

Diagnostyka Diagnostics

PM7/42(2)*Clavibacter michiganensis* subsp. *michiganensis*

Zakres

Standard ten opisuje protokół diagnostyczny dla bakterii *Clavibacter michiganensis* subsp. *michiganensis*¹

Zatwierdzenie i nowelizacja

Zatwierdzono w 2009-09.

Rewizja przyjęta w 2012-09

Wprowadzenie

Clavibacter michiganensis subsp. *michiganensis* został jako sprawca raka bakteryjnego pomidora po raz pierwszy opisany w Północnej Ameryce w roku 1910. Obecnie patogen ten występuje na terenie wszystkich głównych obszarów produkcji pomidorów a także jest dość szeroko rozprzestrzeniony w regionie EPPO (EPPO/CABI, 1998). Występowanie tego patogena jest zwykle nieprzewidywalne, po latach nieobecności lub ograniczonego występowania może nastąpić epidemia.

Najważniejszą rośliną żywicielską jest pomidor, ale w niektórych przypadkach stwierdzono występowanie naturalnej infekcji na *Capsicum*, oberżynie oraz wielu chwastach należących do *Solanum* (np. *S. nigrum*, *S. douglasii*, *S. trifolium*). Pozostałe rośliny psiankowate wykazują wrażliwość na sztuczną inokulację (Thyr *et al.*, 1975). Wiele roślin z rodziny psiankowatych oraz nie psiankowatych np. *Datura stramonium*, *Chenopodium album* i *Amaranthus retroflexus* zostało określonych jako rezerwuuar umożliwiający epifityczne przeżycie oraz rozprzestrzenienie się bakterii (Chang *et al.*, 1992). Znaczenie tej populacji epifitycznej nie jest jeszcze w pełni zrozumiałe, choć wydaje się, że może przyczyniać się do infekcji poprzez rany powstałe po cięciach (Carlton *et al.*, 1994).

Głównym mechanizmem rozprzestrzeniania się bakterii *C. michiganensis* subsp. *michiganensis* z rośliny na roślinę w uprawach pomidora są zranienia powstające np. podczas usuwania liści lub pędów rozwijających się z pąków kątowych (Strider, 1969). Ponadto nowe rozwiązania w hodowli młodych roślin pomidora np. szczepienie na sadzonkach oraz przycinanie w celu wyprodukowania dwóch łodyg mogą sprzyjać infekcji i rozprzestrzenieniu się patogena (Chang *et al.*, 1992; Xu *et al.*, 2010). Takie praktyki powodują powstawanie ran zarówno na sadzonkach jak i na zrazach powodując szybki dostęp do tkanek przewodzących.

Patogen jest często przenoszony na duże odległości za pośrednictwem nasion, zarówno na powierzchni nasion jak i w ich środku. Ilość bakterii w porażonych nasionach zwykle waha się pomiędzy 10^2 a 10^4 kom./nasionko. Młode rośliny porażone w sposób utajony również są brane pod uwagę jako istotne w rozprzestrzenianiu się bakterii (De Léon *et al.* 2011). Czynnikiem krytycznym jest zwiększona koncentracja młodych roślin w szkółkach oraz produkcja szczepionych sadzonek w krajach gdzie występuje patogen.

¹Nazwy użytych odczynników lub wyposażenia w tym Standardzie EPPO nie wykluczają zastosowania innych, które również mogą być odpowiednie.

Dodatkowe informacje można znaleźć w materiałach EPPO dotyczących bakterii *C. michiganensis* subsp. *michiganensis* (EPPO/CABI, 1997).

Procedura diagnostyczna w przypadku roślin wykazujących objawy chorobowe (Ryc.1) włączając izolację z zainfekowanej tkanki na podłoże nie selektywne i/lub pół-selektywne, po której następuje identyfikacja podejrzanych izolatów łącznie z określeniem patogeniczności. Procedura ta zawiera testy, które zostały poddane walidacji (dla których dane walidacyjne zostały przedstawione wraz z opisem poszczególnych testów) oraz testy, które są aktualnie wykorzystywane w niektórych laboratoriach, a dla których pełne dane walidacyjne nie są jeszcze dostępne. Przedstawione zostały dwie różne procedury przeznaczone do badania nasion pomidora (Ryc.2). Ponadto protokół służący przesiewowemu wykrywaniu bezobjawowej, utajonej infekcji sadzonek roślin pomidora został przedstawiony w Załączniku 1, choć nie został on jeszcze w pełni zwalidowany.

Tożsamość

Nazwa: *Clavibacter michiganensis* subsp. *michiganensis* (Smith, 1910; Davis et al., 1984)

Synonimy: *Corynebacterium michiganense* subsp. *michiganense* (Smith, 1910; Carlson i Vidaver, 1982), *Corynebacterium michiganense* pv. *michiganense* (Smith, 1910; Dye i Kemp, 1977), *Corynebacterium michiganense* (Smith, 1910; Jensen, 1934)

Pozycja taksonomiczna: Królestwo *Procaryotae*, Dział II *Firmicutes* Gibbons & Murray 1978, Klasa I *Firmibacteria*. Rodzaj *Clavibacter* należy do patogenicznych dla roślin bakterii coryneform, których ściana komórkowa zawiera peptidoglican zawierający kwas 2,4-diaminobutyric jako dwuzasadowy aminokwas (Davis et al., 1984). Bezwzględne tlenowce, Gram-dodatnie pałeczki, które nie produkują endospor. Zwykle wykazują ułożenie w kształcie liter V, Y i palisadowe. Infekcje powodowane przez większość rodzaju *Clavibacter* są infekcjami systemicznymi lub się nimi stają kiedy patogen zasiedli tkankę przewodzącą.

Kod komputerowy EPPO : CORBMI

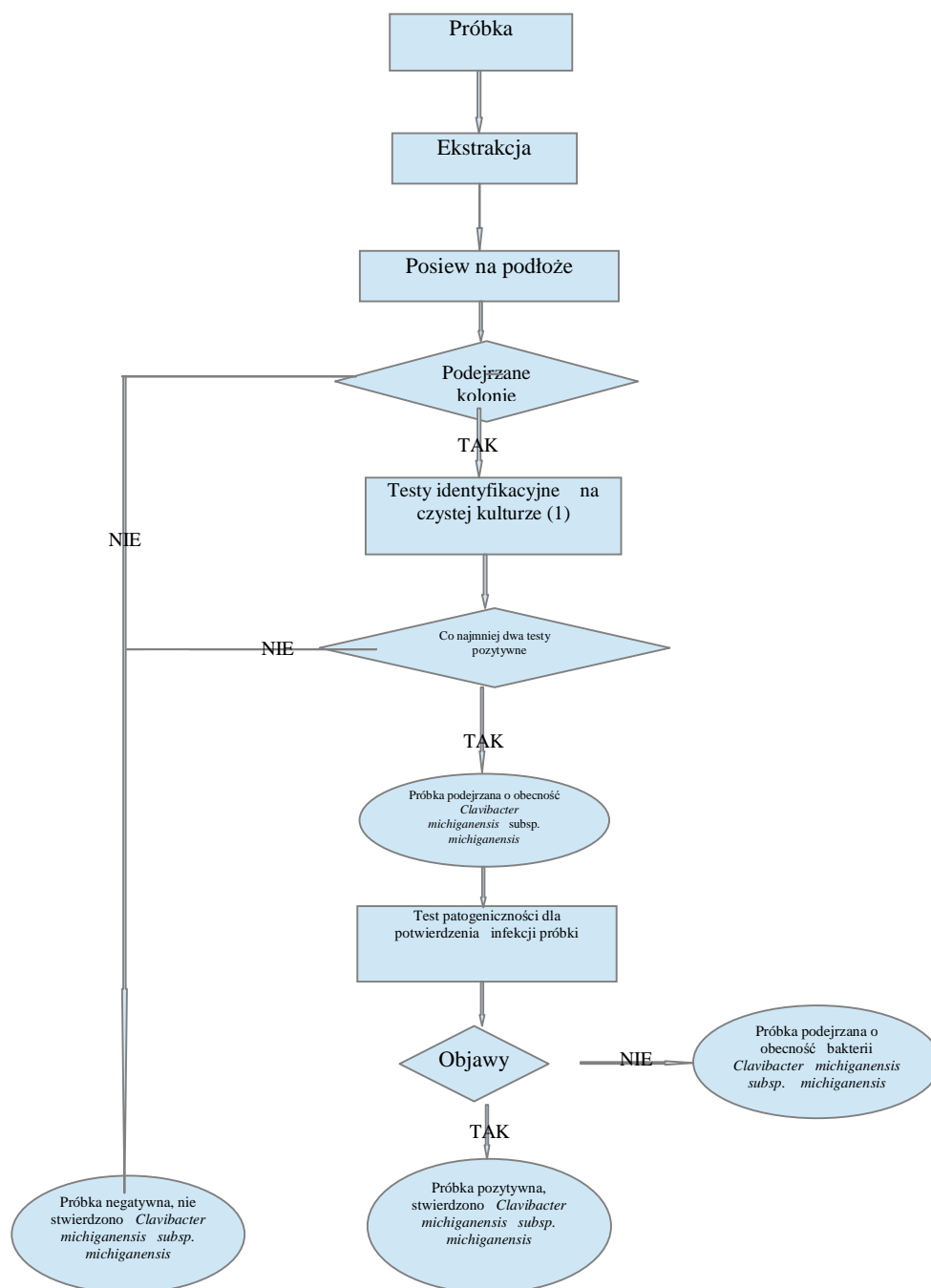
Klasyfikacja fitosanitarna: lista A2 EPPO nr 50, UE załącznik II/A2

Wykrywanie

Objawy chorobowe

Clavibacter michiganensis subsp. *michiganensis* powoduje głównie infekcję systemiczną roślin pomidora. Ponadto patogen ten może także powodować plamistości na liściach, ogonkach liściowych, szypułkach i owocach jako wynik infekcji miejscowej, zwykle spowodowane jest to podlewaniami roślin od góry. Można spotkać się z szerokim zakresem objawów, które uzależnione są od miejsca produkcji (szklarnia lub pole), wieku rośliny, czasu infekcji, zabiegów pielęgnacyjnych, warunków uprawy itp. Ponadto istnieje doświadczalny dowód na to, że istnieją szczepy, które powodują mniej ostre objawy (dane niepublikowane, Catara V.–komentarz osobisty). Objawy można podzielić na dwa typy w zależności od tego czy infekcja jest systemiczna i nastąpiła poprzez tkankę przewodzącą czy powierzchniową na powierzchni rośliny.

W przypadku infekcji systemicznej chorobę można często rozpoznać we wczesnym stadium, która objawia się występowaniem matowych, zielonych, tłustych obszarów pomiędzy żyłkami liścia, które gwałtownie wysychają tworząc stopniowo jasno brązowe nekrozy często występujące brzegowo powodując, że roślina wygląda jak przypalona, a nawet jakby była spalona słońcem lub jakby przedawkowano środki chemiczne. Małe zaatakowane przez bakterie powierzchnie mogą ulec połączeniu powodując powstawanie większych nekrotycznych stref (Ryc. 3). Więdnięcie jednego bądź kilku niżej położonych liści jest objawem postępującej infekcji systemicznej i często zdarza się, że jedna część blaszki liściowej ulega więdnięciu (Ryc.



Ryc.1 Schemat wykrywania i identyfikacji *Clavibacter michiganensis* subsp. *michiganensis* w próbkach z objawami (1) Co najmniej dwa testy oparte na różnych zasadach biologicznych powinny być wykonane (np. testy biochemiczne, serologiczne lub molekularne) lub dwa testy molekularne oparte na różnej sekwencji DNA poszukiwanej w genomie.

4), co najmniej w okresie wzmożonej transpiracji. W warunkach sprzyjających rozwojowi bakterii (25°–30°C i w wyniku stresu spowodowanego transpiracją) całe liście ulegają wędnięciu i zasychaniu w ciągu kilku dni (Ryc. 5). Ostatecznie cała roślina wędnie i zamiera. W warunkach mniej sprzyjających rozwojowi bakterii, można obserwować opóźnione odwracalne wędnięcie, a w przypadku wykonania zabiegu defoliacji roślina może nie wykazywać żadnych objawów wędnięcia. Owoce roślin porażonych systemicznie mogą mieć zaburzony rozwój i opadać lub dojrzewać nierówno. Mogą przyjmować wygląd marmurkowaty z

wydłużonymi paskowymi chlorozami i wewnętrznym blednięciem wiązek przewodzących oraz otaczających tkanek. Typowe plamy na liściach lub owocach są powodowane infekcją zewnętrzną, są one rzadziej spotykane w uprawach szklarniowych niż uprawach polowych.

Analizując infekcję systemiczną można stwierdzić, że w przekroju poprzecznym tkanki przewodzącej łodygi więdnących roślin zwykle obserwuje się przebarwienia w kolorze ciemnożółtym do brązowego w szczególności w węzłach. W szczególności tkanka miękiszowa ma mączysty wygląd spowodowany degradacją wywołaną przez bakterie oraz produkcją śluzu (Ryc. 6). Miękisz może ulec całkowitemu zapadnięciu się. Obecność infekcji systemicznej spowodowanej przez bakterie *Clavibacter michiganensis* subsp. *michiganensis* można wykryć poprzez zawieszenie przeciętej powierzchni łodygi w szklanej probówce z wodą wodociągową. Po upływie kilku minut wyciek bakteryjny będzie spontanicznie powodował powstanie mlecznej zawiesiny.

Infekcja powierzchniowa powstaje kiedy bakterie ulegną namnożeniu na powierzchni rośliny lub w obrębie zranień lub aparatów szparkowych. Liście, łodygi oraz kielichy mogą przybrać mączysty wygląd jakby były posypane grubą mąką. Bezpośrednie badanie ukazuje wzniesione lub wklęsłe pęcherzyki koloru białego lub blado pomarańczowego. Mączyste plamy na łodygach są zwykle bardziej wyraziste niż plamy na liściach. Najczęściej spotykanym objawem na liściu jest ciemnobrązowa plama otoczona przez żółto-pomarańczową otoczkę występująca na brzegu liścia co jest spowodowane infekcją gruczołów wydzielających wodę (hydatody). Listki najstarszych porażonych liści ulegają zwinięciu, a ich brzegi początkowo żółte stają się następnie nekrotyczne (Carlton *et al.*, 1998). Wzrost roślin jest słaby i stopniowo prowadzi do całkowitego zaschnięcia roślin. Wzdłuż łodygi rozwijają się żółte smugi i czasami ulegają one otwarciu w węzłach powodując powstawanie zrakowaceń. Tkanka miękiszowa może ulec całkowitemu zapadnięciu. Czasami obserwuje się pęcherzykowate uszkodzenia na łodygach. Objawy na porażonych owocach mogą rozpocząć się jako małe, delikatnie wzniesione uszkodzenia z białą obwódką lub halo. Uszkodzenia tego typu mogą ulec powiększeniu do kilku mm z brązowym chropowatym środkiem, nazywane „ptasimi oczkami”. Wiele uszkodzeń może tworzyć się blisko kielichów gdzie owoce formują się w grona. Tkanka przewodząca pod kielichami ulega zbliznowaceniu co skutkuje powstawaniem nasion w kolorze ciemnożółtym do brązowego. Powstawanie objawów raka, od których pochodzi nazwa pospolita choroby jest obecnie bardzo rzadko spotykane; co powoduje, że w rzeczywistości jest to błędna nazwa.

Mało prawdopodobne jest aby objawy choroby pojawiły się przez wytworzeniem trzeciego lub czwartego grona owoców. Objawy powodowane przez *Clavibacter michiganensis* subsp. *michiganensis* nie występują w przypadku młodych roślin. Jednakże więdnienie może pojawić się wcześniej na posadzonych roślinach lub w mnożarce, istnieje możliwość, że plamistości na liściach mogą pojawić się na młodych roślinach jako wynik miejscowej infekcji w przypadku nadmiernej wilgotności (Ryc. 7). Objawy więdnienia powodowane przez *Clavibacter michiganensis* subsp. *michiganensis* mogą być mylone z objawami powodowanymi przez inne choroby systemiczne pomidora powodowane przez *Ralstonia solanacearum*, *Fusarium* spp. lub *Verticillium* spp.



Ryc. 3 Uszkodzone białe powierzchnie liścia



Ryc. 4 Flaccidity i wędnięcie liści



Ryc. Wędnięcie i zamieranie roślin pomidora



Ryc. Porażona tkanka przewodząca łodygi z mączystym wyglądem naczyń parenchymy.



Ryc. Infekcja miejscowa liścia papryki w szkółce

Wykrywanie w roślinach wykazujących objawy

Procedura ekstrakcji

Próbka powinna zawierać wszystkie nadziemne części rośliny wykazującej objawy chorobowe. Rośliny więdnące należy odciąć u podstawy łodygi, a więdnące liście usunąć i poddać badaniom w celu sprawdzenia czy obecne są przebarwienia tkanek przewodzących u podstawy złamanych ogonków liściowych. Łodygę należy przeciąć w węzłach i przebadać w podobny sposób w poszukiwaniu przebarwień tkanek przewodzących w przeciętych powierzchniach. Delikatnie usunąć skórkę i pozostałe tkanki oddzielając je od zaatakowanych naczyń przewodzących. W przypadku braku przebarwień tkanki przewodzącej należy pobrać fragmenty łodygi na innej wysokości rośliny, a w szczególności z korony. W zaawansowanym stadium więdnienia może pojawić się wyciek bakteryjny w przewodzącej tkance miękiszowej ułatwiający oddzielenie zewnętrznych warstw tkanki łodygi. Małe fragmenty zaatakowanej tkanki przewodzącej usunąć za pomocą sterylnego skalpela i moczyć w małej objętości (około 5 ml) sterylnej wody demineralizowanej lub 0,01 M buforu fosforanowego z zawartością soli (PBS; Załącznik 2) do 30 minut w celu umożliwienia dyfuzji bakterii z tkanki roślinnej. Zwykle zawiesina staje się gwałtownie mleczna. W przypadku ekstrakcji bakterii z szypułek lub plam na owocach należy delikatnie zdezynfekować powierzchniowo np. poprzez przetarcie 70% etanolem. Następnie usunąć za pomocą zdezynfekowanego skalpela kilka młodych plamistości i moczyć w małej objętości sterylnego 0,01 M buforu fosforanowego PBS jak wyżej (Załącznik 2).

Posiew na podłoże

Izolację bakterii *Clavibacter michiganensis* subsp. *michiganensis* z zainfekowanej tkanki roślinnej (tkanka przewodząca, plamy na liściach, ogonkach owoców lub inne zgniłe tkanki) można zwykle przeprowadzić w ciągu 3 dni wykorzystując odpowiednie nie-selektywne podłoże hodowlane takie jak YPGA (Załącznik 2). W przypadku występowania w próbce większej ilości saprofitów może być konieczne zastosowanie połączenia z podłożem pół selektywnym (CMM1, FSCM lub SCM; Załącznik 2). Typowe kolonie tworzą się podczas inkubacji w temperaturze 28°C (± 3°C) w ciągu dwóch do dziesięciu dni. Opisy typowych kolonii wyhodowanych na tych podłożach zostały zaprezentowane w tabeli 1. Podejrzane kolonie należy oczyścić poprzez pasażowanie na podłożu YPGA lub NA. Seryjne rozcieńczenia zawiesin szczepów referencyjnych *Clavibacter michiganensis* subsp. *michiganensis* (Załącznik 3) w sterylnym buforze 0,01M PBS (Załącznik 2) należy posiać na takie same podłoża jako kontrole pozytywne.

Podłoże	Średni czas rozwoju	Opis kolonii
CMM1	5-10 dni	Żółte, śluzowate i wypukłe (Ryc.8) intensywnie żółte podczas dłuższej inkubacji.
SCM i FSCM	5-10 dni	Półprzezroczyste szare, śluzowate często o nieregularnym kształcie ze zmieniającym się z szarego do czarnego środkiem (Ryc.9).
YPGA	3-4 dni	Lekko żółte, płaskie i lekko śluzowate, okrągłe lub nieregularne (Ryc. 10) intensywnie żółte, matowe i lśniąco podczas dłuższej inkubacji.

Tabela 1: Opis kolonii *Clavibacter michiganensis* subsp. *michiganensis* na różnych podłożach hodowlanych.

Szybkie testy w celu wykonania wstępnej diagnozy.

W przypadku wykonania izolacji, w celu zdiagnozowania materiału wykazującego objawy chorobowe nie jest wymagane przeprowadzenie dalszego badania. W przypadku, kiedy wymagane jest przeprowadzenie większej liczby szybkich testów lub kiedy wstępna izolacja z próbek z typowymi objawami nie powiedzie się mogą być pomocne dodatkowe testy przesiewowe jak: immunofluorescencji (IF) lub łańcuchowa reakcja polimerazy (PCR) w celu identyfikacji utajonej lokalizacji bakterii w zainfekowanych roślinach. Instruktaż do wykonania testu IF został przedstawiony w Standardzie EPPO PM7/97 „Test immunofluorescencji pośredniej dla bakterii patogenicznych dla roślin”, a wymagania specjalne dotyczące wykrywania bakterii *Clavibacter michiganensis* subsp. *michiganensis* testem IF zostały przedstawione w Załączniku 4. Szczegółowy instruktaż do przeprowadzenia testu PCR został przedstawiony w Załączniku 5. Należy zwrócić uwagę na fakt, że metoda IF może dawać wyniki fałszywie pozytywne z powodu nie całkowitej specyficzności przeciwciał oraz, że metoda PCR została zwalidowana przy wykorzystaniu czystych kultur oraz ekstraktów nasion dlatego użycie do badania materiału roślinnego może hamować reakcję PCR powodując wyniki fałszywie negatywne. Próbki uznane w wyniku testów przesiewowych za pozytywne będą wymagały izolacji jako dalszego badania potwierdzającego. W celu sprawdzenia czy nie otrzymano fałszywie negatywnych wyników niezbędne jest odpowiednie użycie materiałów kontrolnych (włączając kontrole wewnętrzne PCR).

Wykrywanie w sadzonkach nie wykazujących objawów

Wykrywanie porażenia utajonego *Clavibacter michiganensis* subsp. *michiganensis* w sadzonkach nie wykazujących wyraźnych objawów chorobowych jest nieprzewidywalne ponieważ przypadki porażenia oraz rozmieszczenie patogena (w korzeniach, łodygach lub liściach) może być zróżnicowane w zależności od stanu sadzonek, np. czy były one przesadzane lub czy do podlewania używana była woda pochodząca z obiegu zamkniętego (Van Vaerenbergh *et al.* 1985; Huang i Tu, 2001; Xu *et al.* 2012; Kawaguchi *et al.*

2010). Metoda przeznaczona do badania sadzonek została informacyjnie zaproponowana w Załączniku 1, jednakże nie została ona w pełni zwalidowana.

Wykrywanie w próbkach nasion

Zostały opisane dwie procedury do wykrywania bakterii *Clavibacter michiganensis* subsp. *michiganensis* w próbkach nasion. Wybór procedury powinien być oparty na doświadczeniu użytkownika. Zostały one osobno zwalidowane, a ponieważ nie zostały przeprowadzone badania porównujące te dwie procedury nie można uznać ich za równoważne.

- **Procedura A** (patrz Ryc.2A) polegająca na moczeniu nasion w lodówce, a następnie miażdżeniu mechanicznym oraz izolacji bakterii z ekstraktu roślinnego na co najmniej dwa podłoża półselektywne. Podczas walidacji tej procedury dwa testy PCR zostały użyte z sukcesem do identyfikacji podejrzanych izolatów wykazujących charakterystyczne typowe kolonie *Clavibacter michiganensis* subsp. *michiganensis*, a następnie test patogeniczności (test ten został opisany w sekcji identyfikacja).
- **Procedura B** (patrz Ryc.2B) polegająca na moczeniu nasion w temperaturze otoczenia w celu pobudzenia patogena do namnażania, a następnie wykonaniu testu przesiewowego immunofluorescencji (IF) uzupełnionego w przypadku uzyskania wyniku pozytywnego testem PCR oraz testem biologicznym.

Wielkość próbki i podróbki

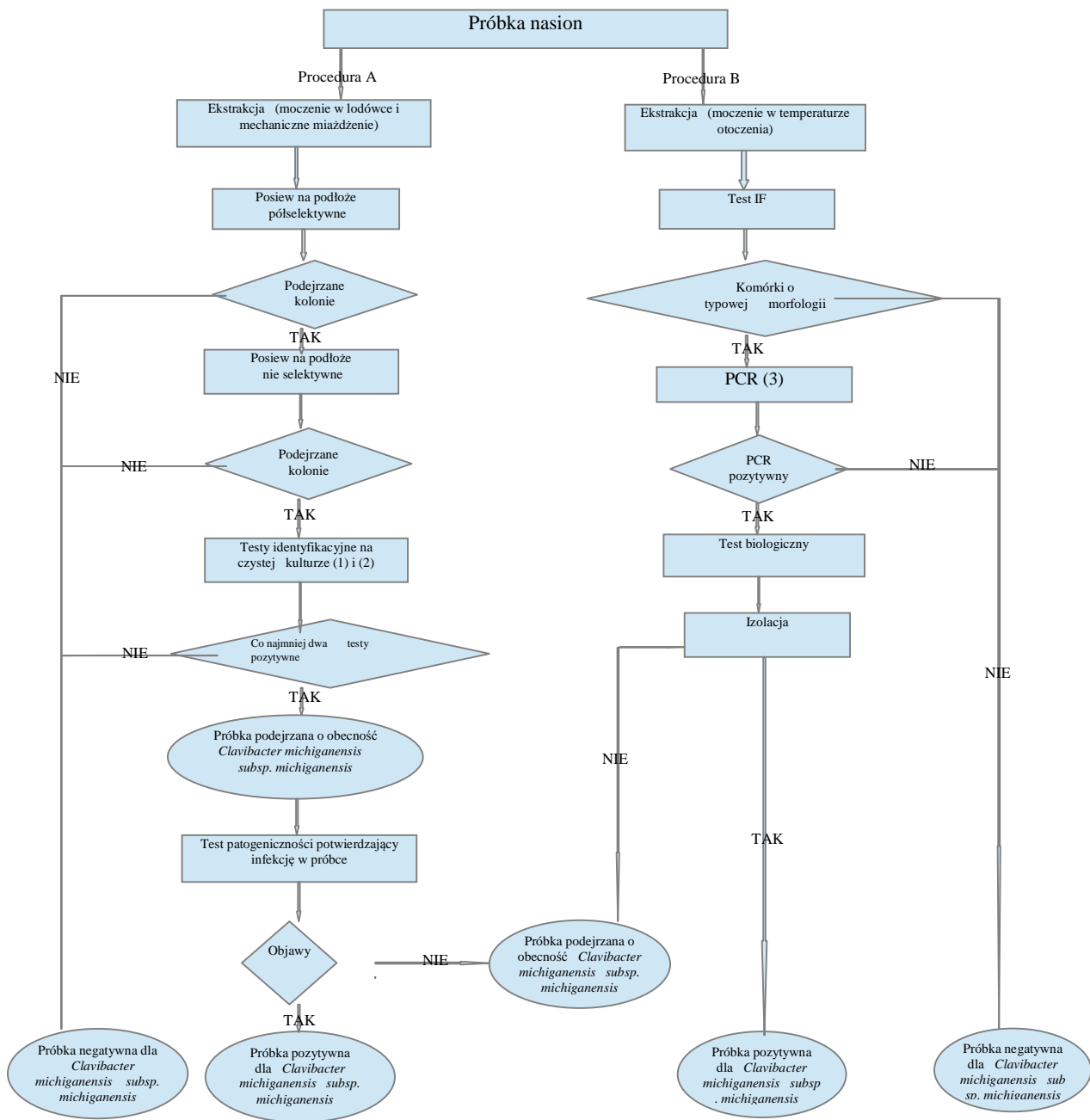
Zalecana minimalna wielkość próbki wynosi 10000 nasion, zapewniając 95% prawdopodobieństwo wykrycia porażenia na poziomie 0,03% w partii nasion (jak to przedstawiono w podręczniku: ISHI-Veg Seed Health Testing Methods Reference Manual, ISF 2013). W przypadku zastosowania procedury A należy poddać badaniu co najmniej 2 podpróbki każda składająca się z nie więcej niż 10000 nasion (np. 2 podpróbki po 5000 nasion dla próbki składającej się z 10000 nasion lub 5 podpróbek po 10000 nasion dla próbki wielkości 50000 nasion). W przypadku procedury B maksymalna wielkość podróbki wynosi 2000 nasion. Próbki i podróbki można ustalić według wagi tysiąca nasion.

Nasiona zaprawione

Ekstrakcja bakterii *Clavibacter michiganensis* subsp. *michiganensis* z nasion powinna pozwalać na optymalne wykrycie komórek bakterii znajdujących się zarówno na zewnątrz jak i wewnątrz nasion. Ponieważ zaprawienie nasion może wpływać na pewność testów opisanych w procedurach A i B (ISF, 2011), należy badanie wykonać na nasionach niezaprawionych. Wpływ dodawanego HCl podczas ekstrakcji nasion z owoców (powszechne wymaganie fitosanitarne) na badanie nie został uwzględniony. Opisane metody nie zostały sprawdzone z użyciem nasion zaprawionych² i nie powinny być stosowane do takich nasion bez wcześniejszej walidacji. Jeśli nie można zagwarantować, że partia nasion nie była zaprawiona zaleca się przez wykonaniem ekstrakcji z nasion skontaminowanie dodatkowej podróbki za pomocą zawiesiny znanego szczepu referencyjnego. Zapewni to kontrolę nad wpływem inhibitorów na wzrost bakterii *Clavibacter michiganensis* subsp. *michiganensis* na podłożu do izolacji (Procedura A), lub na zahamowanie namnażania się bakterii podczas procesu wzbogacania (Procedura B).

²

Odnosi się to także do nasion otoczkowanych lub powleczonych



Ryc. 2 Schemat wykrywania i identyfikacji *Clavibacter michiganensis subsp. michiganensis* w próbkach nasion (1) należy wykonać co najmniej dwa testy oparte na różnych cechach patogena (np. połączenie testów biochemicznych, serologicznych lub molekularnych) lub dwa testy molekularne oparte na różnych sekwencjach poszukiwanego DNA w genomie. (2) Dane walidacyjne przedstawione w tym protokole dla Procedury A zostały oparte na połączeniu posiewu na podłoże z dwoma testami PCR. (3) Dane walidacyjne przedstawione w tym protokole dla Procedury B zostały oparte na teście PCR opisanym w Załączniku 5.

Procedura A oparta na posiewie na podłoże półselektywne

Test posiewu na podłoża półselektywne CMM1 i FSCM lub SCM został zwalidowany zgodnie ze Standardem EPPO PM 7/98 Wymagania specyficzne dla laboratoriów przygotowujących akredytację w zakresie diagnostyki organizmów szkodliwych dla roślin.

1. Ekstrakcja z nasion

Umieścić podpróbki w woreczkach wykonanych z mocnego polietylenu np. typu Stomacher lub Bioreba z wewnętrznym filtrem. Przed ekstrakcją dodać 4 ml sterylnego 50 mM buforu fosforanowego (Załącznik 2) na 1g nasion i pozostawić w temp. 2-6°C przez 16-24 godziny użyć Bagmixer (Interscience) lub Stomacher (Seward). Krytycznym punktem ekstrakcji jest czas oraz intensywność ponieważ zlokalizowane we wnętrzu nasion bakterie należy pozyskać przez: 4 minutową macerację przy najwyższej szybkości w przypadku zastosowania Interscience Bagmixer lub 8 minutowa w przypadku zastosowania Seward Stomacher. Po zakończeniu maceracji bufor do ekstrakcji bakterii z nasion ma kolor mleczny. Następnie przez 5 minut pozwolić na opadnięcie osadu w temperaturze otoczenia i w celu oczyszczenia próbki z większości zanieczyszczeń zagęścić przez wirowanie 10 ml ekstraktu z nasion poprzez wirowanie przy niskiej prędkości (180g przez 5 minut do 1000g przez 1 min.). Zlać supernatant do sterylnej probówki wirówkowej i wirować przez 20 min. w temp. około 4°C z przyspieszeniem 9000g. Usunąć supernatant, a osad zawiesić w 1 ml 50 mM PB i zworteksować aby otrzymać 10 x zagęszczoną zawiesinę. Otrzymaną zawiesinę podzielić na 2x 500 µl. Jedno 500 µl użyć do badań, a drugie 500 µl do zalecanych kontroli w teście izolacji.

2. Posiew na podłoże półselektywne

Ekstrakt uzyskany z nasion jest następnie posiewany na co najmniej dwa podłoża półselektywne CMM1 i FSCM lub SCM (Załącznik 2). Posiać na płytki z podłożem CMM1 i FSCM lub SCM po 100 µl 10-krotnie skoncentrowanego ekstraktu oraz przygotowanych w 50 mM PB rozcieńczeń 10^{-1} i 10^{-2} (Załącznik 2) i inkubować w temp. 28°C ($\pm 3^\circ\text{C}$).

3. Kontrole dołączone do testu posiewu na podłoże

a. Kontrola pozytywna

W celu upewnienia się, że *Clavibacter michiganensis* subsp. *michiganensis* jest zdolny do wzrostu i formowania kolonii o charakterystycznej morfologii na przygotowanym podłożu wzrostowym należy przygotować zawiesinę szczepu referencyjnego (Załącznik 3) w buforze 0,01 M PBS zawierającą 10^3 jednostek tworzących kolonie/ml. Z uzyskanej zawiesiny posiać po 100 µl na płytki z podłożem CMM1 i FSCM lub SCM, a typowe kolonie powinny formować się w ciągu 10 dni po inkubacji w temp. 28°C ($\pm 3^\circ\text{C}$).

b. Kontrole kontaminowane

Ponieważ obecność innych mikroorganizmów lub składników hamujących, obecnych w ekstrakcie z nasion ma wpływ na zdolność wykrycia *Clavibacter michiganensis* subsp. *michiganensis* na podłożu półselektywnym zaleca się aby stosować dodatkowe kontrole dla podpróbek, jak to opisano poniżej.

Kontaminacja kontroli ekstraktu: Dla każdej podpróbki należy skontaminować 10x skoncentrowany ekstrakt nasion za pomocą szczepu odpornego na rifampicinę (patrz Załącznik 3) na zalecanym poziomie 200-500 jednostek tworzących kolonie/ml. Skontaminowany ekstrakt posiać (100 µl na szalkę) na każde z półselektywnych podłoży (CMM1 i FSCM lub SCM), a następnie inkubować przez 10 dni w ciemności w temp. 28°C ($\pm 3^\circ\text{C}$). Jeśli to konieczne można uzyskać skontaminowany szczep z rosnącego dowolnego dzikiego typu *Clavibacter michiganensis* subsp. *michiganensis* uzyskanego z zainfekowanej próbki nasion poprzez zbadanie zdolności wzrostu na podłożu (np. YPGA) zawierającym 50 ppm rifampicyliny.

Skontaminowana kontrola buforu: Informację w celu upewnienia się o antybiotykowej wyraźnej oporności izolatu (Załącznik 3) można skutecznie uzyskać z każdego podłoża do izolacji, a porównanie jego odzysku z ekstraktu nasion skontaminowanego 10-krotnie (jak wyżej) należy

wykonać z odzysku z 50mM PB buforu ekstrakcyjnego (Załącznik 2) po kontaminacji 200-500 jednostek tworzących kolonie/ml jak to przedstawiono powyżej.

4. Interpretacja wyników testu rozcieńczeń płytkowych
Po upływie około 10 dni inkubacji w temp. 28°C (± 3°C) na różnych podłożach półselektywnych można odnotować wzrost *Clavibacter michiganensis* subsp. *michiganensis*. W pierwszej kolejności należy sprawdzić wygląd kolonii (kolor i morfologię) i wzrost *Clavibacter michiganensis* subsp. *michiganensis* na płytkach kontrolnych. Wygląd kolonii bakterii *Clavibacter michiganensis* subsp. *michiganensis* może być różny na różnych podłożach półselektywnych (zobacz Tabela 1). Interpretacja testu jest możliwa tylko w przypadku, gdy wyniki dla różnych kontroli mieszczą się w oczekiwanych granicach (zobacz poniżej)

Interpretacja kontroli pozytywnej

Kolonie na szalkach z kontrolą pozytywną powinny wykazywać oczekiwaną koncentrację (30-300 jednostek tworzących kolonie/płytkę) oraz morfologię.

Interpretacja kontroli skontaminowanych (w przypadku użycia)

Skontaminowany ekstrakt kontrolny: aby uznać kontrolą za pozytywną *Clavibacter michiganensis* subsp. *michiganensis* powinien być widoczny na płytkach co najmniej jednego z podłoży półselektywnych. Brak obecności bakterii *Clavibacter michiganensis* subsp. *michiganensis* w takiej kontroli jest wskazaniem, że nastąpiła inhibicja lub utrata żywotności bakterii użytych do kontaminacji ekstraktu z powodu toksyczności konkurencyjnej mikroflory nasion lub niewłaściwego podłoża (np. z powodu błędnego przygotowania, wieku lub wpływu fizjologicznego).

Skontaminowana kontrola za pomocą szczepu: Liczba kolonii szczepu odpornego na antybiotyki powinna być w przewidywanym stężeniu. Brak obecności bakterii *Clavibacter michiganensis* subsp. *michiganensis* w tak przygotowanej kontroli wskazuje na źle przygotowane podłoże lub utratę żywotności bakterii.

5. Identyfikacja domniemanych izolatów uzyskanych z ekstraktów z nasion
Podejrzone kolonie (2-5 na płytkę izolacyjną) należy przeszczerić na podłoże nie selektywne np. YPGA lub NA w celu przeprowadzenia dalszych badań. Tabela nr 1 przedstawia charakterystyczne cechy morfologiczne kolonii na różnych podłożach (zobacz również ryc. 8 i 10).

Metody służące do identyfikacji podejrzanych izolatów bakterii *Clavibacter michiganensis* subsp. *michiganensis* zostały opisane w sekcji Identyfikacja.



Ryc. 8 Wygląd kultur bakterii trzech różnych izolatów *Clavibacter michiganensis* subsp. *michiganensis* na podłożu CMM1 po 10 dniach inkubacji w temp. 28°C. Kolonie *Clavibacter michiganensis* subsp. *michiganensis* na podłożu CMM1 są żółte, śluzowate i wypukłe. W wyniku dłuższej inkubacji kolor staje się intensywnie żółty. Dłuższy czas inkubacji powoduje zmianę kształtu kolonii na nieregularne. Rozmiar oraz kolor kolonii jest raczej zróżnicowany. Kolonie *Clavibacter michiganensis* subsp. *michiganensis* przedstawione na zdjęciach są raczej niewielkie ponieważ nie pochodzą one z ekstraktu nasion lecz z zawiesiny wykonanej w buforze PB (zdjęcie dzięki uprzejmości H. Koenraad, Naktuinbouw, Holandia).



Ryc. 9 Wygląd kultur bakterii trzech różnych izolatów *Clavibacter michiganensis* subsp. *michiganensis* na podłożu FSCM po 10 dniowej inkubacji w temperaturze 28°C. Kolonie są przezroczyste, szare, śluzowate często o nieregularnym kształcie z środkiem od szarego do czarnego. Kształt kolonii jest często nieregularny gdy kolonie powiększają się. Kolonie *Clavibacter michiganensis* subsp. *michiganensis* rosną bardzo powoli i stają się intensywnie szare do prawie czarnych PB (zdjęcie dzięki uprzejmości H. Koenraadt, Naktuinbouw, Holandia).



Ryc. 10 Wygląd kultur sześciu kolonii bakterii *Clavibacter michiganensis* subsp. *michiganensis* pokazujący zróżnicowanie morfologiczne kolonii po 3 dniach inkubacji w temperaturze 28°C na odżywczym podłożu podstawowym YPGA. Kolonie stają się ciemno żółte, opalizujące i połyskliwe w wyniku dłuższej inkubacji (zdjęcie dzięki uprzejmości H. Koenraadt, Naktuinbouw, Holandia).

Procedura B oparta na testach IF, PCR i teście biologicznym.

1. Ekstrakcja z nasion

Nasiona moczyć w temperaturze pokojowej. Zgodnie z Procedurą A zaleca się bezwzględnie włączenie skontaminowanej kontroli pozytywnej w celu ustalenia możliwości inhibicji testów lub pojawienia się efektów współlistnienia czynników toksycznych lub aktywnych biologicznie w ekstrakcie z nasion.

Przygotowanie próbek

Zazwyczaj do badania jednej próbki przygotowuje się pięć podpróbek. Zaleca się przygotowanie dodatkowej podpróbki referencyjnej w celu monitorowania inhibicji. Umieścić każdą podpróbkę, włączając podpróbkę referencyjną w odpowiednim woreczku (np. typu Stomacher lub Bioreba) z wewnętrznym filtrem. Dodać 7,5 ml 0,1 M buforu fosforanowego z dodatkiem soli (PBS; Załącznik 2) na każdy gram nasion. Jako kontrolę negatywną przygotować torebkę z 10 ml PBS. Moczyć nasiona z wytrząsaniem przy szybkości 120-150 rpm przez 3 dni w temperaturze otoczenia (minimum 18°C, maksimum 28°C) w celu namnożenia bakterii *C. michiganensis* subsp. *michiganensis*. Nasiona powinny być całkowicie zanurzone w buforze aby umożliwić ruch w woreczku. Po wytrząsaniu pozwolić nasionom osiąść na dnie. Wirowanie ekstraktu nasion nie jest wymagane ponieważ namnożenie bakterii *C. michiganensis* subsp. *michiganensis* następuje podczas moczenia.

Przygotowanie kontaminowanych kontroli.

W celu identyfikacji możliwych inhibitorów namnażania bakterii *C. michiganensis* subsp. *michiganensis* podczas moczenia zaleca się bezwzględnie włączenie wcześniej przygotowanych kontaminowanych kontroli

przed maceracją nasion. Kontaminowane kontrole przygotowuje się poprzez dodanie komórek bakterii *C. michiganensis* subsp. *michiganensis* szczepu referencyjnego do referencyjnych podpróbek przed wytrząsaniem w takiej ilości aby uzyskać końcową koncentrację 1000-5000 komórek/ml w buforze PBS.

2. Test immunofluorescencji

Instrukcja wykonania testu IF została przedstawiona w Standardzie EPPO PM7/97 „*Pośredni test immunofluorescencji dla bakterii patogenicznych*”. Wymagania specjalne dla testu IF w przypadku badania nasion pomidora na obecność bakterii *C. michiganensis* subsp. *michiganensis* zostały przedstawione w Załączniku 4. Ekstrakt z nasion dla którego otrzymano wynik pozytywny w teście IF wymaga przeprowadzenia dalszych badań z wykorzystaniem testu PCR w celu potwierdzenia pozytywnego wyniku IF. Wykonanie testu PCR jest również zalecane w przypadku negatywnego wyniku testu IF wykonanego przy użyciu dwóch różnych przeciwciał, uzyskanego dla maceratów skontaminowanych próbek nasion (zobacz dane walidacyjne w Załączniku).

3. Test PCR wykonany z wykorzystaniem ekstraktów z nasion, dla których uzyskano pozytywny wynik testu IF (zaadaptowany z Pastrik i Rayney, 1999)

Protokół ten został opracowany w celu potwierdzenia pozytywnych wyników uzyskanych w teście IF. Ekstrakcję DNA z ekstraktu z nasion wykonać przy użyciu zestawu dostępnego w handlu, jak to opisano w Załączniku 5. Ekstrakt z nasion, dla którego uzyskano wyniki pozytywne dla obu testów przesiewowych IF i PCR należy poddać dalszym badaniom w teście biologicznym w celu ułatwienia izolacji patogena.

4. Test biologiczny (wzbogacony) na sadzonkach pomidora

W celu ułatwienia przeprowadzenia izolacji bakterii *C. michiganensis* subsp. *michiganensis* z próbki nasion dla której uzyskano pozytywne wyniki testów przesiewowych IF i PCR, jako podstawę selektywnego wzbogacenia należy użyć sadzonek pomidora. Test biologiczny został zaadaptowany z metody opisanej lecz nie w pełni zwalidowanej przez Van Vaerenbergh i Chauveau (1987) co przedstawiono w Załączniku 6. W przypadku gdy test biologiczny jest pozytywny należy wykonać reizolację oraz identyfikację jak to opisano poniżej.

Inne testy badania nasion

Sugeruje się zastosowanie innych odpowiednich testów w badaniu nasion dla których nie została przeprowadzona systematyczna walidacja:

- Przedstawiono rozdział immunomagnetyczny wykonany po izolacji (De León *et al.* 2006 and 2008).
- Wzbogacony PCR

Wzbogacenie *C. michiganensis* subsp. *michiganensis* z ekstraktu z nasion pomidora w podłożu płynnym lub stałym (pół) selektywnym, a następnie wykrywanie bakterii przy użyciu testu PCR wydaje się być istotne w celu zwiększenia liczby poszukiwanych komórek do poziomu wykrywalności oraz pozwolenie na oddzielenie populacji żywych komórek od komórek martwych i/lub wolnego DNA (Schaad *et al.*, 1999; Ozakman i Schaad, 2003; Vanneste *et al.*, 2008). Wzbogacenie populacji bakterii w ekstrakcie z nasion zostało przeprowadzone na odżywczym podłożu stałym z wyciągu drożdżowego (NBY) oraz podłożu płynnym mSCM broth (Hadas *et al.*, 2005 de León *et al.*, 2008) lecz konieczna jest dalsza optymalizacja i walidacja z wykorzystaniem innych zalecanych podłoży półselektywnych (Załącznik 3) oraz specyficznych testów PCR (Załącznik 7 i 8) w celu ustalenia wiarygodności procedury.

Identyfikacja

Kultura jest zidentyfikowana jako *C. michiganensis* subsp. *michiganensis* jeśli uzyska się pozytywne wyniki w testach odnoszących się do co najmniej dwóch różnych cech patogena (np. połączenie testów biochemicznych, serologicznych lub molekularnych lub testów molekularnych opartych na co najmniej dwóch różnych sekwencjach DNA poszukiwanych w genomie).

W odniesieniu do identyfikacji podejrzanych kolonii po posiewie ekstraktu z nasion zgodnie z procedurą A (opisaną w sekcji wykrywanie), należy zauważyć, że walidacja procedury jest oparta na połączeniu posiewu na podłoże półselektywne i dwóch testów PCR w celu identyfikacji izolatów z koloniami *C. michiganensis* subsp. *michiganensis* o typowej morfologii. Alternatywne metody identyfikacji mogą być zastosowane zgodnie z doświadczeniem laboratorium.

Po uzyskaniu pozytywnych testów identyfikacyjnych należy przeprowadzić potwierdzający infekcyjność *C. michiganensis* subsp. *michiganensis* próbki test patogeniczności.

Testy identyfikacyjne

Poniżej zostały przedstawione testy, które mogą być użyte do identyfikacji (dane walidacyjne są dostępne jeśli to konieczne).

Charakterystyka biochemiczna

Określić zestaw właściwości fenotypowych, które są zawsze obecne lub ich brak w przypadku bakterii *C. michiganensis* subsp. *michiganensis* : Gram pozytywne; słaby metabolizm utleniania glukozy; katalaza pozytywna, oksydaza negatywna; hydroliza eskuliny pozytywna; produkcja kwasu z mannozy w warunkach tlenowych lecz nie z mannitolu; wykorzystanie jako źródło węgla octanu sodu i bursztynianu sodu; wzrost w 6% NaCl; hydroliza skrobi ziemniaczanej; produkcja H₂S z peptonu. Można zastosować metody Dye i Kemp (1977).

Morfologia komórki

Komórki bakterii *C. michiganensis* subsp. *michiganensis* są Gram-pozytywne, nieruchome, nie tworzą przetrwalników, krótkie pałeczki (około 0,4-0,75 x 0,8-2,5 µm), które mogą mieć kształt prosty do lekko zaokrąglonego lub klinowaty. Można również zaobserwować formy kokoidalne. Występują głównie pojedynczo czasem tworzą formy w kształcie litery V, Y lub układy palisadowe. Pierwotne rozgałęzienia nie występują.

Spektrometria masowa MADI/TOF

Identyfikacja bakterii *Clavibacter michiganensis* subspecies jest możliwa dzięki spektrofotometrii masowej (Zaluga *et al.*, 2011). Wszystkie podgatunki *Clavibacter michiganensis* tworzą zróżnicowane i powtarzalne profile MALDI-TOFMS, co umożliwia rzeczywistą identyfikację.

System Biolog

Bakterie *C. michiganensis* subsp. *michiganensis* zostały wyodrębnione z saprofitów zasiedlających nasiona przy użyciu systemu Biolog poprzez charakterystyczny profil biochemiczny wyłącznie na podstawie wykorzystywania źródeł węgla oraz chemicznej czułości próbek jak to zostało opisane przez Kaneshiro *et al.* (2006).

Testy molekularne

Testy PCR. Do identyfikacji zostały zwalidowane dwa rodzaje testu PCR.

1. Klasyczny PCR

Test ten został zaadaptowany i zwalidowany (zgodnie ze Standardem EPPO PM 7/98) przez Pastrik & Rainey, (1999). Protokół dotyczący tego testu został opisany w Załączniku 7.

Porównując różne startery do testu PCR zastosowano startery opisane przez Pastrik i Rainey (PSA-R/PSA-8), które okazały się bardziej specyficzne niż startery wcześniej polecane (CMM5/CMM6 i PSA-4/PSA-R) opisane odpowiednio przez Dreier *et al.*, (1995) i Pastrik i Rainey (1999). Potwierdziło to obserwacje przeprowadzone przez Kaneshiro i Alvarez (2001), Hadas *et.al* (2005) i Luo *et.al* (2008).

2. Real-time PCR

Protokół real-time PCR opracowany i zwalidowany (zgodnie ze standardem EPPO PM 7/98) przez Oosterhof i Berendsen (2011), został opisany w Załączniku 8.

Genomowy „odcisk palca”. *C. michiganensis* subsp. *michiganensis* może być z powodzeniem i niezawodnie identyfikowany na podstawie swojego unikalnego BOX-PCR genomowego „odcisku palca” (zobacz PM 7/100 *Test Rep-PCR dla identyfikacji bakterii*)

Kod paskowy. Porównanie komercyjnie sekwencjonowanych produktów PCR amplifikowanych z wyselekcjonowanych we własnym zakresie genów w chromosomie pozwala na bezbłędne zróżnicowanie podgatunków *C. michiganensis* spośród najbliższych spokrewnionych przy minimalnym koszcie i wysiłku. Na przykład ustalenie izolatu *C. michiganensis* można dokonać na podstawie unikalnej sekwencji 340-350 pz 16S rDNA przy użyciu starterów Edwards *et al.* (1989) i starterów wewnętrznych wg Coenye *et al.*, (1999). Identyfikacja *C. michiganensis* subsp. *michiganensis* następnie dokonana poprzez częściowe sekwencjonowanie około 500 pz genu *gyrB* zamplifikowanego przy użyciu starterów (*gyrB* 2F i *gyrB* 4R) co zostało opisane przez Richert *et al.* (2005), ostatnio rekomendowane przez Żaluga *et al.* (2011). Ogólne procedury dotyczące sekwencjonowania zostały opisane w Standardzie EPP PM/7/XXX *Kod paskowy DNA jako narzędzie do identyfikacji niektórych patogenów roślin podlegających przepisom* (w przygotowaniu).

Testy serologiczne

Test immunofluorescencji. Instrukcja wykonania testu IF została przedstawiona w standardzie EPPO PM 7/97 “*Test immunofluorescencji pośredniej dla bakterii patogenicznych dla roślin*”. Zaleca się stosowanie przeciwciał poliklonalnych firmy Prime Diagnostic (PRI) i firmy LOEWE, które zostały zwalidowane w ramach projektu Clavitom (aby sprawdzić numery serii przeciwciał zobacz Załącznik 4). Przeciwciała poliklonalne IPO 69101 także zostały zwalidowane w Holandii w celu identyfikacji czystych kultur metodą IF.

Szybkie serologiczne testy immunopaskowe. Podejrzane kolonie można szybko zweryfikować za pomocą immunopasków firmy Agdia, które zawierają specyficzne przeciwciała monoklonalne Cmm1 (Kaneshiro *et al.*, 2006). W tym celu należy pojedynczą kolonię zawiesić poprzez worteksowanie w 300 µl buforu do próbek Agdia SEB4. Koniec paska oznaczony „próbka” umieścić pionowo w zawieszynie komórek bakterii. Pasek należy pozostawić tak długo w zawieszynie aż utworzy się linia kontrolna. Linia testowa pojawi się w przypadku gdy zawieszyna będzie zawierała bakterie *C. michiganensis* subsp. *michiganensis*. Specyficzność testu została zweryfikowana w ILVO, Belgia z wykorzystaniem 102 izolatów i szczepów *C. michiganensis* subsp. *michiganensis* różniących się pochodzeniem geograficznym. Wszystkie dały wynik pozytywny w ciągu 2 minut od zanurzenia. Zaobserwowano kilka reakcji krzyżowych z innymi bakteriami pochodzącymi z nasion pomidora lub z gleby. W celu potwierdzenia linia testu może zostać usunięta z paska i użyta do testu PCR.

Analiza kwasów tłuszczowych (FAP)

Wykorzystując Microbial Identification System (MIDI, Newark, US) (Gitaitis & Beaver, 1990) stwierdzono, że profil estrów metyloowych kwasów tłuszczowych (FAMES) *C. michiganensis* subsp. *michiganensis* jest bardzo charakterystyczny. Domniemane izolaty oraz kultura referencyjna *C. michiganensis* subsp. *michiganensis* zostały porównane po 48-godzinnym wzroście w temp. 28°C na podłożu Trypticase Soy Agar (TSA) a następnie poddane ekstrakcji i analizom komórkowych estrów metyloowych kwasów tłuszczowych za pomocą chromatografii gazowej.

Testy patogeniczności

Test na sadzonkach pomidora (zwalidowany zgodnie ze standardem EPPO PM 7/98)

Pojedyncze kolonie domniemanych izolatów *C. michiganensis* subsp. *michiganensis* zawiesić w 100µl sterylnej wody lub 0,01 M PBS (Załącznik 2). Dla każdego izolatu zainokulować pięć sadzonek pomidora odmiany “Moneymaker” w stadium 3-4 rozwiniętych liści poprzez iniekcję łądygi pomiędzy liścienie. Dodatkowo jako kontrolę pozytywną zainokulować rośliny szczepem referencyjnym (Załącznik3). Rośliny utrzymywać w temperaturze 21-30°C i wilgotności względnej 80%. Dzień przed inokulacją nie należy podlewać roślin w celu lepszego przeniknięcia inokulum do rośliny. Przykrycie roślin przez 48 godzin po inokulacji nie jest wymagane w przypadku odpowiednich warunków wilgotnościowych, natomiast jest zalecane w przypadku inkubacji w warunkach niższej wilgotności. Obserwację pod kątem więdnienia prowadzić począwszy od trzeciego dnia po inokulacji. Więdnięcie jest zwykle widoczne 8 dnia od inokulacji, ale obserwację należy kontynuować do 21 dni. We Francji testowano patogeniczność kolekcji składającej się ze 147 izolatów bakterii *C. michiganensis* subsp. *michiganensis* i 11 izolatów nie wykazywało objawów więdnienia po inokulacji, były natomiast obserwowane zrakowacenia tworzące się w miejscach inokulacji spowodowane rozwarstwieniem łądygi (Ryc. 11). Następnie należy dokonać reizolacji bakterii z roślin wykazujących objawy więdnienia lub zrakowacenia poprzez pobranie jedno centymetrowych fragmentów łądygi z odcinka 2-centymetrowego powyżej punktu inokulacji i zawiesić te fragmenty w sterylnym buforze 0,01 MPBS (Załącznik 2). Przeprowadzić następnie posiew redukcyjny na podłoże półselektywne jak to przedstawiono powyżej (dla roślin z objawami).



Ryc. 11 Rak powstający na łądydze w miejscu inokulacji (zdjęcie Geves)

Test na liścieniach (Lelliott i Stead, 1987). Test ten jest dodatkowym testem na roślinach żywicielskich, który można wykorzystać dla potwierdzenia patogeniczności podejrzanych szczepów, które nie powodują więdnienia młodych roślin pomidora. Przygotować zawiesinę pojedynczej kolonii w sterylnym roztworze soli fizjologicznej. Użyć pięciu świeżo skielkowanych sadzonek pomidora z wykształconymi liścieniami. Dodać kroplę zawiesiny na górną powierzchnię każdej sadzonki i wetrzeć w powierzchnię liścieni (np. za pomocą wacika lub palca z użyciem rękawic lateksowych). Niezbędne jest lekkie otarcie skórki, ale jeśli otarcie jest zbyt mocne to wyniki testu będą trudne do zinterpretowania. Doniczkę przykryć za pomocą woreczka polietylenowego w celu utrzymania wysokiej wilgotności i inkubować przez co najmniej 48 godzin. Objawami są białe pęcherze lub dziury na powierzchni liścieni, które można zaobserwować za pomocą szkła powiększającego. Zawsze należy użyć szczepu referencyjnego jako kontroli pozytywnej i roztworu sterylnej soli fizjologicznej jako kontroli negatywnej. Bakterie należy wyizolować i zidentyfikować.

Szczepy referencyjne

NCPPB 2979 (odpowiedniki: LMG 7333, CFBP 2352, ICMP 2550). Zobacz także Załącznik 3.

Sprawozdawczość i dokumentacja

Wskazówki dotyczące sprawozdawczości i dokumentacji są dostępne w Standardzie EPPO PM7/77 (2) *Sprawozdawczość i dokumentacja diagnostyczna*.

Informacje dodatkowe.

Więcej informacji na ten temat można uzyskać od:

J. van Vaerenbergh, ILVO-Department of Crop Protection, Section of bacteriology, Van Gansberghelaan 96, B-9820 Merelbeke (Belgia); E-mail: j.vanvaerenbergh@clo.fgov.be

M. Bergsma-Vlami, Plant Protection Service, PO Box 9102, 6700 HC, Wageningen (Holandia); E-mail: m2.bergsma@minlnv.nl

J Elphinstone, Food and Environment Research Agency Sand Hutton, York (Wielka Brytania); E-mail: john.elphinstone@fera.gsi.gov.uk

E. Stefani, Dept.Universita degli Studi UNIMORE, Via Amendola 2, Reggio Emilia 42122 (Włochy); E-mail: stefani.emilio@unimore.it

V. Olivier. French agency for Food, Environmental and Occupational Health Safety (ANSES) Plant Health Laboratory (Laboratoire de la santé des végétaux, LSV) 7 rue Jean Dixméras Angers Cedex 01(Francja)); E-mail: valerie.olivier@anses.fr

Podziękowania

Protokół ten został pierwotnie przygotowany przez J. van Vaerenbergh, ILVO-DCP Merelbeke (Belgia). Został poddany rewizji na podstawie współpracy stworzonego konsorcjum dotyczącego CMM składającego się z następujących laboratoriów: ILVO-Department of Crop Protection, sekcja bakteriologii, Belgia; Naktuinbouw, Holandia; Plant Protection Service, Holandia; Syngenta Seeds, Holandia; Enza Seeds, Holandia; Nunhems, Holandia; De Ruiters Seeds, Holandia; French Agency for Food, Environmental and Occupational Health Safety (ANSES), Plant Health Laboratory (Laboratoire de la Santé des Végétaux), Francja; GEVES, Beaucauzé, Francja; Vilmorin, Francja CLAUSE, Francja.

Materiały źródłowe

(zachowana wersja oryginalna - przyp. tłum)

Carlson RR & Vidaver AK (1982) Taxonomy of *Corynebacterium* plant pathogens, including a new pathogen of wheat, based on polyacrylamide gel electrophoresis of cellular proteins. *International Journal of Systematic Bacteriology* **32**, 315–326.

Carlton WM, Glaeson ML & Braun EJ (1994) Effects of pruning on tomato plants supporting epiphytic populations of *Clavibacter michiganensis* subsp. *michiganensis*. *Plant Disease* **78**, 742–745.

Carlton WM, Braun EJ & Glaeson ML (1998) Ingress of *Clavibacter michiganensis* subsp. *michiganensis* into tomato leaves through hydathodes. *Phytopathology* **88**, 525–529.

Chang RJ, Ries SM & Pataky JK (1992) Local sources of *Clavibacter michiganensis* subsp. *michiganensis* in the development of bacterial canker on tomatoes. *Phytopathology* **82**, 553–560.

Coenye T, Falsen E, Vancanneyt M, Hoste B, Govan JRW, *et al.* (1999). Classification of *Alcaligenes faecalis*-like isolates from the environment and human clinical samples as *Ralstonia gilardii* sp. nov. *International Journal of Systematic Bacteriology* **49**, 405-13

Davis MJ, Gillaspie AG, Vidaver AK & Harris RW (1984) *Clavibacter*: a new genus containing some phytopathogenic coryneform bacteria, including *Clavibacter xyli* subsp. *xyli* sp. nov., subsp. nov. & *Clavibacter xyli*

subsp. *cynodontis* subsp. nov., pathogens that cause ratoon stunting disease of sugarcane and bermudagrass stunting disease. *International Journal of Systematic Bacteriology* **34**, 107–117.

De León L, Siverio F Rodríguez A, (2006). Detection of *Clavibacter michiganensis* subsp. *michiganensis* in tomato seeds using immunomagnetic separation. *Journal Microbiological Methods* **67**,141-149.

De León L, Rodríguez A, López MM, Siverio F (2008). Evaluation of the efficacy of the immunomagnetic separation for the detection of *Clavibacter michiganensis* subsp. *michiganensis* in tomato seeds. *Journal of Applied Microbiology* **104**,776-786.

De León L, Siverio F, López MM, Rodríguez A (2011). *Clavibacter michiganensis* subsp. *michiganensi*, a seed borne tomato pathogen: healthy seeds are still the goal. *Plant Disease* **95**, 1339.

Dreier J, Bermpohl A & Eichenlaub R (1995) Southern hybridization and PCR for specific detection of phytopathogenic *Clavibacter michiganensis* subsp. *michiganensis*. *Phytopathology* **85**, 462-468.

Dye DW & Kemp WJ (1977) A taxonomic study of plant pathogenic *Corynebacterium* species. *New Zealand Journal of Agricultural Research* **20**, 563 –582.

Eden PA, Schmidt TM, Blakemore RP, Pace NR (1991). Phylogenetic analysis of *Aquaspirillum magnetotacticum* using polymerase chain reaction-amplified 16S rRNA-specific DNA. *International Journal of Systematic Bacteriology* **41**, 324-325.

Edwards U, Rogall T, Blöcker H, Emde M, Böttger EC. (1989). Isolation and direct complete nucleotide determination of entire genes. Characterization of a gene coding for 16S ribosomal RNA. *Nucleic Acids Research* **17**, 7843-53

EPPO/CABI (1997) *Clavibacter michiganensis* subsp. *michiganensis*. *Quarantine Pests for Europe*, 2nd edn, pp. 980–985. CAB International, Wallingford (GB).

EPPO/CABI (1998) Map 253. In: *Distribution Maps of Quarantine Pests for Europe*. CAB International, Wallingford (GB).

EU (2006) Commission Directive 2006/56/CE amending the Annexes to Council Directive 93/85/EEC on the control of potato ring rot. *Official Journal of the European Union* L 182 1-43.

Gitaitis RD & Beaver RW (1990) Characterization of fatty acid methyl ester content of *Clavibacter michiganensis* subsp. *michiganensis*. *Phytopathology* **80**, 318 –321.

Ghedini R & Fiore N (1995) The use of polymerase chain reaction to detect latent infection of *Clavibacter michiganensis* subsp. *michiganensis* in tomato seedlings. *Bulletin OEPP / EPPO Bulletin* **25**, 449-454.

Hadas R, Kritzman G, Klietman F, Gefen T, & Manulis S (2005) Comparison of extraction procedures and determination of the detection threshold for *Clavibacter michiganensis* subsp. *michiganensis* in tomato seeds. *Plant Pathology* **54**, 643-649.

Huang R & Tu JC (2001) Effects of nutrient solution pH on the survival and transmission of *Clavibacter michiganensis* ssp *michiganensis* in hydroponically grown tomatoes. *Plant Pathology* **50**, 503-508

ISF (2011) Methods for the detection of *Clavibacter michiganensis* ssp *michiganensis* on Tomato seeds http://www.worldseed.org/isf/ishi_vegetable.html [last accessed 2012-02-16]

Kaneshiro WS & Alvarez AM (2001) Specificity of PCR and ELISA assays for hypovirulent and avirulent *Clavibacter michiganensis* subsp. *michiganensis*. *Phytopathology* **91**:S46.

Kaneshiro WS, Mizumoto CY, & Alvarez AM (2006) Differentiation of *Clavibacter michiganensis* subsp. *michiganensis* from seed-borne saprophytes using ELISA, Biolog and 16S rDNA sequencing. *European Journal of Plant Pathology* **116**, 45-56.

Kawaguchi A, Tanina K & Inoue K (2010) Molecular typing and spread of *Clavibacter michiganensis* subsp. *michiganensis* in greenhouses in Japan. *Plant Pathology* **59**, 76-83.

Lelliott RA & Stead DE (1987) *Methods for the Diagnosis of Bacterial Diseases of Plants*. Blackwell, Oxford (GB) 216 pp.

Luo LX, Walters C, Bolkan H, Liu XL and Li J Q (2008) Quantification of viable cells of *Clavibacter michiganensis* subsp. *michiganensis* using a DNA binding dye and a real-time PCR assay *Plant Pathology* **57**, 332–337.

Olivier V, Baloché A, Drouin A, Audusseau C, Paillard S & Soubelet H (2010) Internal methods comparison study and inter-laboratory study on *Clavibacter michiganensis* subsp. *michiganensis* in tomato seeds *Bulletin OEPP/EPPO bulletin*, **40**, 248–256

Oosterhof J & Berendsen S (2011). The development of a specific Real-Time TaqMan for the detection of *Clavibacter michiganensis* subsp. *michiganensis* (Abstr.) *Phytopathology* **101**, S133.

Ozakman M & Schaad NW (2003) A real-time BIO-PCR assay for detection of *Ralstonia solanacearum* race 3 / biovar 2 in asymptomatic potato tubers. *Canadian Journal of Plant Pathology* **25**, 232-239.

Pastrik KH & Rainey FA (1999) Identification and differentiation of *Clavibacter michiganensis* subspecies by Polymerase Chain Reaction-based techniques. *Journal of Phytopathology* **147**, 687– 693.

Richert K, Brambilla E, Stackebrandt E. (2005). Development of PCR primers specific for the amplification and direct sequencing of *gyrB* genes from microbacteria, order *Actinomycetales*. *Journal of Microbiological Methods* **60**, 115-23

Schaad NW, Berthier SY, Sechler A (1999) Detection of *Clavibacter michiganensis* subsp. *sepedonicus* in potato tubers by BIO-PCR and automated real-time fluorescence detection system. *Plant Disease* **83**, 1095-1100.

Strider, D.L. (1969) Bacterial canker of tomato caused by *Corynebacterium michiganense*: a literature review and bibliography. *Technical Bulletin North Carolina Agricultural Experiment Station*, No. 193.

Thyr BD, Samuel MJ & Brown PG (1975) New solanaceous host record for *Corynebacterium michiganense*. *Plant Disease Reporter* **59**, 595–598.

Vanneste JL, Yu J, Boyd RJ & Cornish DA (2008) Detection of *Erwinia amylovora* in symptomless apple plants by Bio-PCR and Bio-Duplex PCR. *Acta Horticulturae* **793**, 517-518.

van Vaerenbergh J, Jamart G & Kamoën O (1985) Epidemiology of *Corynebacterium michiganense* in a N.F.T. tomato crop. *Mededelingen van de Faculteit Landbouwwetenschappen, Universiteit Gent*, **50**, 997-1013.

van Vaerenbergh JPC & Chauveau JF (1987) Detection of *Corynebacterium michiganense* in tomato seed lots. *Bulletin OEPP/EPPO Bulletin* **17**, 131–138.

Xu X, Miller SA, Baysal-Gurel F, Gartemann K-H, Eichenlaub R & Rajashekara G (2010) Bioluminescent imaging of *Clavibacter michiganensis* subsp. *michiganensis* infection of tomato seeds and plants. *Applied and Environmental Microbiology* **76**, 3978-3988.

Xu X, Rajashekara G, Paul PA & Miller SA (2012) Colonization of Tomato Seedlings by Bioluminescent *Clavibacter michiganensis* subsp. *michiganensis* Under Different Humidity Regimes. *Phytopathology* **102**, 177-184.

Zaluga J, Heylen K, Van Hoorde K, Hoste B, Van Vaerenbergh J, Maes M & De Vos P (2011) *GyrB* sequence analysis and MALDI-TOF MS as identification tools for plant pathogenic *Clavibacter*. *Systematic and Applied Microbiology* **34** 400– 407

Załącznik 1: Próbkobranie i testy przesiewowe sadzonek pomidora na obecność infekcji utajonej

Obecnie istnieją nie zwalidowane protokoły wykrywania bakterii *C. michiganensis* subsp. *michiganensis* w populacji sadzonek pomidora zainfekowanych w sposób utajony. Ponadto badanie mateczników sadzonek nie jest rutynowo stosowane w zwalczaniu tego patogena, chociażby z powodu dużej liczby roślin, które należy pobrać do badań w celu dostatecznego potwierdzenia wykrycia. Istnieje jedna opublikowana metoda PCR do rutynowego stosowania przesiewu z wykorzystaniem sadzonek pomidora przed posadzeniem (Ghedini i Fiore, 1995). Próbkę składają się z 300 fragmentów łodyg wielkości 1 cm pobrane u podstawy sadzonek. Próg czułości metody został ustalony na około $1,1 \times 10^3$ komórek z 1 na 300 zainfekowanych w sposób utajony łodyg. Procedura badania przedstawiona poniżej oparta jest na procedurze wprowadzonej w

ramach badań IL VO przeprowadzonych w Belgii ale nie wykonano walidacji. Test ma zastosowanie tylko w przypadku szczepionych sadzonek pomidora w mateczniku. Szczepienie może spowodować przeniesienie bakterii *C. michiganensis* subsp. *michiganensis* bezpośrednio do tkanki przewodzącej łodygi, a następnie rozprzestrzenić się systemicznie z miejsca szczepienia zarówno w kierunku systemu korzeniowego jak i zrazu i namnażać do poziomu wykrywalności metody¹¹ (Xu *et al.*, 2010). Podsumowując, opóźnienie w pobraniu próbek do 2 tygodni po szczepieniu może spowodować namnożenie bakterii w zainfekowanych sadzonkach gdy tylko kilka komórek było obecnych początkowo w tkance przewodzącej. Zostało to potwierdzone doświadczalnie poprzez inokulację zrazu Growdena za pomocą 5 µl kropli zawiesiny zawierającej 10³ komórek na ml inokulując 3-tygodniową łodygę sadzonki, a następnie utrzymując sadzonkę w warunkach typowych dla matecznika. Obejmowało to przykrycie roślin w celu zredukowania ilości światła, utrzymywanie wilgotności względnej na poziomie 100% z częściowym zamgławianiem w ciągu dnia i utrzymywanie temperatury w zakresie 21-23°C.

Próbka składa się ze 100 sadzonek i pobierana jest losowo z roślin tej samej odmiany i pochodzących z tej samej partii. Celem jest uzyskanie próbki z partii składającej się z około 20000 roślin. W przypadku gdy próbka złożona pobrana została z partii roślin składającej się z więcej niż jednej odmiany musi składać się z reprezentatywnej ilości sadzonek każdej odmiany zgodnie z ich ilością w partii. Jednakże sadzonki pochodzące z każdej odmiany są zapakowane oddzielnie w celu wykonania oddzielnej analizy. Należy zwrócić uwagę aby nie nastąpiła kontaminacja sadzonek poprzez substrat lub glebę. Ponadto w celu uniknięcia kontaminacji można uciąć sadzonki u podstawy systemu korzeniowego. Każda próbka podlega badaniu i analizowaniu w podpróbkach po 20 roślin jak to opisano poniżej.

Procedura ekstrakcji

Z każdej łodygi pobrać za pomocą skalpela fragmenty łodygi o wielkości kilku mm powyżej miejsca szczepienia. Pomiędzy podpróbkami dezynfekować ostrza skalpeli poprzez zanurzenie w etanolu i opalenie w płomieniu palnika. Pobrane fragmenty roślinne przenieść do torebek ekstrakcyjnych dodać 4 ml 10 mM buforu fosforanowego i zmiażdżyć za pomocą odpowiedniego narzędzia, zmiażdżoną tkankę pozostawić przez 15 do 30 minut w temperaturze otoczenia. Następnie wykonać trzykrotne rozcieńczenia za pomocą 10 mM buforu fosforanowego i każde rozcieńczenie w ilości 50 µl posiać na dwie płytki co najmniej jednego z polecanych półselektywnych podłoży CMM1, FSCM lub SCM (Załącznik 2).

Załącznik 2: Przygotowanie buforów i podłoży

1Bufory

Bufor fosforanowy (PB) do ekstrakcji i rozcieńczeń bakterii z nasion (procedura A)

50 mM PB, pH 7,4	g/l
Na ₂ HPO ₄ x 12H ₂ O	19,57 g
KH ₂ PO ₄	1,65 g
Na ₂ S ₂ O ₃ *	0,5 g
Woda destylowana	1000 ml
Autoklawować 15 min. w temp. 121°C i schłodzić do temperatury pokojowej	
Sterylny Tween 20 (roztwór 10%)	0,2 ml

*Zalecany w przypadku nasion zaprawionych podchlorynem

Bufor fosforanowy z dodatkiem soli (PBS) do ekstrakcji i rozcieńczeń bakterii z roślin wykazujących objawy porażenia i nasion (procedura B)

0,01 M PBS, pH 7,2	g/l
Na ₂ HPO ₄ · 12H ₂ O	2,7 g
NaH ₂ PO ₄ · 2H ₂ O	0,4 g
NaCl	8,0 g
Woda destylowana	1000 ml
Autoklawować 15 min. w temp. 121°C i schłodzić do temperatury pokojowej	

2.Podłoża półselektywne

2.1 CMM1 i FSCM

CMM1

CMM1(CMM1tris100), pH 7,7	g/l
Sacharoza	10,00
Trizma base (Tris base)	3,32
TrisHCl	11,44
MgSO ₄ x 7H ₂ O	0,25
LiCl	5,00
Wyciąg drożdżowy	2,00
NH ₄ Cl	1,00
Kwaśny hydrolizat kazeiny (Casamino acids)	4,00
Agar	15,00
Sprawdzić pH 7,7* i autoklawować w temp. 121°C przez 15 min.	
Po schłodzeniu do około 60°C dodać:	
Polymyxin B sulfate Sigma P4932 (roztwór wyjściowy: 10mg/ml w wodzie destylowanej)	10,00
Nalidixic acid - sodium salt Sigma N4382 (roztwór wyjściowy: 10mg/ml w 0,1M NaOH)	28,00
Nystatin Sigma N6261 (roztwór wyjściowy: 100mg/ml w 50% DMSO/50% etanol)	100,00

*Zbuforowanie właściwości tego podłoża jest punktem krytycznym dla tego podłoża.

Stosunek Trizma base do Tris HCl należy ściśle zachować w celu otrzymania właściwego pH (Bert Woudt, Syngenta Seeds). NB, pH należy zmierzyć ale nie ustalać.

FSCM

FSCM (SCM Fast) pH 7,3	g/l
Agar	18,00
K ₂ HPO ₄	2,00
KH ₂ PO ₄	0,5
MgSO ₄ (bezwodny)	0,122
H ₃ BO ₃	1,50
Wyciąg drożdżowy	2,00
Sacharoza	10,00
Sprawdzić pH 7,3 i autoklawować w temp. 121°C przez 15 min.	

Po schłodzeniu do około 60°C dodać:	mg lub ml/l
Nalidixic acid - sodium salt Sigma N4382 (roztwór wyjściowy: 10mg/ml w 0,1M NaOH)	20,00 mg
Trimethoprim Sigma T7883 (roztwór wyjściowy: 10mg/ml w 100% metanolu)	80,00 mg
100 mg Nicotinic acid*/50 ml sterylnej wody destylowanej	50,00 ml
Nystatin Sigma N6261 (roztwór wyjściowy:100mg/ml w 50% DMSO/50% etanol)	100,00 mg
Telurynian potasu Chapmana (roztwór 1%) Difco**	1,0 ml

*Dodać 100 mg nicotinic acid do 50 ml sterylnej wody destylowanej

**Źródło pochodzenia telurynianu potasu jest punktem krytycznym

2.1.1 Zbadane kryteria dostępne dla CMM1 i FSCM (źródło Naktuinbouw, 2010-02)

2.1.2. Czułość analityczna

Granica wykrywalności została wyznaczona na 25 jednostek tworzących kolonie/ml ekstraktu.

2.1.3. Specyficzność analityczna

Specyficzność została wyznaczona na podstawie przebadania zdolności różnych izolatów bakterii *Clavibacter michiganensis subsp. michiganensis* i znajomości antagonistycznych bakterii rosnących na podłożach FSCM i CMM1. Za wyjątkiem izolatu *Clavibacter michiganensis subsp. michiganensis* numer 60 wszystkie izolaty *Clavibacter michiganensis subsp. michiganensis* wykazały dobry czas wzrostu na podłożach selektywnych (ocenione na 3 lub wyżej).

Dalsze badania izolatu *Clavibacter michiganensis subsp. michiganensis* nr 60 wykazały, że morfologia izolatu była nietypowa, ale wykazywał on zdolność do wzrostu na podłożu (SCM i D2ANX).

2.1.4. Powtarzalność

Wykazano powtarzalność 100%.

2.1.5. Odtwarzalność

W ramach odtwarzalności tylko jedna podpróbka *Clavibacter michiganensis subsp. michiganensis* z niskim poziomem infekcji nie została wykryta. Drugi wniosek dla podłoży półselektywnych dla tej próbki wykazał, że *Clavibacter michiganensis subsp. michiganensis* był obecny lecz prawdopodobnie nie został wykryty ponieważ na podłożu YDC zostały przeszczepione kolonie nie dość podejrzanane. Wynika z tego, że bardzo ważne jest wybranie i przeszczepienie odpowiednich podejrzanych kolonii. W przypadku pozostałych próbek *Clavibacter michiganensis subsp. michiganensis* został wykryty, a odtwarzalność wyniosła 94%.

2.2 SCM

SCM pH 7,3	g/l
Ekstrakt drożdżowy	0,1 g
Sacharoza	10,0 g
H ₃ BO ₃	1,5 g
MgSO ₄ (bezwodny)	0,122 g
K ₂ HPO ₄	2,0 g
KH ₂ PO ₄	0,5 g
Agar	18 g
Sprawdzić pH 7,3 i autoklawować w temp. 121°C przez 15 min.	
Po schłodzeniu do około 60°C dodać:	mg lub ml/l

Nalidixic acid - sodium salt Sigma N4382 (roztwór wyjściowy: 10mg/ml w 0,1M NaOH)	30,00 mg
100 mg Nicotinic acid*/50 ml wody destylowanej	50,00ml
Nystatin Sigma N6261 (roztwór wyjściowy: 100mg/ml w 50% DMSO/50% etanol)	100,00 mg
Telurynian potasu Chapmanae (roztwór 1%) Difco	1,0 ml

*Dodać 100 mg nicotinic acid do 50 ml sterylnej wody destylowanej

**Źródło pochodzenia telurynianu potasu jest punktem krytycznym

3. Podłoże nieselektywne

YPGA (<i>agar drożdżowo-glukozowo-peptonowy</i>)	g/l
Ekstrakt drożdżowy Difco	5 g
Bacto pepton Difco	5 g
D(+) glukoza	10 g
Bacto agar Difco	15 g
Woda destylowana do 1l	
Składniki rozpuścić i sterylizować przez autoklawowanie w temp. 121°C przez 15 min.	

W celu przygotowania skontaminowanych ekstraktów kontrolnych (do wykrywania w próbkach nasion) dodać 50 ppm rifampicyliny po ochłodzeniu do temp. 60°C

Załącznik 3: Rekomendowane szczepy referencyjne *C. michiganensis* subsp. *michiganensis* używane jako kontrole pozytywne

Numer izolatu	Pochodzenie	Wyizolowany z:	Rok izolacji	Wzrost na podłożu
NCPPB 2979*, CFBP 4999*, LMG 7333*, PD223*	Węgry	<i>Solanum lycopersicum</i>	1957	Szybki na FSCM i CMM1 (7-9 dni)
PD520 NCPPB 1468, LMG 3690	UK Channel Islands	<i>Solanum lycopersicum</i>	1962	Szybki na FSCM i CMM1 (7-9 dni)
PD5709 NAK Cmm 96, ZUM 3059, ALV 4000 odporny na rifampicynę	Holandia	<i>Solanum lycopersicum</i>	Dane nie dostępne	Szybki na FSCM i CMM1 (7-9 dni)
CFBP 2496	Algieria	<i>Solanum lycopersicum</i>	1978	Wzrost uzależniony od podłoża (zobacz Ryc. 12)
CFBP 2492	Algieria	<i>Solanum lycopersicum</i>	1985	Wzrost uzależniony od podłoża (zobacz Ryc. 12)

*Szczepy typowe dla gatunku

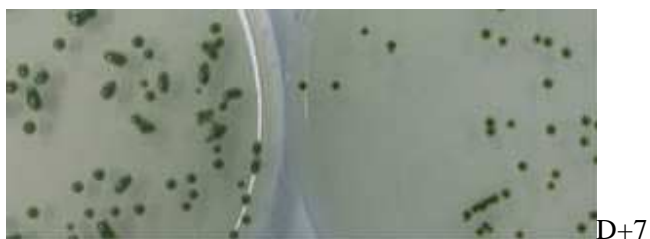
CFBP 2492 na podłożu CMM1T

CFBP 2496 na podłożu CMM1T



CFBP 2492 na podłożu SCMF

CFBP 2496 na podłożu SCMF



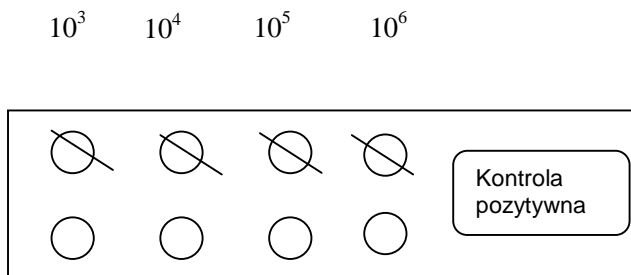
Ryc. 12 Porównanie wzrostu na podłożu CFBP 2492 i CFBP 2496 na dwóch podłożach

Załącznik 4 - Test immunofluorescencji

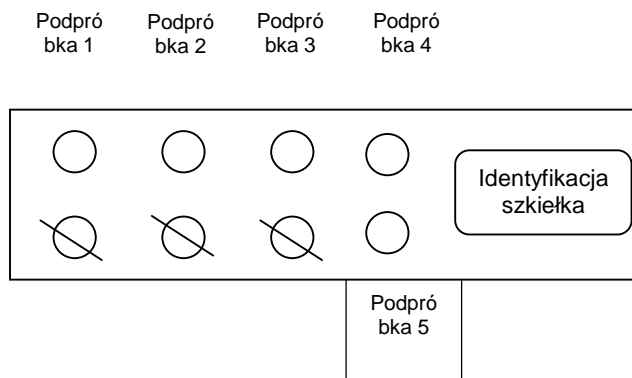
Przed przeprowadzeniem testu należy zapoznać się z ogólnymi zasadami wykonywania testu IF zawartymi w Standardzie EPPO PM/97 „*Test immunofluorescencji pośredniej dla bakterii patogenicznych dla roślin*”. Poniżej zaprezentowano tylko specyficzne cechy. Zawsze należy używać do testu zwalidowanych przeciwciał.

1. Przygotowanie kontroli pozytywnych i negatywnych

Kontrolą pozytywną (Ryc. 13) testu IF jest wielopunktowe szkiełko z naniesionymi dziesięciokrotnymi rozcieńczeniami (10^3 , 10^4 , 10^5 , 10^6 komórek/ml) referencyjnego szczepu *C. michiganensis* subsp. *michiganensis* w buforze PBS (Załącznik 2), wodzie sterylnej lub ekstrakcie z nasion. Zawiesinę bakterii użytą do dziesięciokrotnych rozcieńczeń przygotować z 3-7 dniowej kultury na podłożu YPGA. Szkiełko takie można przygotować wcześniej. Jako kontrolę negatywną użyć bufor PBS używany do moczenia nasion.



Ryc. 13: Szkiełko kontroli pozytywnej



Ryc. 14: Szkiełko próbek

2. Procedura immunofluorescencji

Przygotowanie szkiełek testowych (Ryc. 14)

- Na każde oczko wielopunktowego szkiełka mikroskopowego (o średnicy co najmniej 8 mm) nanieść za pomocą pipety po 40 μ l każdego nierozcieńczonego ekstraktu z nasion oraz kontrole. Wszystkie pięć podpróbek z wyjątkiem skontaminowanej kontroli umieścić na tym samym szkiełku (jedna próbka na jedno szkiełko Ryc. 14). Skontaminowana kontrolę oraz kontrole pozytywne i negatywne umieścić na osobnych szkiełkach.
- Rozcieńczanie ekstraktu z nasion zwykle nie jest wymagane dla tego rodzaju próbek. Jednakże w przypadku zagęszczenia resztek lub sedymentacji należy przygotować drugie szkiełko z rozcieńczonymi ekstraktami próbek w stosunku 1:10.
- Przechowywać ekstrakty nasion w temperaturze 2-6°C na wypadek konieczności powtórzenia badania lub wykonania dalszych analiz. W takich optymalnych warunkach ekstrakt można przechowywać przez 2 tygodnie lub dłużej. Metoda przechowywania ekstraktów opisana w Standardzie PM 7/97 [temp. -68°C pod glicerolem (10-25% obj./obj.)] nie jest polecana w przypadku ekstraktów z nasion pomidora.

- Zaleca się użycie zwalidowanych króliczych przeciwciał poliklonalnych np. firmy Prime Diagnostics, PRI (NL). W celu udowodnienia większej specyficzności zaleca się przed ostatecznym wynikiem bezwzględnie wykonanie powtórnego testu dla pozytywnych ekstraktów z użyciem drugich przeciwciał. Do wykonania powtórnego testu IF zaleca się zastosowanie poliklonalnych przeciwciał kozich firmy Loewe Biochimika (DE).
- W celu zredukowania wybarwionego tła zaleca się użycie Evans blue (rozcieńczenie 1:300 w roztworze koniugatu).

Odczyt testu IF

Instrukcja służąca do odczytu testu IF została przedstawiona w Załączniku I część 4 Standardu PM/97 „*Test immunofluorescencji pośredniej dla bakterii patogenicznych dla roślin*”. W celu dokonania oceny szkiełek w zakresie wybarwienia oraz typowości kształtów komórek bakterii (pamiętać, że bakterie pochodzące ze świeżej kultury są zwykle większe niż te które pochodzą z ekstraktu z nasion) zawsze należy odnieść się do kontroli pozytywnej oraz do „wcześniej skontaminowanej kontroli”. Komórki bakterii *C. michiganensis* subsp. *michiganensis* są małe (1,0 to 0,5 μm), lekko kuliste (coryneform) (Ryc. 15), jasno fluoryzujące, z ciemnym środkiem i powinny mieć całkowicie wybarwione ściany komórkowe. Podzielone komórki mają typowy kształt V (Ryc.16). W przypadku wykrycia komórek o typowej morfologii należy obliczyć koncentrację komórek bakterii w ml ekstraktu z nasion, jak to opisano w Załączniku I, Sekcja 6 Standardu PM/7/97.

Ponieważ mogą wystąpić reakcje krzyżowe z saprofitami towarzyszącymi nasionom pomidora, ekstrakty z nasion, dla których uzyskano pozytywne wyniki testu IF wymagają dalszych badań w celu potwierdzenia pozytywnych wyników IF. W tym celu należy wykonać test PCR ze starterami PSA R/8 (Załącznik 5).

Jeśli wynik skontaminowanej kontroli jest negatywny należy wykonać test PCR (Załącznik 7).

3. Dostępne zbadane kryteria

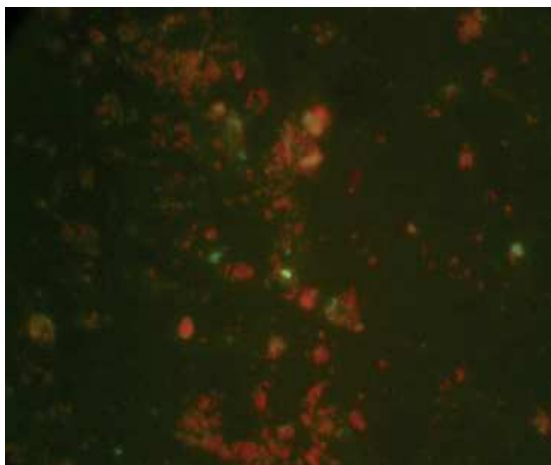
Zbadane kryteria uzyskano w ramach projektu CLAVITOM (Convention C2008-12-Tomate/contrat de Branche 2008-2011).

3.1 Test immunofluorescencji z wykorzystaniem ekstraktów nasion

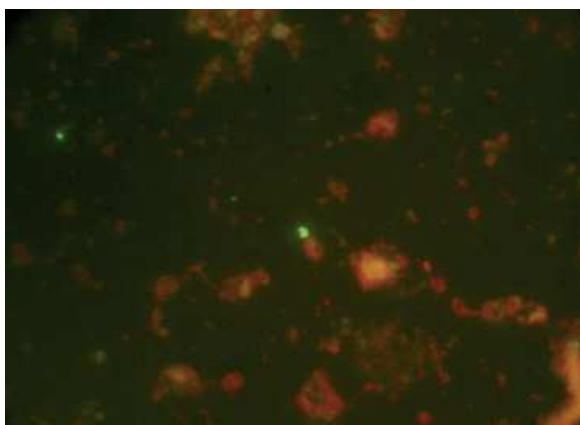
3.1.1 Czułość analityczna

10 do 10^2 jednostek tworzących kolonie./ml; powtarzalność; 90% do 99%; w zależności od partii nasion (Olivier *et al.*, 2010). Czułość diagnostyczna: 88,2% (15 wyników IF pozytywnych na 17 pozytywnych próbek); 10 sztucznie skontaminowanych próbek na wysokim poziomie (10^3 jednostek tworzących kolonie/ml w dniu 0 i 10^5 - 10^6 w dniu +3) i 7 próbek pozytywnych skontaminowanych na niskim poziomie. (103 jednostek tworzących kolonie/ml)

Odniesieniem dla metody było porównanie z próbkami o znanym statusie.



Ryc. 15 Komórki *C. michiganensis* subsp. *michiganensis* (technika IF)



Ryc. 16 Podzielone komórki *C. michiganensis* subsp. *michiganensis* o typowym kształcie litery V (technika IF)

3.1.2. Specyficzność analityczna:

Test IF z zastosowaniem przeciwciał firmy Prime Diagnostic (PRI, Ref 19845.08) a następnie firmy Loewe (Ref Z01/5B-221194): 89,4% (388 wyników pozytywnych testu IF na 434).

Wartość specyficzności:

Przeciwciała (Prime Diagnostic, NL; Loewe, Germany):

- łącznie: 100%
- osobno (Prime Diag. + Loewe): 84,3%.

Liczba przebadanych szczepów *C. michiganensis* subsp. *michiganensis* : 141.

Liczba przebadanych organizmów nie będących docelowymi: 72: 2 patogeny dla pomidora; 12 innych podejrzanych bakterii *C. michiganensis*; 1 *Rathaybacter iranicus*; 57 saprofitów dla nasion pomidora (kilka reakcji krzyżowych z przeciwciałami do testu IF): PRI: 61,5%, a Loewe 57%.

Komplementarne saprofity dla nasion pomidora: 221 dodatkowych izolatów: 28 było pozytywnych (wyłącznie 87,3%). Na 28 wyników pozytywnych dla przeciwciał PRI, 20 wyników pozytywnych było dla przeciwciał Loewe (wyłącznie PRI + Loewe: 91%).

Reakcje krzyżowe obserwowane dla innych podrodzajów *C. michiganensis* i niektórych saprofitów obecnych w nasionach pomidora.

3.1.3. Specyficzność diagnostyczna: 100%

Porównanie z prawdziwym statusem

4 negatywne wyniki testu IF na 4 rzeczywiste próbki negatywne.

Dane dotyczące 4 próbek dezynfekowanych.

3.1.4. Inne kryteria

Dokładność względna: 90,5% (19 wyników zgodnych na 21 przebadanych próbek).

Standardowa metoda referencyjna: Porównanie z próbkami o znanym statusie.

3.2. Test immunofluorescencji na ekstraktach z roślin

3.2.1. Czułość analityczna:

Nie przeprowadzono badań.

3.2.2. Specyficzność analityczna:

Nie przeprowadzono badań.

3.2.3 Czułość diagnostyczna 100%

Dane pochodzące z rutynowych badań roślin przeprowadzonych w 2010 i 2011 roku w laboratorium Plant Health Laboratory (LSV-ANSES, France) na 126 próbkach:

- 60 próbek pozytywnych w teście IF i izolacji (izolacja szczepów)
- Żadna próbka nie była pozytywna w izolacji i negatywna w teście IF

Standardowy test: Posiew na podłoże YPGA i izolacja / identyfikacja izolatów.

3.2.4. Specyficzność diagnostyczna 68,2%

Dane pochodzące z rutynowych badań roślin przeprowadzonych w 2010 i 2011 roku w laboratorium Plant Health Laboratory (LSV-ANSES, France) na 126 próbkach:

- 45 próbek negatywnych w teście IF i izolacji
- 21 próbek pozytywnych w teście IF i negatywnych w izolacji.

Standardowy test: Posiew na podłoże YPGA i izolacja / identyfikacja izolatów.

3.2.5. Inne zbadane kryteria

Dokładność względna: 83,3 % (126 próbek przebadanych testem IF i izolacją).

Załącznik 5: Bezpośredni PCR na ekstraktach z nasion posiadających pozytywny wynik testu IF (zaadaptowany z Pastrik i Rainey, 1999)

1. Informacje ogólne

1.1 Protokół ten został opracowany w celu potwierdzenia wyników pozytywnych testu IF.

1.2 PCR wykonać z użyciem specyficznych dla *C. michiganensis* subsp. *michiganensis* starterów PSA-8 i PSA-R (adaptacja z Pastrik i Rainey, 1999).

PSA-8: 5'-TTG GTC AAT TCT GTC TCC CTT C-3'

PSA-R: 5'-TAC TGA GAT GTT TCA CTT CCC C-3'

1.3 Należy uzyskać amplikon o wielkości 268 pz.

2. Metody

2.1. Jeśli wynik testu PCR jest także pozytywny, przed wykonaniem badania należy przechowywać w temperaturze około 4°C po 5 ml z każdego ekstraktu podpróbki nasion w przypadku którego otrzymano wynik IF pozytywny w celu wykonania testu biologicznego jako potwierdzenia.

Całą objętość ekstraktu z każdej podpróbki z nasion przenieść do próbówki wirówkowej typu Falcon. Wirować 1 minutę przy prędkości 1000g a supernatant przenieść za pomocą pipety. Rozdzielić supernatant do 2 nowych czystych próbek aby uniknąć nasycenia kolumny kitu.

Zgodnie z instrukcją producenta Qiagen DNeasy®Blood oraz Tissue kit dla bakterii Gram pozytywnych wykonać izolację DNA z ekstraktu i kontrolę ekstrakcji DNA.

Wykonać test PCR na ekstraktach DNA nierozcieńczonych i rozcieńczonych. Zaleca się przebadanie rozcieńczeń DNA (1/2 lub 1/5) w celu uniknięcia wyników fałszywie negatywnych spowodowanych inhibicją.

Dodatkowo zaleca się użyć lizozymu w celu dokonania lizy komórek bakterii Gram-pozytywnych.

2.2. Łańcuchowa reakcja polimerazy

2.2.1. Mastermix

Odczynniki	Stężenie robocze	Objętość	Stężenie końcowe
10x Bufor* (Invitrogen)	1x	2	1x
MgCl ₂ (Invitrogen)	50mM	1,2	1,5mM
dNTP's	2 mM	2	200 μM
Starter PSA-8	10 μM/μl	1	0,50 μM
Starter PSA-R	10 μM/μl	1	0,50 μM
Taq Polymerase	5U/μl	0,16	0,8 U
Matryca DNA		4	
Woda o czystości molekularnej		Uzupełnić do 20,00	
Objętość całkowita		20	

*Bufor: Tris- HCl (pH 9,0) 750 mM, (NH₄)₂SO₄ 200mM, Tween 20 0,1% (obj./obj.)

2.2.2. Program PCR: wstępna inkubacja 5 minut w temp. 94°C następnie 35 cykli po 30s w temp. 95°C, 20s w temp. 63°C i 45s w temp. 72°C, następnie końcowa synteza przez 5 minut w temp. 72°C.

Powyższa metoda została zwalidowana z wykorzystaniem polimerazy DNA Platinum z firmy Invitrogen.

3. Niezbędne informacje proceduralne

3.1. Kontrole

W celu uzyskanie wiarygodnych wyników następujące zewnętrzne kontrole należy włączyć do każdej serii ekstrakcji i amplifikacji kwasów nukleinowych odpowiednio poszukiwanego organizmu i poszukiwanych kwasów nukleinowych.

- Negatywna kontrola izolacji (NIC) = bufor do IF

- Pozytywna kontrola izolacji (PIC) = bufor do IF lub woda do biologii molekularnej skontaminowana *C. michiganensis* subsp. *michiganensis* (szczep referencyjny wymieniony w Załączniku 3) powyżej progu wykrywalności.
- Negatywna kontrola amplifikacji (NAC) = woda do biologii molekularnej użyta do mieszaniny PCR.
- Pozytywna kontrola amplifikacji (PAC) = ekstrakt DNA komórek bakterii *C. michiganensis* subsp. *michiganensis* w wodzie do biologii molekularnej powyżej progu wykrywalności.

W przypadku gdy nie wiadomo czy nasiona były zaprawiane należy włączyć kontrolę inhibicji (IC, próbka kontaminowana).

3.2 Interpretacja wyników konwencjonalnego PCR

Weryfikacja kontroli:

- NIC i NAC nie powinny produkować amplikonów.
- PIC, PAC (i jeśli to konieczne IC) powinny produkować amplikony o wielkości 268 pz.
Kiedy warunki te zostają spełnione:
- Test należy uznać za pozytywny, jeśli powstaną amplikony o wielkości 268 pz.
- Test należy uznać za negatywny, jeśli nie powstaną żadne prążki, lub powstaną prążki o innej wielkości.
- Test należy powtórzyć w przypadku otrzymania wyników niejasnych lub wątpliwych.

4. Dostępne przebadane kryteria

- 4.1. Czulość analityczna : w zależności od próbki nasion 10^3 jednostek tworzących kolonie/ml do 10^6 jednostek tworzących kolonie/ml.
- 4.2. Specyficzność analityczna:
Liczba przebadanych szczepów *C. michiganensis* subsp. *michiganensis* 141
Liczba przebadanych organizmów nie będących docelowymi: 72: (2 inne patogeny pomidora; 12 innych bakterii *C. michiganensis* subsp.; 1 *Rathaybacter iranicus*; 57 saprofitów dla nasion pomidora.
- 4.3. Czulość diagnostyczna (w porównaniu do IF)
100% (94,1% pozytywnych wyników dla próbek pozytywnych).
- 4.4. Specyficzność diagnostyczna
83,3 % (100% w porównaniu z rzeczywistym statusem)
- 4.5. Odtwarzalność
93% (na podstawie 10 próbek na granicy wykrywalności w dwóch laboratoriach)
- 4.6. Powtarzalność
95% (na podstawie 10 próbek na granicy wykrywalności w dwóch laboratoriach)

Załącznik 6: Test biologiczny (wzbogacony) na sadzonkach pomidora

Dla każdego ekstraktu z nasion IF+/PCR+ zainokulować 15 do 25 sadzonek pomidora odmiany wrażliwej (np. odmiana Moneymaker lub Marmande) w stadium 2-4 liści właściwych. Jako kontrolę pozytywną zainokulować 5 sadzonek zawiesiną komórek bakterii szczepu referencyjnego *C. michiganensis* subsp. *michiganensis* o gęstości 5×10^3 jednostek tworzących kolonie/ml (koncentrację można zweryfikować przy zastosowaniu testu IF lub rozcieńczeń płytkowych). Jako kontrolę negatywną zainokulować 2 sadzonki buforem PBS.

Zaleca się inokulację łodyg sadzonek tuż powyżej liścieni używając strzykawki z igłą do iniekcji podskórnych. Nie podlewać sadzonek pomidora na 24 do 48 godzin przed inokulacją. Sadzonki inkubować w warunkach kwarantanny w szklarni w temp. 20-30°C i wilgotności 80%. Kontrolować rozwój objawów na kontrolach pozytywnych. Objawy zwykle pojawiają się po 2 tygodniach od inokulacji. Obserwować objawy pojawiające się na sadzonkach zainokulowanych ekstraktem z nasion. Rośliny inkubować do 30 dni.

Wirulencja szczepów *C. michiganensis* subsp. *michiganensis* jest zmienna. Obserwować rośliny pod kątem obecności typowych objawów, np. więdnienia systemicznego, ale również tworzenia się zrakowaceń bakteryjnych bez objawów więdnienia. Wykonać izolację na odpowiednim podłożu (YPGA) i zidentyfikować podejrzane izolaty *C. michiganensis* subsp. *michiganensis* za pomocą kilku szybkich testów. Izolację należy przeprowadzić tak szybko jak tylko pojawią się objawy.

Należy zauważyć, że w pewnych warunkach, szczególnie gdy sadzonki pomidora zostaną zainokulowane niewielką ilością komórek *C. michiganensis* subsp. *michiganensis* lub gdy warunki inkubacji nie są optymalne może wystąpić infekcja utajona. Jeśli w ciągu 30 dni inkubacji nie pojawia się żadne objawy należy pobrać 3 cm fragmenty ponad miejscem inokulacji i wykonać badanie próbki złożonej metodą IF w sposób opisany wcześniej jak dla roślin wykazujących objawy. Można również wykonać izolację na odpowiednim podłożu (YPGA), a izolaty należy zidentyfikować. Wyniki testu biologicznego należy uznać za właściwe jeśli wszystkie kontrole dały prawidłowe wyniki.

- Wynik testu biologicznego należy uznać za negatywny jeśli sadzonki nie wykazują objawów infekcji powodowanej przez *C. michiganensis* subsp. *michiganensis* po 30 dniach i bakterie nie zostały wykryte w teście weryfikacyjnym.
- Wynik testu biologicznego należy uznać za pozytywny jeśli sadzonki wykazują objawy infekcji powodowanej przez *C. michiganensis* subsp. *michiganensis* po 30 dniach i bakterie zostały wyizolowane lub gdy bakterie zostały wyizolowane z roślin nie wykazujących objawów. Bakterie należy wyizolować i zidentyfikować.

Dostępne przebadane kryteria

Na podstawie opisanych procedur badania zostały przeprowadzone we Francji w 2010 r (Anses, Plant Health Laboratory and GEVES-SNES). Zgodnie z Dyrektywą komisji 2006/56/WE zmieniającą Załączniki do Dyrektywy Rady 93/85/EWG w sprawie zwalczania bakteriozy pierścieniowej ziemniaka (EU, 2006) rośliny pomidora zostały zainokulowane maceratami z nasion sztucznie skontaminowanymi tak aby otrzymać ostateczną koncentrację w ilości 6×10^2 do 6×10^6 jednostek tworzących kolonie/ml szczepu 1940 z kolekcji CFBP. Objawy obserwowano na roślinach, które zostały zainokulowane zawiesiną zawierającą co najmniej 600 jednostek tworzących kolonie/ml i bakterie mogły być reizolowane. W takich samych warunkach przeprowadzono test biologiczny na czterech partiach nasion porażonych w sposób naturalny bakteriami *C. michiganensis* subsp. *michiganensis* potwierdzone testem izolacji (procedura 1). Test biologiczny był negatywny dla wszystkich 4 skontaminowanych partii nasion: nie obserwowano żadnych objawów w teście biologicznym jak również nie wyizolowano żadnych kolonii *C. michiganensis* subsp. *michiganensis*. Negatywny wynik testu biologicznego należy interpretować ostrożnie.

W ramach projektu Clavitom został określony minimalny próg wykrywalności, dla testu biologicznego dla ekstraktów, które uzyskały pozytywny wynik testu IF, na poziomie 6×10^2 jednostek

tworzących kolonie/ml (wyniki uzyskane dla ekstraktów z nasion sztucznie skontaminowanych poprzez seryjne rozcieńczenia bakterii *C. michiganensis* subsp. *michiganensis*).

Załącznik 7: Konwencjonalny test PCR do identyfikacji izolatów bakterii *C. michiganensis* subsp. *michiganensis* (według Pastrik i Rayney, 1999).

1. Informacje ogólne

1.1. Pastrik i Rayney (1999) wskazali starter PSA-R i PSA-4 do specyficznej identyfikacji bakterii *C. michiganensis* subsp. *michiganensis*. Starter PSA-R zlokalizowany w genie 23S rRNA jest starterem uniwersalnym przynajmniej w stosunku do bakterii gramdodatnich.

1.2. Specyficzność pary starterów jest zapewniona przez starter przedni PSA-4, zlokalizowany w wewnętrznym transkrybowanym obszarze (ITS) genów 16S i 23S rRNA. Zastąpienie pojedynczego nukleotydu na końcu 3' startera zapewnia specyficzność PSA -4 w porównaniu podrodzajów *C. michiganensis*. Bakterie inne niż *C. michiganensis* subsp. *michiganensis* pochodzące z próbek regularnie dające wyniki pozytywne w reakcji PCR ze starterami PSA -4 i PSA -R. W celu zwiększenia specyficzności przedniego startera PSA -4 zmodyfikowano go poprzez przedłużenie końca 3' dodając 3 zasady i jednocześnie usuwając 3 zasady na końcu 5' (Woudt, Syngenta seed informacje nieopublikowane). Tak zmodyfikowany starter został przedstawiony jako PSA -8 Pastrik i Rainey używając w dokumentach numeracji do PSA -7. Starter PSA -8 w połączeniu z PSA -R nie reaguje z DNA bakterii nie będących docelowymi, które były pozytywne ze starterami PSA -4/PSA -R. Na tej podstawie można wnioskować, że startery PSA -8/PSA -R wykazują większą specyficzność niż startery PSA -4/PSA -R. Wszystkie inne szczegóły związane z tym zmodyfikowanym testem PCR są podobne do opisanych przez Pastrik i Rayney 1999.

1.3. Startery

PSA 8: 5' - TTG GTC AAT TCT GTC TCC CTT C - 3'

PSA-R: 5' - TAC TGA GAT GTT TCA CTT CCC C - 3'

1.4. Startery kontroli wewnętrznej

Bac-1492R: 5'-TAC GGC TAC CTT GTT ACG ACT T-3'

Bac- 8F: 5'-GAA GAG TTT GAT CCT GGC TCA G-3'

1.5. W przypadku użycia starterów PSA-8/PSA-R powstanie ampikon o wielkości 268 pz, a w przypadku starterów Bac-1492R/Bac-8F ampikon o wielkości około 1500 pz.

2. Metody

2.1 Ekstrakcja kwasów nukleinowych

Przygotować zawiesinę komórek z każdego izolatu będącego przypuszczalnie *C. michiganensis* subsp. *michiganensis*. Komórki bakterii poddać lizie przez ogrzewanie np. przez 15 minut w temp. 95°C, a następnie oziębic na lodzie przez 5 minut. Odwirować przez 1 minutę przy prędkości 10000 g i użyć do testu PCR 5 µl supernatantu jako poszukiwanego DNA.

2.2 Łańcuchowa reakcja polimerazy

2.2.1 Mastermix

Odczynniki	Stężenie robocze	Objętość (µl) w 25 µl	Stężenie końcowe
------------	------------------	-----------------------	------------------

10x Bufor* (Invitrogen)	1x	2,5	1x
MgCl ₂ (Invitrogen)	50mM	0,75	1,5mM
dNTP's	2,5 mM	1	100 μM
Starter PSA-8	20 μM/μl	0,5	0,40 μM
Starter PSA-R	20 μM/μl	0,5	0,40 μM
Starter Bac-8F	20 μM/μl	0,5	0,40 μM
Starter Bac-1492R	20 μM/μl	0,5	0,40 μM
Taq Polymerase	5U/μl	0,13	625 x U
Zawiesina bakterii	-	5	-
Woda o czystości molekularnej	-	Uzupełnić do 25,00	-
Objętość całkowita		25	

*10x Buffer : Tris-HCL(pH 9,0) 750 mM, (NH₄)₂SO₄ 200 mM, Tween 20 0,1% (obj./obj.).

2.2.2 Warunki PCR: Wstępna inkubacja 5 min. w temp. 95°C, 35 cykli po 15 s w temp. 95°C, 15 s w temp. 63°C i 45 s w temp. 72°C poprzedzające ostateczną syntezę przez 5 minut w temp. 72°C.

Produkt PCR można wykryć na żelu agarozowym lub urządzeniu do real-time PCR z użyciem barwnika SYBR Green.

3. Niezbędne informacje proceduralne

3.1. Kontrole

W celu uzyskanie wiarygodnych wyników następujące zewnętrzne kontrole należy włączyć do każdej serii ekstrakcji i amplifikacji kwasów nukleinowych odpowiednio poszukiwanego organizmu i poszukiwanych kwasów nukleinowych.

- Negatywna kontrola izolacji (NIC) w celu monitorowania potencjalnej kontaminacji podczas ekstrakcji kwasów nukleinowych, a następnie amplifikacji w sterylnym buforze ekstrakcyjnym.
- Pozytywna kontrola izolacji (PIC) w celu zapewnienia, że kwasy nukleinowe o odpowiedniej ilości i jakości zostały wyizolowane: wykonać ekstrakcję DNA ze szczepu referencyjnego *C. michiganensis* subsp. *michiganensis* np. PD 233 (Załącznik 3).
- Negatywna kontrola amplifikacji (NAC) w celu wykluczenia wyników fałszywie pozytywnych powstałych w trakcie przygotowania mieszaniny reakcyjnej: woda o czystości molekularnej, która została użyta do przygotowania mieszaniny reakcyjnej.
- Pozytywna kontrola amplifikacji (PAC) w celu monitorowania skuteczności amplifikacji: dodać do reakcji PCR kwasy nukleinowe szczepu referencyjnego *C. michiganensis* subsp. *michiganensis* np. PD 233 (Załącznik 3).

Wewnętrzne kontrole pozytywne (IPC) są stosowane z każdą próbkę w celu zapewnienia prawidłowej ekstrakcji DNA i amplifikacji PCR. Może dojść do wspólnej amplifikacji endogennych kwasów nukleinowych następującej wówczas gdy startery spowodują amplifikację kwasów nukleinowych

innych organizmów niż poszukiwany, które są również obecne w próbce (np. bakteryjne 16S r DNA). Z tego powodu zastosowane zostały uniwersalne startery bakteryjne aby otrzymać produkt o wielkości około 1500pz (zaadaptowane od Eden *et al.*1991).

3.2. Interpretacja wyników konwencjonalnego PCR

Weryfikacja kontroli:

- NIC i NAC nie powinny produkować amplikonów
- PIC i PAC powinny produkować amplikony o wielkości 268 pz.
- IPC powinna produkować amplikon o wielkości około 1500 pz.

Kiedy te warunki są spełnione:

- Test należy uznać za pozytywny jeśli powstaną amplikony o wielkości 268 pz.
- Test należy uznać za negatywny jeśli jeśli nie powstaną żadne prążki lub prążki o innej wielkości.
- Test należy powtórzyć jeśli uzyskane wyniki są sprzeczne lub niejasne (jeśli zarówno IPC jak i organizm docelowy nie dają sygnału, nie należy wyciągać wniosków lecz należy powtórzyć test PCR).

4. Dostępne przebadane kryteria

Test PCR do identyfikacji *C. michiganensis* subsp. *michiganensis* został zwalidowany zgodnie ze Standardem EPPO PM 7/98, zarówno dla konwencjonalnego PCR jak i z użyciem barwnika SYBR Green.

4.1. Dane dotyczące czułości analitycznej

Granica wykrywalności (LOD) wynosi 5×10^3 jednostek tworzących kolonie/reakcję, obliczenia oparto na średniej LOD z 5 izolatów bakterii *C. michiganensis* subsp. *michiganensis* + 3x odchylenie standardowe.

Dane te pochodziły z badań czystych kultur.

4.2. Dane dotyczące specyficzności analitycznej

Ogółem do wykazania specyficzności testu real-time PCR użyto 67 szczepów *C. michiganensis* subsp. *michiganensis* oraz innych blisko spokrewnionych bakterii (innych rodzajów *C. michiganensis* i podobnych). W szczególności:

- 41 różnych izolatów *C. michiganensis* subsp. *michiganensis* o różnym pochodzeniu geograficznym, które dały pozytywne wyniki testu patogeniczności na roślinach pomidora.
- 22 różne bakterie podobne do *C. michiganensis*, które dały negatywne wyniki testu patogeniczności na roślinach pomidora
- 4 różne izolaty *C. michiganensis* pochodzące z różnych roślin żywicielskich :*Clavibacter michiganensis* subsp. *insidiosus*, *Clavibacter michiganensis* subsp. *tessellarius*, *Clavibacter michiganensis* subsp. *nebraskensis* i *Clavibacter michiganensis* subsp. *sepedonicus*.

Dla izolatów *C. michiganensis* subsp. *michiganensis* uzyskano 100% wyników pozytywnych i nie otrzymano żadnego wyniku fałszywie negatywnego. Dla izolatów nie będących *C. michiganensis* subsp. *michiganensis* 1 dał wynik fałszywie pozytywny.

4.3. Dane dotyczące odtwarzalności i powtarzalności

Powtarzalność i odtwarzalność dla konwencjonalnego PCR wyniosła 100%. Wszystkie 4 przebadane izolaty *C. michiganensis* subsp. *michiganensis* i 4 izolaty podobne do *C. michiganensis* subsp. *michiganensis* dały oczekiwane wyniki.

Załącznik8: test Real-time PCR (Oosterhof i Berendsen, 2011)

1. Informacje ogólne

- 1.1 Test real-time PCR został oparty na przypuszczalnej kinezie sensorycznej systemu dwóch komponentów (PTSSK) przy użyciu danych sekwencyjnych ze szczepu *C. michiganensis* subsp.*michiganensis* pochodzącego z kolekcji NCPPB 382.
- 1.2 Lokalizacja specyficznego produktu (pierwsza para zasad, włączając sekwencję starterów) została określona od 22792142 do 2792274.
- 1.3 Test PCR należy przeprowadzić ze starterami RZ_ptssk 10/RZ_ptssk 11 i sondą RZ_ptssk 12 (Applied Biosystems).
Przedni RZ_ptssk 10: 5'-GGGGCCGAAGGTGCTGGTG-3'
Tylny RZ_ptssk 11: 5'-CGTCGCCCGCCCGCTG-3'
Sonda RZ_ptssk 12: 6FAM-TGGTCGTCCTCGGCG-MGBNFQ
- 1.4 Startery kontroli wewnętrznych
CMT-F5'- GGG CCG CAC CTT CG -3'
CMT-R5'-CGT TTC GCC TCC CCT AGA -3'
CMT-Sonda Texas red - TCG TCC CTG AGT GGA TGG TGG TG – BHQ2
- 1.5 Wielkość amplikonu wyrażona w parach zasad (włączając sekwencję starterów) wynosi 132 pz.
- 1.6 Źródłem kwasów nukleinowych są czyste kultury.
- 1.7 Urządzenie Real-time PCR wykorzystane do walidacji to: CFX96 Real Time System (Bio Rad).

2. Metoda

- 2.1 Ekstrakcja kwasów nukleinowych
Przygotować zawiesinę komórek z każdego domniemanego izolatu *C. michiganensis* subsp.*michiganensis*. Wykonać lizę komórek bakteryjnych poprzez ogrzewanie przez 15 minut w temp. 95°C. Alkaliczacja lub zadziaływanie wodorotlenkiem sodowym może polepszyć lizę i oziębic na lodzie. Wirować przez 1 minutę z prędkością 10000 g i użyć 2 µl supernatantu do testu real-time PCR.
- 2.2 Łańcuchowa reakcja polimerazy
- 2.2.1 Master mix

Odczynniki	Stężenie robocze	Objętość w µl	Stężenie końcowe
TaqMan master mix (Applied Biosystems)	2x	12,5	1x
RZ_ptssk10	20 µM	0,3	0,24µM
RZ_ptssk 11	20 µM	0,3	0,24µM
RZ_ptssk 12	20 µM	0,3	0,24µM
Zawiesina bakterii	-	2	-
Woda o czystości molekularnej	-	Uzupełnić do 25,0	-
Razem	-	25	-

2.2.2 Warunki reakcji PCR: inkubacja w temp. 95°C przez 10 min., następnie 40 cykli w temp. 95°C przez 15 sekund i 60°C przez 30 sekund. Szybkość wzrostu powinna wynosić 5°C/s.

3. Niezbędne informacje proceduralne

3.1 Kontrole

W celu uzyskania wiarygodnych wyników następujące (zewnętrzne) kontrole należy włączyć do każdej serii ekstrakcji i amplifikacji kwasów nukleinowych odpowiednio poszukiwanego organizmu i poszukiwanych kwasów nukleinowych.

- Negatywna kontrola izolacji (NIC) w celu monitorowania potencjalnej kontaminacji podczas ekstrakcji kwasów nukleinowych, a następnie amplifikacji w sterylnym buforze ekstrakcyjnym.
- Pozytywna kontrola izolacji (PIC) w celu zapewnienia, że kwasy nukleinowe o odpowiedniej ilości i jakości zostały wyizolowane: wykonać ekstrakcję DNA ze szczepu referencyjnego *C. michiganensis* subsp. *michiganensis* np. PD 233 (Załącznik 3).
- Negatywna kontrola amplifikacji (NAC) w celu wykluczenia wyników fałszywie pozytywnych powstałych z powodu kontaminacji w trakcie przygotowania mieszaniny reakcyjnej: woda o czystości molekularnej, która została użyta do przygotowania mieszaniny reakcyjnej.
- Pozytywna kontrola amplifikacji (PAC) w celu monitorowania skuteczności amplifikacji: dodać do reakcji PCR kwasy nukleinowe szczepu referencyjnego *C. michiganensis* subsp. *michiganensis* np. PD 233 (Załącznik 3).

Wewnętrzne kontrole pozytywne (IPC) używane są w przypadku każdej próbki w celu zapewnienia prawidłowej ekstrakcji DNA i amplifikacji PCR. Zaleca się wykonanie amplifikacji próbki skontaminowanej egzogennym kwasem nukleinowym nie będącym *C. michiganensis* subsp. *michiganensis*. Zawiesina bakteryjna *C. michiganensis* subsp. *michiganensis* powinna być skontaminowana pokrewną bakterią i także poddana badaniu ze starterami dla tej bakterii. Pokrewna bakteria powinna być dodana w stężeniu 100x mniejszym aby uniknąć rywalizacji z organizmem poszukiwanym. Na przykład można użyć bakterii *Clavibacter michiganensis* subsp. *tessellarius*, łącznie ze starterami Cmt.

3.2 Interpretacja wyników testu real-time PCR

Wartość cyklu w punkcie przecięcia wynosi 35 i można ją uzyskać przy użyciu wyposażenia/materiałów i odczynników przedstawionych w niniejszym Załączniku. Jeśli to konieczne należy określić wartość Ct w punkcie przecięcia dla wymaganych kontroli. W przypadku, gdy test ten zostanie zastosowany po raz pierwszy należy wartość w punkcie przecięcia zweryfikować w każdym laboratorium.

Weryfikacja kontroli:

- Krzywe amplifikacji PIC i PAC muszą być wykładnicze
- NIC i NAC muszą być negatywne (Ct > niż punkt przecięcia)
- PIC, PAC muszą mieć wartość Ct poniżej 30
- IPC musi mieć wartość Ct poniżej oczekiwanej wartości dla wybranych spokrewnionych bakterii.

Kiedy warunki te zostaną spełnione:

- Test należy uznać za pozytywny jeśli krzywa amplifikacji jest wykładnicza, a wartość Ct jest poniżej punktu przecięcia
- Test należy uznać za negatywny jeśli krzywa amplifikacji nie jest wykładnicza, a wartość Ct jest równa lub ma wartość powyżej punktu przecięcia
- Test należy powtórzyć jeśli otrzymano wyniki sprzeczne lub nie jasne (jeśli zarówno kontrola jak i specyficzny cel nie dają sygnału nie należy wyciągać wniosków i należy powtórzyć test PCR).

4. Dostępne przebadane kryteria

Test real-time PCR do identyfikacji *C. michiganensis* subsp. *michiganensis* został zwalidowany zgodnie Standardem EPPO PM 7/98.

4.1 Dane dotyczące czułości analitycznej

Granica wykrywalności (LOD) wynosi 2×10^3 jednostek tworzących kolonie/ml, obliczenia oparto na średniej LOD z 5 izolatów bakterii *C. michiganensis* subsp. *michiganensis* + 3x odchylenie standardowe. Dane te pochodziły z badań czystych kultur.

4.2 Dane dotyczące specyficzności

Ogółem do wykazania specyficzności testu real-time PCR użyto 67 szczepów *C. michiganensis* subsp. *michiganensis* oraz innych blisko spokrewnionych bakterii (innych rodzajów *C. michiganensis* i podobnych). W szczególności:

- 41 różnych izolatów *C. michiganensis* subsp. *michiganensis* o różnym pochodzeniu geograficznym, które dały pozytywne wyniki w teście patogeniczności na pomidorze.
- 22 różne izolaty bakterii podobne do *C. michiganensis*, które dały negatywne wyniki w teście patogeniczności na pomidorze.
- 4 różne izolaty *C. michiganensis* pochodzące z różnych roślin żywicielskich :*Clavibacter michiganensis* subsp. *insidiosus*, *Clavibacter michiganensis* subsp. *tessellarius*, *Clavibacter michiganensis* subsp. *nebraskensis* i *Clavibacter michiganensis* subsp. *sepedonicus*.

Połączenie starter-sonda dały wyniki pozytywne dla wszystkich izolatów bakterii *C. michiganensis* subsp. *michiganensis*. Nie wykazano wyników fałszywie pozytywnych dla żadnego z badanych izolatów *C. michiganensis* subsp. *michiganensis*. Metoda wykazuje dużą specyficzność.

4.3 Powtarzalność i odtwarzalność dla real-time PCR jest optymalna. Wszystkie 4 przebadane izolaty *C. michiganensis* subsp. *michiganensis* i 4 izolaty podobne do *C. michiganensis* subsp. *michiganensis* dały oczekiwane wyniki. Wartości Ct dla *C. michiganensis* subsp. *michiganensis* wahały się pomiędzy 20,18 a 22,78.