienstes* **57**, 134-136.
- Norman D & Alvarez A (1989) A rapid method for presumptive identification of *Xanthomonas campestris* pv. *dieffenbachiae* and other xanthomonads. *Plant Disease* **73**, 654-658.
- Norman DJ & Alvarez AM (1994a) Latent infections of *in vitro* anthurium caused by *Xanthomonas campestris* pv. *dieffenbachiae*. *Plant Cell, Tissue and Organ Culture* **39**, 55-61.
- Norman DJ & Alvarez AM (1994b) Rapid detection of *Xanthomonas campestris* pv. *dieffenbachiae* in anthurium plants with a miniplate enrichment/ELISA system. *Plant Disease* **78**, 954-958.

² Została zachowana oryginalna pisownia. (przyp. tłum.)

- Norman DJ & Alvarez AM (1996) Monitoring the spread of *Xanthomonas campestris* pv. *dieffenbachiae* introduced from symptomless *Anthurium* cuttings into production fields. *Journal of the American Society for Horticultural Science* **121**, 582-585.
- Norman DJ & Yuen JMF (1999) First report of *Ralstonia (Pseudomonas) solanacearum* infecting pot *Anthurium* production in Florida. *Plant Disease* **83**, 300.
- Parkinson N, Cowie C, Heeney J & Stead D (2009) Phylogenetic structure of *Xanthomonas* determined by comparison of *gyrB* sequences. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology* **59**, 264-274.
- Puławska J, Kordyla-Bronka M, Jouen E, Robene-Soustrade I, Gagnevin L, Pruvost O, Sobiczewski P & Orlikowski L (2008) First report of bacterial blight of *Anthurium andreanum* in Poland. *Plant Pathology* **57**, 775.
- Robbs CF (1955) Algumas bacterias fitopatogenicas do distrito federal. *Agronomia* **14**, 147-164.
- Robene-Soustrade I, Laurent P, Gagnevin L, Jouen E & Pruvost O (2006) Specific detection of *Xanthomonas axonopodis* pv. *dieffenbachiae* in anthurium (*Anthurium andreanum*) tissues by nested PCR. *Applied and Environmental Microbiology* **72**, 1072-1078.
- Sathyanarayana N, Reddy OR, Latha S & Rajak RL (1998) Interception of *Xanthomonas campestris* pv. *dieffenbachiae* on *Anthurium* plants from the Netherlands. *Plant Disease* **82**, 262.
- Vlad FF, Severin V & Tudose M (2004) Bacterial blight of *Dieffenbachia* plants (*Xanthomonas axonopodis* pv. *dieffenbachiae*) – a new disease for Romania. *Analele Institutului de Cercetare-Dezvoltare pentru Protectia Plantelor* **33**, 21-27.
- Zoina A, Raio A & Spasiano A (2000) First report of anthurium bacterial blight in Italy. *Journal of Plant Pathology* **82**, 65.

Ryc.1. Diagram wykrywania i identyfikacji *Xanthomonas axonopodis* pv. *dieffenbachiae* w próbkach objawowych i bezobjawowych *Anthurium* lub innych roślin żywicielskich.



Załącznik 1. Procedura ekstrakcji

1. Ekstrakcja z objawowego materiału roślinnego (liście, łodygi).

Powierzchnię zainfekowanych liści i łodyg szybko zdezynfekować z wykorzystaniem 70% etanolu. Fragmenty liści lub łodyg pobrane z brzegowej części plam lub nekroz pobierać zdezynfekowanym ostrzem skalpela i przenosić do małej objętości sterylnej wody destylowanej lub buforu fosforanowego (0.01 M). Aseptycznie fragmenty te tnie się na małe części, a następnie zostawia na 10-15 minut w celu dyfuzji bakterii.

Ekstrakcja może być również przeprowadzona z wykorzystaniem homogenizatora (np. Homex z firmy Bioreba) i woreczków ekstrakcyjnych. Jest to szczególnie właściwe dla szybkich testów przesiewowych (IF, test DAS-ELISA lub nested-PCR).

Ekstrakty z liści i łodyg powinny być poddane badaniom niezwłocznie po przygotowaniu, pozostałe ekstrakty powinny być przechowywane w sterylnych odpowiednio oznakowanych probówkach jednorazowego użytku w 5°C w celu wykorzystania w przyszłości, gdy zajdzie taka konieczność. Do podłoża i pozostałego ekstraktu w celu dłuższego przechowywania (dłużej niż 24 godziny), dodawany jest dwukrotnie sterylizowany glicerol (20-30% vol. / vol.). Tak przygotowane ekstrakty przechowuje się w temperaturze poniżej -18°C.

2. Ekstrakcja z bezobjawowych liści lub łodyg.

X. axonopodis pv. *dieffenbachiae* może wystąpić w formie utajonej, również w tkance roślinnej (Fukui *et al.*, 1996; Norman & Alvarez, 1994a).

Biologiczne wzbogacanie bakterii, zgodnie z Norman i Alvarez (1994b) może być przeprowadzane przy użyciu systemu mini płytкового, gdzie duża liczba próbek może być wykonywana.

150 µl podłoża ET jest umieszczane w każdej studzience płytki mikrotitracyjnej. Próbkę tkanki liści są przygotowywane zgodnie z opisem w sekcji 1 przez pobranie około 1 cm² tkanki liściowej moczenie przez 2-3 godziny w 1 ml soli. Następnie z każdej próbki roślinnej (lub kontroli soli) pobiera się 10 µl i dodaje pojedynczo do studzienek. Mini płytki inkubuje się a następnie przeprowadzany jest test (ELISA, IF lub PCR).

Ekstrakty wykorzystuje się bezpośrednio, a jeśli to możliwe pozostałości ekstraktów są przechowywane w sterylnej odpowiednio oznakowanej jednorazowej probówce w temperaturze 5°C w celu powtórnego użycia. Do podłoża w celu dłuższego przechowywania (dłużej niż 24 godziny), dodawany jest podwójnie destylowany glicerol (20-30% glicerol v/v) i potem przechowuje się je w temperaturze poniżej -18°C.

Załącznik 2. Przygotowanie podłoży i buforów.

Autoklawowanie (sterylizacja): produkty poddawane procesowi przy nadciśnieniu 1 Bara w temperaturze 121°C przez 15 minut mogą zostać uznane za sterylne.

1-Podłoża

Yeast peptone glucose agar (YPGA)

Wyciąg drożdżowy	7 g
Pepton bakteriologiczny	7 g
Glukoza	7 g
Agar	18 g
Woda destylowana	1,0 l

pH jest doprowadzane do 7.2. Sterylizować przez autoklawowanie.

Cellobiose starch medium (CS)

Celobioza	5,0 g
MgSO ₄ ·7H ₂ O	0,1 g
K ₂ HPO ₄	0,4 g
KH ₂ PO ₄	0,8 g
Agar	15,0 g
Skrobia ziemniaczana	10 g
Wodny roztwór zieleni metylowej (1%)	1,5 ml
Woda destylowana	1,0 l

Skrobia ziemniaczana powinna być dodawana oddzielnie do 200 ml demineralizowanej wody, doprowadzana do wrzenia i dodana do 800 ml podgrzanej wody, mieszana na płycie grzejnej, po czym wodny roztwór zieleni metylowej powinien być dodany.

Podłoże jest autoklawowane i dodawane są następujące sterylizowane na filtrze roztwory antybiotyków i inne składniki:

Cyklohexymid	150,0 mg
Cefaleksyna,	50,0 mg
Trimetoprim	30,0 mg
Pirydoksyna HCl,	1,0 mg
D-metionina	3,0 mg.
Chlorek tetrazoliowy	10,0 mg

Modified esculin trehalose medium (ET) (Norman & Alvarez, 1989, 1994b)

Eskulina	1,0 g
Trehaloza	0,5 g
FeCl ₃ ·6H ₂ O	0,5 g
NaCl	5,0 g
MgSO ₄ ·7H ₂ O	0,2 g

KH ₂ PO ₄	1,0 g
Agar	15,0 g
Woda demineralizowana	1,0 l

pH jest doprowadzane do 6,8 i podłoże jest niezwłocznie autoklawowane.

Po autoklawowaniu dodawane są następujące sterylizowane na filtrze roztwory antybiotyków i inne składniki:

Cykloheksymid	200,0 mg
Cefaleksyna,	50,0 mg
Trimetoprim	30,0 mg
Pirydoksyna HCl,	1,0 mg
D-metionina	3,0 mg
Chlorek tetrazoliowy	10,0 mg

Końcowe pH wynosi 6,5.

NCTM4 podłoże (Laurent, 2009)

Wyciąg drożdżowy	7,0 g
Pepton bakteriologiczny	7,0 g
Glukoza	7,0 g
Agar	18,0 g
Woda destylowana	1,0 l

Podłoże autoklawować i dodać następujące sterylizowane na filtrze roztwory antybiotyków i inne składniki:

Piwmecylina	100,0 mg
Cefaleksyna	50,0 mg
Trimetoprym	10,0 mg
Neomycyna	3,0 mg
Propikonazol (20 mg/μl)	80μl

2-Bufory do immunofluorescencji

Błękit Evansa

Błękit Evansa	0,1 g
Bufor PBS (0,01 M)	10,0 ml

Buforu nie autoklawuje się. Przechowywać w 5°C i chronić przed światłem.

Bufor fosforanowy (0,01M) (PBS 0,01M)

NaCl	8,0 g
Na ₂ HPO ₄ , 12 H ₂ O	2,7 g
KH ₂ PO ₄	1,0 g
Woda destylowana	1,0 l

pH jest doprowadzane do 7.4. Sterylizować przez autoklawowanie.

Bufor fosforanowy z gliceryną (0,1 M)

Na ₂ HPO ₄ , 12 H ₂ O	3,2 g
NaH ₂ PO ₄	0,15 g
Glicerol	50,0 ml
Woda destylowana	100,0 ml

pH jest doprowadzane do pH 7,6 jeśli to konieczne. Sterylizować przez autoklawowanie.

Bufor do płukania: PBS 0,001M

Bufor PBS 0,01M	0.1 l
Woda destylowana	0.9 l

Sterylizować przez autoklawowanie.

3-Bufory do pośredniego testu ELISA (AGDIA)

Bufor węglanowy powlekający (1X) pH=9,6

Na ₂ CO ₃	1,59 g
NaHCO ₃	2,93 g
Woda destylowana	1,0 l

pH jest doprowadzane do 9,6 za pomocą HCl. Sterylizować przez autoklawowanie.

Bufor PBS (1X)

NaCl	8,0 g
Na ₂ HPO ₄	1,15 g
KH ₂ PO ₄	0,2 g
KCl	0,2 g
Woda destylowana	1,0 l

pH jest doprowadzane do 7,4 jeśli to konieczne. Sterylizować przez autoklawowanie.

Bufor PBS-L (1X)

Odtłuszczone wysuszone mleko	50,0 g
Bufor PBS 1X	1,0 l

Bufor PBS-TL (1X)

Odtłuszczone wysuszone mleko	25,0 g
Tween 20	0,5 ml
Bufor PBS 1X	1,0 l

Bufor substratowy (dla alkalicznej fosfatazy)

Dwuetanoloamina	97,0 ml
Woda destylowana	1,0 l

pH jest doprowadzane do 9,8 za pomocą HCl (objętość roztworu HCl jest obliczana na podstawie objętości wody). Sterylizować przez autoklawowanie.

Bufor do płukania (PBS-T)

Tween 20	0,5 ml
Bufor PBS 1X	1,0 l

4-Bufory do testu DAS-ELISA (np. PRI)

Bufor węglanowy pH=9,6

Na ₂ CO ₃	1,59 g
NaHCO ₃	2,93 g
Woda destylowana	1,0 l

pH jest doprowadzane do 9,6 za pomocą HCl (objętość roztworu HCl jest obliczana na podstawie objętości wody). Sterylizować przez autoklawowanie.

Bufor ekstrakcyjny (SEB)

Tween 20	1,0 ml
PVP-25	20,0 g
(albumina, gatunek IV	2,0 g)
Bufor PBS (0,01M)	1,0 l

Bufor fosforanowy (0,01M) (PBS 0,01M)

NaCl	8,0 g
KH ₂ PO ₄	1,0 g
Na ₂ HPO ₄ , 12 H ₂ O	14,5 g
NaH ₂ PO ₄ , 2 H ₂ O	0,4 g
Woda destylowana	1,0 l

pH jest doprowadzane do 7,4, jeśli to konieczne. Sterylizować przez autoklawowanie.

Bufor substratowy (dla alkalicznej fosfatazy)

Dwuetanoloamina	97,0 ml
Woda destylowana	1,0 l

pH jest doprowadzane do 9,8 za pomocą roztworu stężonego kwasu HCl (objętość roztworu HCl jest obliczana na podstawie objętości wody destylowanej). Sterylizować przez autoklawowanie.

Bufor do płukania (PBS-T)

Tween 20	1,0 ml
Bufor PBS (0,01M)	1,0 l

Załącznik 3. Test ELISA

Do ekstrakcji bakterii z próbek roślinnych lub pracy z koloniami używać bufor zalecany przez producenta zestawu.

Zestawy do testu DAS ELISA wykorzystujące przeciwciała poliklonalne są dostępne w handlu od różnych dostawców. Zestaw do pośredniego testu ELISA wykorzystującego specyficzne przeciwciała monoklonalne Xcd108 jest dostępny w firmie Agdia. Test należy wykonywać zgodnie z zaleceniami producenta.

1. Test DAS-ELISA

1. Rozcieńcz przeciwciała powlekające 1000 razy w buforze węglanowym (patrz załącznik 2).
2. Wprowadź 200 µl roztworu przeciwciał do studzienek płytki do testu ELISA.
3. Przykryj płytkę pokrywką i umieść płytkę w wilgotnym pudełku (zmoczona chusteczka papierowa na spodzie pudełka). Zamknij pudełko i inkubuj pudełko przez noc w lodówce (5°C) lub 3 godziny w temperaturze 37°C.
4. Wypłucz płytkę trzy razy po 5 minut buforem do płukania PBS-T (patrz załącznik 2).
5. Dodaj 200 µl do każdej studzienki ekstraktu roślinnego lub zawiesiny bakteryjnej (ekstrakt roślinny i zawiesina bakteryjna są przygotowywane w buforze do ekstrakcji SEB, patrz załącznik 2).
Napełnij ostatnią studzienkę kontrolą dodatnią i 3 studzienki kontrolą ujemną.
6. Przykryj płytkę pokrywką i umieść płytkę w wilgotnym pudełku. Przykryj pudełko i inkubuj pudełko przez noc w lodówce.
7. Wypłucz płytkę cztery razy po 5 minut buforem do płukania PBS-T.
8. Rozcieńcz koniugat alkalicznej fosfatazy 1000 razy w buforze SEB (patrz załącznik 2) i umieść 200 µl roztworu koniugatu w każdej studzience płytki do testu ELISA.
9. Przykryj płytkę pokrywką i umieść płytkę w wilgotnym pudełku. Zamknij pudełko i inkubuj pudełko przez noc w lodówce lub 3 godziny w temperaturze 37°C.
10. Wypłucz płytkę jak powyżej.
11. Przygotuj 1 mg/ml substratu alkalicznej fosfatazy (para nitrofenylofosfat) w buforze substratowym (patrz załącznik 2).
12. Dodaj 200 µl do każdej studzienki i inkubuj płytkę w temperaturze pokojowej w ciemnym miejscu.
13. Odczytaj gęstość optyczną (O.D.) dla każdej studzienki za pomocą czytnika mikroplatek ELISA przy długości fali 405 nm, po upływie różnych czasów inkubacji.

Wyniki mogą być interpretowane po więcej niż 60 minutach inkubacji, tak długo dopóki studzienki z kontrolą negatywną pozostają praktycznie przejrzyste (zobacz zalecenia dostawcy). Próbkki są ujemne kiedy wartości ich O.D. są mniejsze niż dwukrotność wartości kontroli negatywnej.

Próbki są dodatnie kiedy wartości ich O.D. są co najmniej trzy razy większe niż wartość uzyskana w kontroli negatywnej.

Próbki są uznawane za wątpliwe kiedy wartości ich O.D. są pomiędzy dwukrotnością i trójkrotnością wartości kontroli negatywnej. W tym przypadku, zaleca się powtórzenie testu lub wykonanie badania z zastosowaniem innej techniki w celu potwierdzenia wyniku.

2. Bezpośredni test-ELISA

1. Przygotowanie próbek: zawieś pojedynczą kolonię świeżej czystej kultury w buforze węglanowym (patrz załącznik 2). Zaleca się doprowadzenie optycznej gęstości zawiesiny przy 600 nm do 0.01, co jest odpowiednikiem około 10^7 jtk/ml.
2. Wprowadź 100 μ l przygotowanej próbki do studzienki płytki testu ELISA. Napełnij co najmniej jedną studzienkę kontrolą dodatnią i 3 studzienki kontrolą ujemną.
3. Umieść płytkę w cieplarni w temperaturze 37°C na noc do wysuszenia. Upewnij się, że studzienki są całkowicie suche przed kontynuacją.
4. Dodaj 200 μ l buforu blokującego PBS-L (patrz załącznik 2) do każdej studzienki i inkubuj płytkę w wilgotnym pudełku przez 30 minut w temperaturze pokojowej.
5. Wypłucz płytkę trzy razy po 5 minut w buforze do płukania PBS-T (patrz załącznik 2).
6. Rozcieńcz przeciwciała powlekające 200 razy w buforze PBS-TL (patrz załącznik 2).
7. Rozlej po 100 μ l przygotowanych przeciwciał powlekających do każdej studzienki.
8. Umieść płytkę wewnątrz wilgotnego pudełka i inkubuj jedną godzinę w temperaturze pokojowej.
9. Wypłucz płytkę osiem razy w buforze PBS-T.
10. Rozcieńcz koniugat alkalicznej fosfatazy 200 razy w buforze PBS-TL i rozlej po 100 μ l przygotowanego koniugatu enzymu do każdej studzienki.
11. Umieść płytkę wewnątrz wilgotnego pudełka i inkubuj jedną godzinę w temperaturze pokojowej.
12. Wypłucz płytkę osiem razy w buforze PBS-T.
13. Przygotuj 1 mg/ml substratu alkalicznej fosfatazy (para nitrofenylofosfat) w buforze substratowym (patrz załącznik 2).
14. Dodaj 200 μ l do każdej studzienki i inkubuj płytkę w temperaturze pokojowej w ciemnym miejscu.
15. Odczytaj gęstość optyczną (O.D.) dla każdej studzienki za pomocą czytnika mikropłytek ELISA przy długość i fali 405 nm, po upływie różnych czasów inkubacji.

Wyniki mogą być interpretowane po więcej niż 60 minutach inkubacji, tak długo dopóki studzienki z kontrolą negatywną pozostają praktycznie przejrzyste (zobacz zalecenia dostawcy). Próbki są ujemne kiedy wartości ich O.D. są mniejsze niż dwukrotność wartości kontroli negatywnej.

Próbki są dodatnie kiedy wartości ich O.D. są co najmniej trzy razy większe niż wartość uzyskana w kontroli negatywnej.

Próbki są uznawane za wątpliwe kiedy wartości ich O.D. są pomiędzy dwukrotnością i trójkrotnością wartości kontroli negatywnej. W tym przypadku, zaleca się powtórzenie testu lub wykonanie badania z zastosowaniem innej techniki w celu potwierdzenia wyniku.

Załącznik 4. Nested PCR.

1. Informacje ogólne

Następujący protokół PCR został opublikowany (Robène -Soustrade *et al.*, 2006) ostatnio zwalidowany przez różne laboratoria. Protokół nested PCR jest odpowiedni do wykrywania i/lub identyfikacji szczepów *Xanthomonas axonopodis* pv. *dieffenbachiae* patogenicznych dla anturium. Fałszywie pozytywne wyniki otrzymane przy zastosowaniu protokołu nested PCR zależą od czułości i związane są z przedsięwziętymi środkami ostrożności.

Identyfikacja szczepów *Xanthomonas axonopodis* pv. *dieffenbachiae* patogenicznych dla anturium jest dokonywana w pierwszej rundzie PCR testu nested PCR a następnie przez etap cięcia z enzymem restrykcyjnym HincII. Etap RFLP pozwala rozróżnić szczepy *Xanthomonas axonopodis* pv. *dieffenbachiae* patogeniczne dla anturium od blisko spokrewnionych szczepów należących do bakterii *Xanthomonas campestris* pv. *syngonii* i nie patogenicznych dla anturium. Źródłem kwasów nukleinowych może być zarówno czysta kultura bakterii lub ekstrakt roślinny, przygotowany w sposób opisany poniżej (sekcja 2.1). Poszukiwana sekwencja wykrywa sekwencje podobną do bakteryjnego genu kodującego domniemany -przypuszczalny ABC nośnik białka w grupie LPS. Poszukiwana sekwencja wykrywa podobną sekwencje kodującą putatywne geny ABC - typ transportujący białka w grupie LPS. The target sequence revealed sequence similarity with bacterial genes encoding putative ABC transporter-type proteins in LPS cluster. W wyniku pierwszej rundy PCR, przy zastosowaniu starterów PXadU (5'-AGGGCTCCCCATGCCGGAAT-3') i PXadL (5'-ACGCAATGCGCAGGGGAAAT-3') otrzymuje się amplikon o wielkości 1570 pz. W celu wykrycia bakterii *Xanthomonas axonopodis* pv. *dieffenbachiae* z materiału roślinnego, wymagane jest zastosowanie protokołu nested PCR, ponieważ druga runda PCR znacznie podnosi czułość. Startery używane w drugiej rundzie to NXadU (5'-AGCGCGGTACATTGTTGTTTCGT-3') i NXadL (5'-GCGGATCCTGACTGAGCAAAG-3'), wytwarzające amplikon o wielkości 785 pz. Taq DNA polimeraza pochodząca z firmy Invitrogen (Invitrogen, Merelbeke, Belgium) była początkowo stosowana, ale polimeraza pochodząca z innych źródeł zakupu została z powodzeniem przetestowana, w szczególności enzym pochodzący z Eurogentec - RedGoldStar (Eurogentec, Seraing, Belgium). W przypadku obu rodzajów enzymu potrzebna jest taka sama jego ilość, 1U na 25µL mieszaniny reakcyjnej. Mieszanina reakcyjna składa się z czterech nukleotydów, każdy o stężeniu 10mM, (New England Biolabs, OZYME, ST Quentin en Yvelines, France). W reakcji używany jest 10X skoncentrowany bufor i 25mM MgCl₂, dostarczony razem z polimerazą Eurogentec Taq DNA polymerase. W badaniach z powodzeniem wykorzystywany był amplifikator firmy Applied Biosystems typ 9600 i 9700 (Applied Biosystems). Wszystkie reakcje przeprowadzane były z wodą o jakości HPLC.

2. Metody

2.1 Ekstrakcja Kwasów Nukleinowych i Oczyszczanie

2.1.1 Wykrywanie w roślinach

Protokół ekstrakcji opisany przez Robène-Soustrade *et al.*, 2006 oparty jest o neutralizację roślinnych inhibitorów reakcji PCR (przy wykorzystaniu buforu PVP) i gotowanie powstałej zawiesiny. Ostatnie prace bazujące na ekstrakcji DNA z użyciem zestawu Qiagen® DNeasy® Plant kit (Qiagen®, Courtaboeuf, Francja) powinny być zawsze prowadzone przed amplifikacją z uwagi na zwiększenie czułości reakcji PCR. W celu wykrywania powinien zostać zastosowany następujący protokół nested PCR. Używając homogenizatora (np. Homex z firmy Bioreba) rozdrobnić 0,25g liści

anturium wykazujących objawy choroby lub bez objawów chorobowych w 5 ml buforu 10mM Tris (pH 7,2). Wirować 2 ml przez 10 minut z przyspieszeniem 20000 g i zlać supernatant. Otrzymany osad może być przechowywany w temperaturze poniżej -18°C. Następnie stosować wskazówki zawarte w protokole dostarczonym z zestawem do ekstrakcji DNA Qiagen® Plant, rozpoczynając od dodania do homogenatu 400 µl buforu AP1. Płukać dwa razy w ostatnim etapie używając 50µl buforu AE. Wyekstrahowane w ten sposób DNA może być przechowywane w temperaturze poniżej -18°C.

2.1.2 Identyfikacja

W celu identyfikacji użyty może być następujący protokół ekstrakcji oparty o zasadę lizy termicznej. Zawiesić pojedynczą kolonię świeżej czystej kultury w 1 ml wody do PCR. Gotować 1 minutę i bezpośrednio umieścić w lodzie na 1 minutę, delikatnie zworteksować. Próbkę może być przechowywana w temperaturze poniżej -18°C.

2.2 Łańcuchowa reakcja polimerazy

2.2.1 Runda pierwsza PCR

Przygotować mieszaninę reakcyjną dla każdej próbki (końcowa objętość 25 µl): 16,95 µl PCR wody do biologii molekularnej, 2,5 µl buforu 10 x PCR (Eurogentec), 1,1 mM MgCl₂ (Eurogentec), 100 µM każdej zasady dNTP (NEB), 0,2 µM każdego startera (PxadU i PxadL) i 1U RedGoldstarTaq polimerazy (Eurogentec). Dodać 2µl ekstraktu roślinnego lub zawiesiny czystej kultury bakterii. Zastosować następujące parametry cyklu: 94°C przez 3 min (denaturacja wstępna), 35 cykli w 94°C przez 30s, 70°C przez 30s, 72°C przez 2 minuty i etap końcowego wydłużania w 72°C przez 10 min. Produkty amplifikacji PCR są wykrywane przez elektroforezę w 1% Seakem LEagarose (FMC Bioproducts, Rockland, ME) i barwione bromkiem etydyny. Jeżeli na żelu widoczny jest amplikon o wielkości 1570 par zasad, wykorzystując otrzymane w reakcji PCR produkty przeprowadza się analizę polimorfizmu długości fragmentów restrykcyjnych z użyciem enzymu Hinc II, jak opisano w 2.3.

2.2.2 Nested PCR

Dla drugiej rundy PCR przygotować taką samą mieszaninę reakcyjną, jak opisano poniżej za wyjątkiem starterów, które w tej rundzie są: NXadU i NXadL. Z pierwszej mieszaniny reakcyjnej odpipetować 1µl i dodać do master mixu. Stosować następujące parametry reakcji PCR: 94°C przez 3 minuty (wstępna denaturacja), 20 cykli w temperaturze 94°C przez 30 sekund, 70°C przez 30sekund i 72°C przez 30 sekund i etap końcowego wydłużania w temperaturze 72°C przez 5 minut. Produkty amplifikacji PCR są wykrywane w procesie elektroforezy w 1% Seakem LEagarose (FMC Bioproducts, Rockland, ME) i barwione bromkiem etydyny.

Z wykorzystaniem produktów reakcji nested PCR może być również przeprowadzona analiza RFLP w warunkach opisanych w punkcie 2.3. w celu rozróżnienia szczepów należących do *Xanthomonas axonopodis* pv. *dieffenbachiae* i *Xanthomonas campestris* pv. *syngonii*.

Aby ograniczyć ryzyko kontaminacji, runda nested PCR nie jest zalecana do identyfikacji (z zawiesiny bakteryjnej). Jednakże, jeśli krok ten jest wykonywany, amplikony otrzymane w rundzie pierwszej powinny zostać rozcieńczone w wodzie dejonizowanej w stosunku 1:100.

2.3 Reakcja Polimorfizmu długości fragmentów restrykcyjnych (RFLP)

2.3.1 Przygotowanie roztworu DNA

Analiza RFLP przeprowadzana jest na ampliconie uzyskanym podczas pierwszej rundy reakcji PCR lub drugiej rundy reakcji nested-PCR (stężenie DNA około 20 ng/μl). Roztwór DNA może być przechowywany w temperaturze poniżej -18°C.

2.3.2 Reakcja RFLP

Całkowita objętość reakcyjna	15	μl
PCR woda	7,35	μl
DNA roztwór (20 ng/μl)	5	μl
RFLP bufor	1,5	μl
BSA	0,15	μl
Hinc II	1	μl (= 10 jednostek)
Temperatura inkubacji	37°C	
Czas	3 h	
Temperatura denaturacji	94°C	
Czas	10 minut	

3. Podstawowe Informacje Proceduralne

3.1 Kontrole

Za każdym razem, kiedy jest przeprowadzany test oparty o reakcję PCR, powinny zostać dołączone następujące rodzaje kontroli:

3.1.1 Identyfikacja

- **kontrola ujemna** zawierającą nie poszukiwany kwas nukleinowy.
- **kontrola dodatnia** zawierającą kwas nukleinowy, który będzie amplifikowany w docelowej analizie.

Jako kontrola dodatnia może być użyta czysta kultura, ekstrahowana metodą lizy termicznej, szczepu referencyjnego *Xanthomonas axonopodis* pv. *dieffenbachiae* (LMG695).

3.1.2 Wykrywanie

- **kontrola ujemna ekstrakcji.** Sprawdza ekstrakcję szukanego kwasu nukleinowego przy wykorzystaniu tzw. próbki ślepej, która nie zawiera docelowego kwasu nukleinowego (np. nie zainfekowany materiał roślinny lub czysty bufor ekstrakcyjny).
- **kontrola dodatnia ekstrakcji.** Sprawdza ekstrakcję szukanego kwasu nukleinowego przy wykorzystaniu znanej próbki, która zawiera docelowy kwas nukleinowy (np. zainfekowany materiał roślinny lub syntetyczną kontrolę przygotowaną przez dodanie czystej kultury

bakterii *Xanthomonas axonopodis* pv. *dieffenbachiae* szczepu referencyjnego do zdrowego homogenatu liści *Anthurium*).

3.2 Interpretacja wyników

Test PCR (identyfikacja lub wykrywanie) jest *negatywny* jeżeli poszukiwany amplikon nie jest obserwowany lub jeżeli wielkość obserwowanych amplikonów nie jest odpowiednia, pod warunkiem że amplikon jest wykryty w próbkach kontroli pozytywnej.

Identyfikacyjny test PCR jest *pozytywny* jeżeli poszukiwany amplikon o właściwej wielkości jest obserwowany (1570 pz), i jeżeli nie miała miejsca amplifikacja w kontroli ujemnej. Wtedy na otrzymanym amplikonie powinien zostać przeprowadzony test RFLP z wykorzystaniem enzymu *Hinc II* (3 fragmenty: 234 pz, 711 pz i 625 pz).

Test PCR do wykrywania jest *pozytywny*, jeżeli obserwuje się amplikon o właściwej wielkości (785 pz) i jeżeli nie miała miejsca amplifikacja w próbce kontroli ujemnej. Jeżeli jest to konieczne, test RFLP może być wykonany na amplikonach nested PCR z wykorzystaniem enzymu *Hinc II* (2 fragmenty: 460 pz i 325 pz).

W przypadku otrzymania sprzecznych lub niejasnych wyników testy powinny zostać powtórzone.

Załącznik 5. Test patogeniczności

Patogeniczność może być łatwo określona przez infiltrację mezofilu zawiesiną (10^5 - 10^6 j.t.k./ml) z 24godzinnej hodowli bakterii na podłożu YPGA młodych liści *Anthurium*. Nie zaleca się inokulacji zawiesiną o wysokim mianie, ponieważ może ona wywoływać nietypowe reakcje. Ewentualnie, inokulacja z wykorzystaniem zawiesiny (10^6 jtk/ml) z 24 godzinnej hodowli bakterii na podłożu młodych łodyg roślin *Anthurium* może być wykonywane. Co najmniej trzy rośliny testowe powinny być inokulowane zawiesiną szczepu bakteryjnego. Szczep referencyjny *X .axonopodis* pv. *dieffenbachiae* (NCPBP 1833=PD 992=LMG 695) przygotowany jak opisano wcześniej powinien być użyty jako kontrola dodatnia. Sterylna woda destylowana może być użyta jako kontrola ujemna. Inną metodą inokulacji jest rozpylanie zawiesiny bakteryjnej na powierzchnię liści i utrzymywanie ich w 100% wilgotności względnej przez 12–16 godzin (*np.* przez umieszczenie zainokulowanych roślin w plastikowych pudełkach). Inkubacja powinna trwać do 4 tygodni w temperaturze 28°C w warunkach wysokiej wilgotności (względnej) (60–80%).

Objawy powinny pojawić się po 4 tygodniach od inokulacji roślin i w kontroli dodatniej ale nie w roślinach inokulowanych sterylną wodą destylowaną. Objawami są nasiąknięte wodą obszary w pobliżu nerwów na blaszce liściowej, nekrotyczne plamki otoczone żółtą strefą halo, i załamaniem roślin w późniejszych stadiach. Czasami obserwuje się krople żółtego śluzu bakteryjnego na zainfekowanej tkance. Bakteria powinna być reizolowana z roślin (odwołaj się do właściwego rozdziału w tym tekście). Czyste kultury mogą być zidentyfikowane za pomocą testu IF, testu ELISA lub testu PCR.

Tłumaczenie z jęz. angielskiego:	Sprawdził:	Zatwierdził:
Monika Kordyla-Bronka (GIORiN CL)	Anna Kołodziejska (GIORiN CL)	Janina Butrymowicz (GIORiN CL)
15.10.2009		