

**Diagnostyka<sup>1</sup>**  
**Diagnostic**

***Pantoea stewartii* subsp. *stewartii***

**Zakres**

Standard opisuje protokół diagnostyczny dla *Pantoea stewartii* subsp. *stewartii*.

**Zatwierdzenie**

Zatwierdzony w 2005-09.

**Wprowadzenie**

*Pantoea stewartii* subsp. *stewartii* jest gatunkiem rodzimym dla Ameryki, do innych części świata wprowadzona została z nasionami kukurydzy. Główną rośliną żywicielską jest kukurydza, szczególnie kukurydza cukrowa, ale również odmiany koński ząb, kukurydza twarda, mączysta i kukurydza pękająca. W Ameryce jedynym skutecznym znanym wektorem i miejscem przeżywania zimy przez bakterie jest *Chaetocnema pulicaria*. Porażenie bezobjawowe kukurydzy przez *Pantoea stewartii* subsp. *stewartii* nie jest znane. Dodatkowe informacje na temat biologii, rozprzestrzenienia i znaczenia ekonomicznego choroby dostarczane są przez EPPO/CABI (1997,1998).

**Tożsamość**

**Nazwa:** *Pantoea stewartii* subsp. *stewartii* (Smith, 1898) Mergaert et al. (1993).

**Synonimy:** *Erwinia stewartii* (Smith, 1898) Dye 1963; *Xanthomonas stewartii* (Smith, 1898) Dowson 1939.

**Pozycja taksonomiczna:** Bacteria; Gracilicutes; Enterobacteriaceae.

**Kod EPPO:** ERWIST.

**Kategoria fitosanitarna:** EPPO lista A2 poz. 54; UE Załącznik II/A1.

**Wykrywanie**

**Objawy chorobowe**

Bakteria może zostać znaleziona na nasionach kukurydzy. Na nasionach brak jest widocznych objawów chorobowych. Pierwsza faza, faza wędnięcia, tej bakteryjnej choroby może zaatakować rośliny w stadium siewki.

Choroba rozprzestrzenia się systematycznie systemem naczyniowym. W przypadku późnej

---

<sup>1</sup> Ryciny w niniejszym standardzie oznaczone „Web Fig.” zostały opublikowane na stronie internetowej EPPO [www.eppo.org](http://www.eppo.org).

infekcji, rośliny mogą osiągać odpowiedni rozmiar. Liście stają się jasnozielone do żółtych, podłużnie smugowate, z nieregularnymi lub pofałdowanymi brzegami, które są równoległe do żył i mogą powiększać się wzdłuż blaszki liściowej. Tkanki w obrębie tych smug wysychają i stają się brunatne. Małe nasiąknięte wodą plamy mogą rozszerzać się na łupinę kolb kukurydzy. Ostatecznie bakterie mogą wydzielać kropelki śluzowatego wycieku na wewnętrznej powierzchni łuski. Rośliny, które nie zginą mogą wytwarzać zbielełe martwe kwiatostany. W przypadku silnego porażenia, w rdzeniu dolnej części łodygi, przy powierzchni gleby mogą powstawać zagłębienia. *P. s. stewartii* wnika głęboko do nasion, lecz nie zasiedla zarodka. Kukurydza (cukrowa) jest szczególnie wrażliwa na tę fazę choroby.

Odmiany polowe są bardziej wrażliwe w drugiej fazie, więdnienie liści, zwykle bardziej widoczne po kwitnieniu. Krótkie do długich, nieregularne, opalizująco-zielone do żółtych smugi, które pochodzą ze znaków żerowania na kukurydzy pchełki rzepakowej (*Chaetocnema pulicaria*), występują wzdłuż unerwienia liścia. Całe liście czasami przyjmują barwę słomkową i zamierają. Osłabione rośliny są bardziej wrażliwe na grzybową zgniliznę łodygi.

Chorobę można pomylić z innymi rodzajami więdnienia liści:

- więdnienie Gross'a (*Clavibacter michiganensis* subsp. *nebraskensis*), które może być bardzo podobne do więdnienia Stewart'a
- bakteryjna plamistość liści, *Acidovorax avenae* subsp. *avenae*, z długimi, wąskimi paskami lub plamami z czerwono-brązowymi brzegami. Liście są lekko postrzępione, a w górnej części łodygi może wystąpić zgnilizna.
- bakteryjna paskowatość, *Burkholderia andropogonis*, z długimi, wąskimi, równoległymi, oliwkowo-zielonymi do żółtych, nasiąkniętymi wodą zmianami chorobowymi. Górna powierzchnia liści może być niemal biała.
- północna plamistość liści kukurydzy, *Setosphaeria turcica*, z dużymi, wrzecionowatymi, szaro-zielonymi do brązowych plamami
- południowa plamistość liści kukurydzy, *Cochliobolus heterostrophus*, i *Cochliobolus carbonum*, z dobrze określonymi brązowymi do brunatnych plamami.

### **Próbkobranie**

Do badania laboratoryjnego z poddawanego lustracji obszaru (poła) pobiera się 5 –10 liści, kolb, kwiatostanów, łodyg z typowymi objawami choroby. W przypadku partii nasion, do badania potrzebne jest 400 sztuk nasion z partii.

### **Ekstrakcja bakterii z próbek roślinnych**

Części roślin (liście, łupina, kwiatostan) wykazujące objawy chorobowe wycięte w pobliżu uszkodzeń maceruje się w plastikowym woreczku z użyciem homogenizatora ręcznego (lub w moździerz z tłuczkiem) z kilkoma mililitrami sterylnej wody destylowanej lub rozdrabnia w sterylnej szalce Petriego ze sterylną wodą lub sterylnym buforem fosforanowym. Właściwa zawiesina płynnego maceratu przenoszona jest do próbki wirówkowej do barwienia techniką immunofluorescencji.

Pozostały płynny macerat jest zbierany w sterylnej próbce Wassermanna lub w jednorazowej plastikowej próbce w celu przyszłej izolacji i przechowywany w temperaturze +4°C lub na lodzie. Maceraty powinny być przygotowywane tak szybko jak to możliwe (bezpośrednio jeżeli przechowywane są w temperaturze pokojowej i w ciągu jednego dnia jeżeli przechowywane są w temperaturze 4°C). Aczkolwiek, nie jest to zalecane, maceraty mogą być przechowywane dłużej w temperaturze poniżej- 18°C.

## **Ekstrakcja bakterii z nasion**

Próbka dzielona jest na podpróbki do 100 sztuk nasion każda i umieszczana w plastikowym woreczku. Nasiona zaprawione jakimkolwiek środkiem ochrony roślin w celu usunięcia tego środka z powierzchni nasion powinny być płukane pod bieżącą wodą, do czasu aż spływająca woda będzie przezroczysta (w takich przypadkach, sprawozdanie powinien zawierać informację że nasiona były zaprawiane). Sterylna woda destylowana (technika IF) lub bufor ekstrakcyjny (test ELISA), w ilości równej 2 x ciężar nasion jest dodawany do każdej podpróbki, po czym woreczek jest zamykany. Podpróbki są inkubowane w lodówce w temperaturze +4°C przez noc. Po inkubacji, moczone nasiona są wytrząsane na wstrząsarce obrotowej w temperaturze pokojowej przez 10 –15 minut przy zastosowaniu 200 obrotów na minutę lub poddawane obróbce w homogenizatorze laboratoryjnym typu Stomacher przez 2 minuty przy zastosowaniu maksymalnej szybkości. Właściwe objętości moczonej zawiesiny są przenoszone do probówek wirówkowych do barwienia immunofluorescencyjnego. Pozostały płynny macerat jest zbierany w sterylnej probówce Wassermanna lub w jednorazowej plastikowej probówce w celu badania testem ELISA i/lub do przyszłej izolacji, i przechowywany w temperaturze +4°C lub na lodzie. Maceraty powinny być przygotowywane tak szybko jak to możliwe (bezpośrednio jeżeli przechowywane są w temperaturze pokojowej i w ciągu jednego dnia jeżeli przechowywane są w temperaturze 4°C). Aczkolwiek, nie jest to zalecane, maceraty mogą być przechowywane dłużej w temperaturze poniżej- 18°C.

W przypadku próbek wykazujących objawy chorobowe, najlepszą metodą jest bezpośrednia izolacja i powinna być wykonana bezpośrednio po maceracji.

## **Barwienie immunofluorescencyjne**

Płynna zawiesina uzyskana przez moczenie nasion przeznaczona do barwienia immunofluorescencyjnego jest wirowana z przyspieszeniem 10 000 g przez 10 minut. Osad jest zawieszany w 1/10 objętości oryginalnej objętości sterylnej wody destylowanej. Zagęszczona zawiesina, i jej dziesięciokrotne i stukrotne rozcieńczenia są wykorzystywane do pośredniego barwienia immunofluorescencyjnego (z użyciem specyficznych poliklonalnych przeciwciał). Dla procedury IF patrz: OEPP/EPP (2004).

## **Test ELISA**

Płynna zawiesina uzyskana przez moczenie nasion jest badana testem ELISA z wykorzystaniem zestawu firmy AGDIA (zgodnie z instrukcją producenta).

## **Izolacja bakterii metodą rozcieńczeń płytkowych**

Z uwagi na to, że liczba żywych komórek w maceracie szybko zmniejsza się, izolacja powinna być przeprowadzona niezwłocznie. Zawiesiny (przechowywane na lodzie) z IF-dodatnich podpróbek, są rozcieńczane seryjnie 10-krotnie do 1 : 10 000 w roztworze sterylnej soli fizjologicznej. 100 µl każdego rozcieńczenia jest rozprowadzane na powierzchni podłoża agarowego King B z dodatkiem 200 mg/l nystatyny (lub 200 mg/ l cykloheksymidu), przy użyciu L- kształtnej szklanej pałeczki. Podłoże NBY lub YPGA może być również użyte. Płytki inkubowane są w temperaturze 25 –27°C, i przeglądane po 2–3 dniach na obecność koloni *P. s. stewartii*. W celu dalszych badań, 5 –7 koloni o typowej morfologii jest przeszczepiane na słupki lub płytki z podłożem King B. Kolonie są cytrynowe do pomarańczowożółtych lub jasno żółte, płaskie do wypukłych, przezroczyste, całobrzegie, wolno lub średnio rosnące. Komórki to Gram – ujemne, proste, krótkie pałeczki (0.4– 0.7 x 0.9 –1.7 µm).

## Identyfikacja

Izolaty inkubowane na słupkach z podłożem King B są sprawdzane pod kątem ruchliwości, reakcji Grama, testu nadwrażliwości na tytoniu i oksydazy. Nie ruchliwe, Gram ujemne, HR i oksydazo ujemne izolaty są następnie badane przez aglutynację, test ELISA, test IF i bezpośrednio sprawdzane w testach potwierdzających wymienionych poniżej. Testy serologiczne mogą być przeprowadzane na podejrzanych izolatach bez wcześniejszego sprawdzania ruchliwości, barwienia Grama, HR i reakcji oksydazy.

Wstępna identyfikacja izolatów na podstawie wyników testów wymienionych powyżej powinna zostać potwierdzona przez co najmniej dwie z następujących wymienionych metod opartych o różne zasady biologiczne: testy biochemiczne (testy wymienione w Tabeli 1), BIOLOG, test PCR, PFGE profil, profil kwasów tłuszczowych i ostatecznie przez test patogeniczności.

### Test aglutynacji szkiełkowej

Poliklonalne przeciwciała przeciwko *P. s. stewartii* są rozcieńczane zgodnie z mianem uzyskanym dla danej partii surowicy. 50 µl rozcieńczonych przeciwciał jest наносzone na szkiełko do aglutynacji. Oczko ezy bakterii pochodzących z 24 godzinnego izolatu jest dokładnie mieszane z kroplą rozcieńczonych przeciwciał. Wynik, tworzenie precypitatu, jest oceniany po 10 minutach.

### Test ELISA

Test ELISA z wyselekcjonowanych koloni może być przeprowadzany z wykorzystaniem zestawu firmy Agdia (zgodnie z instrukcją producenta).

### Test BIOLOG

Test ten jest wykonywany zgodnie z instrukcją producenta.

Tabela 1 Morfologiczne i biochemiczne testy do identyfikacji *Pantoea stewartii* subsp. *stewartii* i odróżniania od podobnych gatunków

Testy	<i>Pantoea stewartii</i> subsp. <i>stewartii</i>	<i>Pantoea stewartii</i> subsp. <i>indologenes</i>	<i>Pantoea agglomerans</i>
Ruchliwość	nie ruchliwe	ruchliwe (lub nie ruchliwe)	ruchliwe
Wytwarzanie acetoiny	ujemny	dodatni	dodatni
Wytwarzanie indolu	ujemny	dodatni	dodatni
Redukcja azotanów	ujemny	dodatni	dodatni
Hydrolyza eskuliny	ujemny	dodatni	dodatni
Wzrost z cis-akonitatem	ujemny	dodatni	dodatni
Wytwarzanie kwasu z :			
maltozy	ujemny	dodatni	dodatni
arbutyny	ujemny	dodatni	dodatni
salicyny	ujemny	dodatni	dodatni
rafinozy	dodatni	dodatni	dodatni
Wykorzystywanie malonianu	ujemny	dodatni	dodatni
Barwienie Grama	ujemny	dodatni	dodatni
Oksydaza cytochromowa	ujemny	dodatni	dodatni

## Test PCR

Test ten przeprowadzany jest zgodnie z protokołem Coplin & Majerczak (2002). Startery zaprojektowane zostały w odniesieniu do regionu 16S-23S rRNA/ITS, starter przedni ES16: 5'-GCG AAC TTG GCA GAG AT-3', starter tylny ESIG2c: 5'-GCG CTT GCG TGT TAT GAG-3'. Kolonia z podejrzanej kultury zawieszana jest w probówce w 100 µl sterylnego 50 mM buforu fosforanowego (pH 7.0). Zamknięta probówka ogrzewana jest w temperaturze 95°C przez 10 minut a zawiesina oziębiana jest na lodzie.

Liza alkaliczna może być wykorzystywana do polepszenia izolacji DNA z komórek bakterii (próbka o objętości 100 µl jest poddawana działaniu 50 µl 0.25 N NaOH, ogrzewana przez 10 minut w temperaturze 95°C, umieszczana na lodzie na 2 minuty, poddawana działaniu 50 µl 0.25 N HCl i 25 µl 0.5 mM Tris-HCl (pH 8.0) z 0.1% Tween-20, ogrzewana przez 10 minut w temperaturze 95°C i umieszczana na lodzie na 2 minuty).

Reakcja PCR przeprowadzana jest w 25-µl objętości przy użyciu 3 µl matrycy DNA, 1 U PLATINIUM Taq DNA polimerazy (Invitrogen), 25 pmoli każdego startera i 200 µM dNTPs w 1.5 mM MgCl<sub>2</sub>.

Źródło i jakość Taq polimerazy mają istotne znaczenie.

Warunki amplifikacji reakcji PCR są następujące: 1 cykl przez 1 minutę w 94°C, 25 cykli po 15 sekund w 94°C, 15 sekund w 55°C, 30 sekund w 72°C. Produkt reakcji PCR jest rozdzielany na 1.5% żelu agarozowym w 1.5 V/cm. Fragment DNA wybarwiany jest w roztworze bromku etydyny (0.5 µg/ml w buforze TAE) przez 30 minut. Wielkość oczekiwanego amplikonu to: 0.92 kb.

Alternatywnie mogą być stosowane startery zaprojektowane do regionu hrpS (HRP1d: GCA CTC ATT CCG ACC AC i HRP3c: GCG GCA TAC CTA ACT CC) lub startery z sekwencji regionu cpsD (CPSL1: CCT GTC AGT CTC GAA CC, i CPSR2c: ATC TCG AAC CGG TAA CC), przy zastosowaniu tych samych warunków amplifikacji jak powyżej. Wielkości amplikonów wynoszą 0.9 kb i odpowiednio 1.1 kb.

## Genetyczny “odcisk palca”

Badanie chromosomalnego DNA może być przeprowadzone z wykorzystaniem techniki PFGE opisaną przez Zhang i Geider (1997) lub przez analizę REP-PCR, zgodnie z Louws et al. (1994).

## Profil kwasów tłuszczowych

Analiza kwasów tłuszczowych przeprowadzana jest z wykorzystaniem systemu MIDI (Newark, US) i wyposażenia firmy Agilent, w sposób opisany przez Janse (1991) i Stead et al. (1992).

## Test patogeniczności

Test patogeniczności przeprowadzany jest na 5-10 roślinach przez inokulację 8-14 dniowych łodyg (w stadium 1-2 liści) roślin kukurydzy odmiany wrażliwej (np. ‘Jubilee’, ‘Meritosa’) rosnących w szklarni. Rośliny inokulowane są za pomocą strzykawki zawiesiną bakterii o gęstości  $10^7$ – $10^8$  komórek w mililitrze, przygotowaną w sterylnej wodzie destylowanej z podejrzanych kolonii inkubowanych przez 48 godzin w temperaturze 25°C na podłożu King B. Po inokulacji rośliny przetrzymywane są w wilgotnej komorze przez 24–48 h w temperaturze 25–27°C. Pierwsze objawy chorobowe (smugowatość) mogą wystąpić po 3-5 dniach, ale większość typowych objawów pojawia się siódmego dnia lub później (wodniste, żółte kieszonki wydzieliny w tkance przewodzącej). Objawy wędnięcia na ogół występują po 14 dniach. W niektórych przypadkach w tkance przewodzącej powstaje żółty śluz bakteryjny.

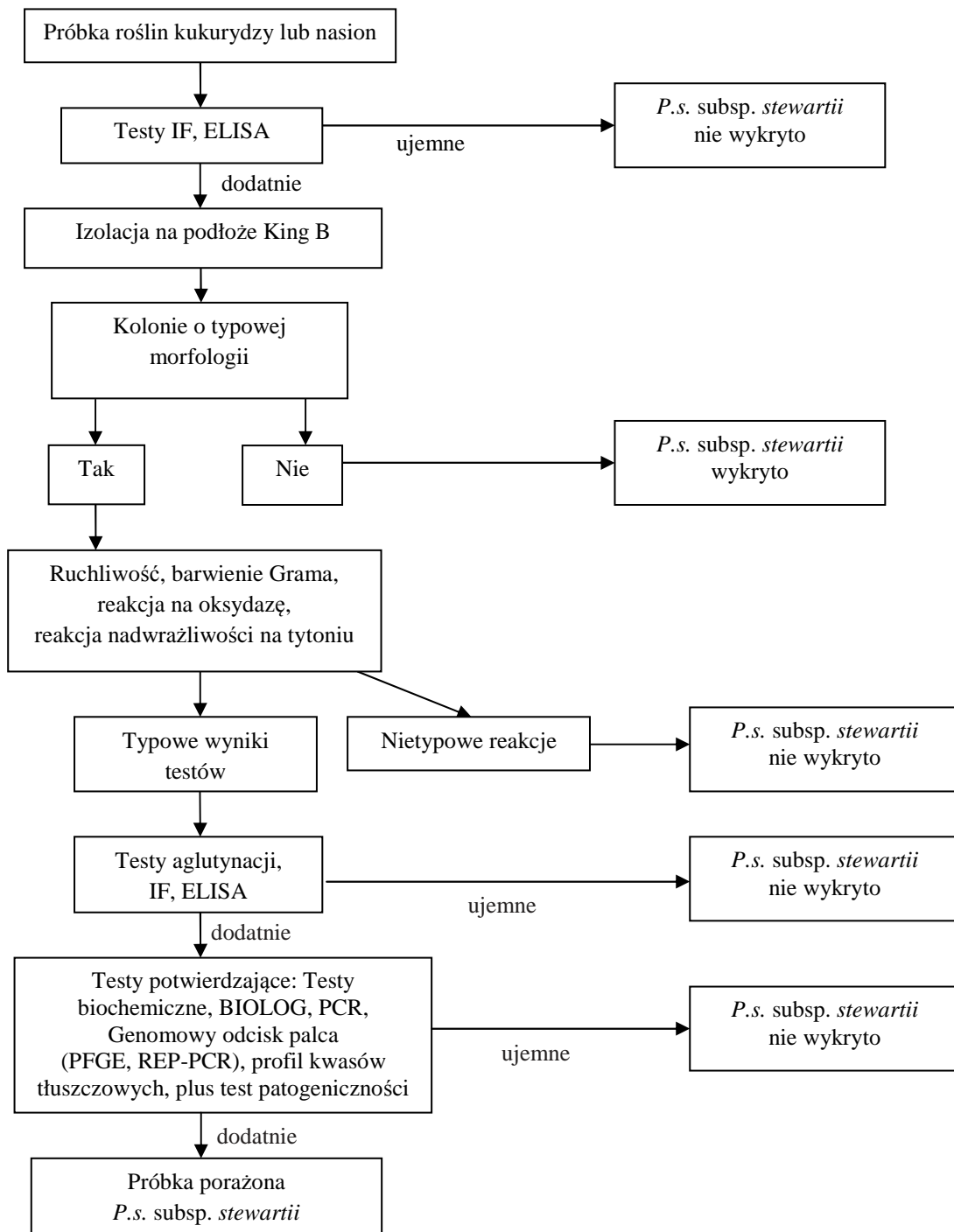
Wiele bakterii innych niż *P. s. stewartii* może powodować wodniste objawy wokół miejsc zranienia w przypadku inokulacji łodyg kukurydzy (np. *Pantoea agglomerans*), ale bez wydzielania śluzu.

*P. stewartii* ogólnie przypomina *P. agglomerans* i *Pantoea stewartii* subsp. *indologenes*, różnice pomiędzy gatunkami zestawiono w Tabeli 1. *P. agglomerans* występuje na powierzchni roślin głównie jako organizm wtórny w uszkodzeniach powodowanych przez inne bakteryjne patogeny roślin. *P. s. indologenes* jest zdolna do powodowania plam na liściach włośnicy ber (*Setaria italica*), na rozplenicy amerykańskiej (*Pennisetum americanum*) i korzeniu *Ananas comosus*.

### Szczepy odniesienia

CPPB 2295 (= CFBP 3167) NCPPB 449 (= CFBP 3168). Polecanym szczepem odniesienia *P. s. indologenes* jest NCPPB 2280 i *P. agglomerans* LMG 1286.

Rys. 1 Diagram wykrywania *P.s. subsp. stewartii* w kukurydzy.





## Raportowanie i dokumentacja

Wskazówki dotyczące raportowania i dokumentacji zawiera EPPO Standard PM 7/nn (w przygotowaniu).

## Informacje dodatkowe

Informacje dodatkowe mogą być uzyskane z: Dr J. Németh, Plant Protection and Soil Conservation Service, 7615 Pécs, P.O.Box 13. Hungary, Tel. 36 73 552246, Fax 36 72 255940, E-mail: nemeth.jozsef@baranya.ontsz.hu.

## Podziękowania

Protokół został napisany w oryginale przez: Dr J. Németh, Plant Protection and Soil Conservation Service, Pécs (HU). Składamy podziękowanie również Prof J. Pataky University, Illinois, Urbana, USA za jego krytyczne uwagi dotyczące metod opisanych w tym protokole.

## Materiały źródłowe<sup>2</sup>

- Bradbury JF (1986) Guide to Plant Pathogenic Bacteria. CAB International, Wallingford (GB).
- Coplin DL & Majerczak DR (2002) Identification of *Pantoea stewartii* subsp. *stewartii* by PCR and strain differentiation by PFGE. Plant Disease 86, 304–311.
- Dye DW (1969) A taxonomic study of the genus *Erwinia* III. 'Herbicola' group. New Zealand Journal of Science 12, 232–236.
- EPPO/CABI (1997) *Pantoea stewartii* subsp. *stewartii*. Quarantine Pests for Europe, 2nd edn, pp. 1031–1035. CAB International, Wallingford (GB).
- EPPO/CABI (1998) *Pantoea stewartii* subsp. *stewartii*. In: Distribution Maps of Quarantine Pests for Europe. Map 265. CAB International, Wallingford (GB).
- Janse JD (1991) Infra- and intraspecific classification of *Pseudomonas solanacearum* strains, using whole cell fatty acid analysis. Systematic and Applied Microbiology 14, 335–345.
- Lamka GL, Hill HJ, McGee DC & Braun EJ (1991) Development of an immunosorbent assay for seedborne *Erwinia stewartii* in corn seeds. Phytopathology 81, 839–846.
- Lelliott RA & Stead DE (1987) Methods for the Diagnosis of Bacterial Diseases of Plants. Blackwell, Oxford (GB).
- Louws FJ, Fulbright DW, Stephens CT & de Bruijn FJ (1994) Specific genomic fingerprints of phytopathogenic *Xanthomonas* and *Pseudomonas* pathovar and strains generated with repetitive sequences and PCR. Applied and Environmental Microbiology 60, 2286–2295.
- Mergaert J, Verdonck L & Kersters K (1993) Transfer of *Erwinia ananas* and *Erwinia stewartii* to Genus *Pantoea* emend. as *Pantoea ananas* (Serrano 1928) comb. nov. & *Pantoea stewartii* (Smith 1898) comb. nov., respectively, and description of *Pantoea stewartii* subsp. *indologenes* subsp. nov. International Journal of Systemic Bacteriology 43, 162–173.
- OEPP/EPPO (2004) EPPO Standards PM 7/20. Diagnostic protocols for regulated pests. *Erwinia amylovora*. Bulletin OEPP/EPPO Bulletin 34, 159–171.
- Schroth MN & Hildebrand DC (1988) *Erwinia amylovora* or non-soft rot group. In: Laboratory Guide for Identification of Plant Pathogenic Bacteria (Ed. Schaad, NW). APS Press, St Paul (US).

<sup>2</sup> Została zachowana oryginalna pisownia. (przyp. tłum.)

- Stead DE, Sellwood JE, Wilson J & Viney I (1992) Evaluation of a commercial microbial identification system based on fatty acid profiles for rapid accurate identification of plant pathogenic bacteria. *Journal of Applied Bacteriology* 72, 315 – 321.
- Zhang Y & Geider K (1997) Differentiation of *Erwinia amylovora* strains by pulsed field gel electrophoresis. *Applied and Environmental Microbiology* 63, 4421– 4426.

<b>Tłumaczenie z jęz. angielskiego:</b>	<b>Sprawdził:</b>	<b>Zatwierdził:</b>
Monika Kordyla-Bronka (GIORiN CL)	Anna Kołodziejaska (GIORiN CL)	Janina Butrymowicz (GIORiN CL)
15.10.2009		