

Diagnostyka¹ Diagnostic

Xanthomonas fragariae

Zakres

Standard ten opisuje protokół diagnostyczny dla *Xanthomonas fragariae*.

Wprowadzenie

Xanthomonas fragariae jest czynnikiem sprawczym bateryjnej kanciastej plamistości liści truskawki. Jest to choroba potencjalnie niebezpieczna i podstępna, która po raz pierwszy została odnotowana w USA (Kennedy i King, 1962a). Później opisana w Nowej Zelandii, Australii, kilka przypadków w Azji i Afryce oraz w większości krajów europejskich, gdzie uprawiana jest truskawka (EPPO/CABI, 1998). W Wisconsin (USA) (Epstein, 1966) choroba ta została odnotowana z powodu straty 75% owoców. Choroba ta jest szeroko rozpowszechniona w szkółkach wielu krajów, a w Europie jest przyczyną poważnych strat w produkcji truskawki (Mazzucchi *et al.*, 1973; López *et al.*, 1985; Bosshard i Schwind, 1997). *X. fragariae* łatwo ulega przenoszeniu wraz z roślinami nie wykazującymi objawów choroby, posiadającymi infekcję utajoną, a USA są obwiniane o to, że w wyniku handlu międzynarodowego do wielu krajów zostały wprowadzone rośliny porażone w formie utajonej (López *et al.*, 1985). Patogen rozprzestrzenia się z roślin zebranych z porażonych szkółek, a objawy pojawiają się w sprzyjających warunkach, jak również po przechowywaniu w niskiej temperaturze (Rat, 1993).

Tożsamość

Nazwa: *Xanthomonas fragariae* Kennedy i King.

Stanowisko taksonomiczne: *Bacteria, Gracilicutes.*

Kod EPPO : XANTFR.

Kategoria fitosanitarna : Lista EPPO A2 nr. 135, UE Załącznik II/A2.

Zatwierdzenie i nowelizacja

Standard ten został opracowany w ramach Projektu UE DIAGPRO (SMT 4-CT98-2252) opartego na współpracy wyznaczonych laboratoriów oraz laboratoriów porównawczych pochodzących z krajów europejskich. Zatwierdzony jako Standard EPPO w 2005-09.

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

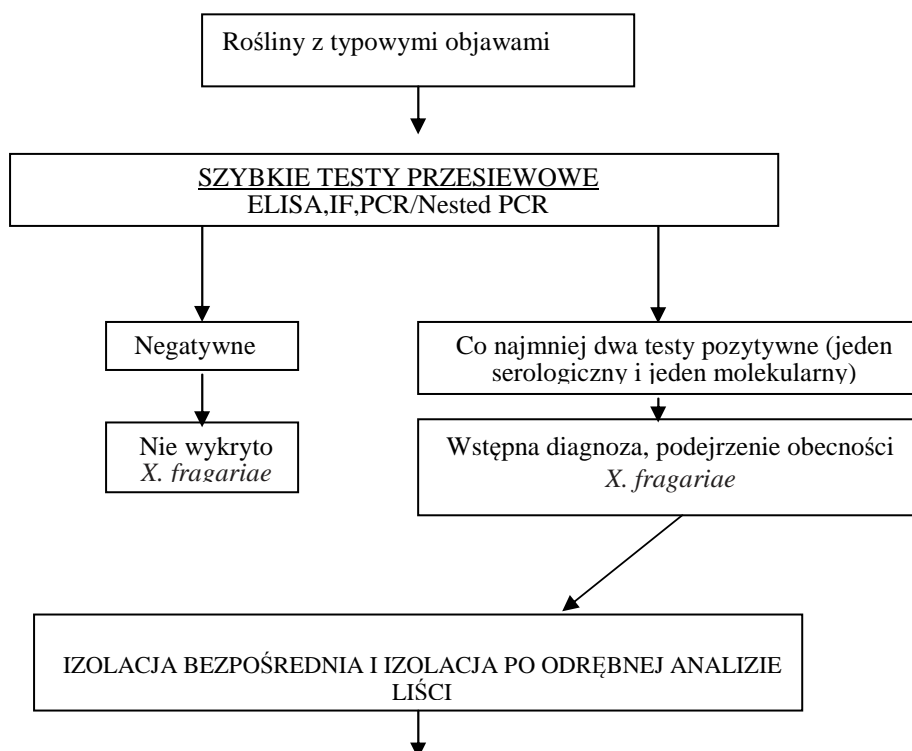
Wykrywanie

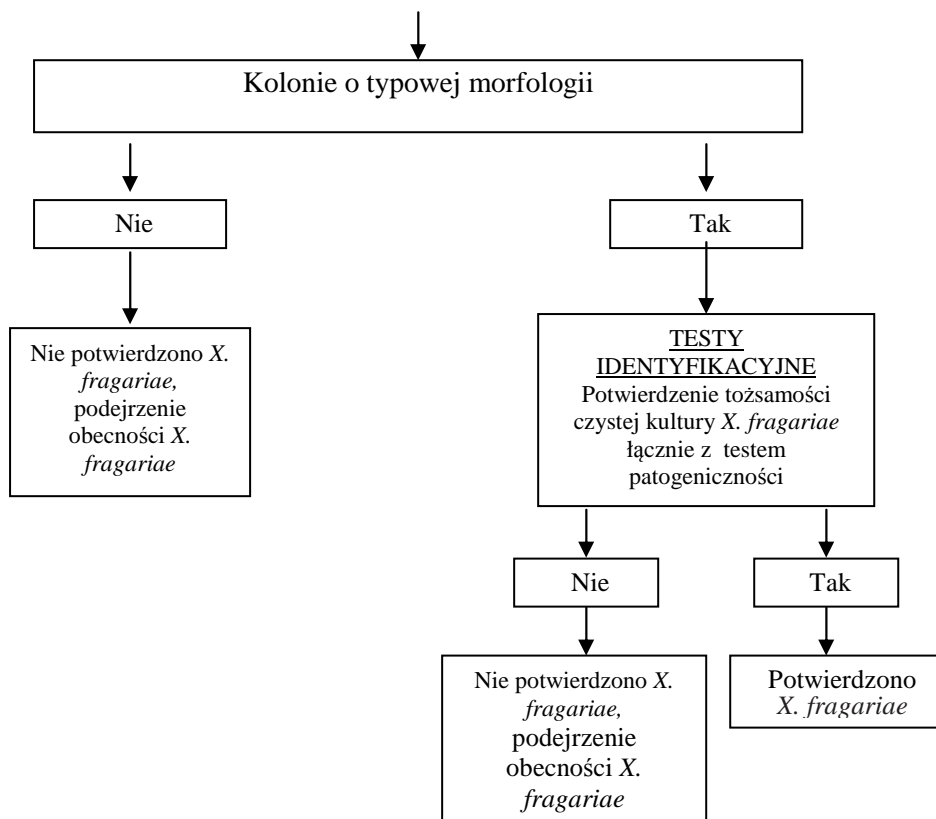
Naturalną rośliną żywicielską dla *X. fragariae* jest *Fragaria x ananassa*, jej rodzice *Fragaria chiloensis* i *Fragaria virginiana*, oraz różne dzikie truskawki jak np *Fragaria vesca*.

Objawy

Początkowo pojawiają się tylko na spodniej stronie blaszki liściowej małe (1 – 4 mm) nieregularne, wodniste plamki otoczone żyłkami. W początkowym stadium plamki widoczne są tylko na spodniej stronie blaszki liściowej, stają się one przezroczyste w świetle przechodzącym. Bakterie rozprzestrzeniają się najczęściej poprzez nawadnianie, deszcz lub w wyniku nowej infekcji, wzdłuż głównych naczyń blaszki liściowej z istniejących plamek (Kennedy i King, 1962b). W warunkach wysokiej względnej wilgotności może pojawić się wydzielina w kolorze białym, mlecznym, kremowym lub żółtym, tworząca żółte błyszczące, nieprzezroczyste lub brązowe grudki. Największą wrażliwość wykazują liście w wieku od 2 tygodni do 2 miesięcy. Starsze i młodsze liście są odporne na infekcję. Rozmiary uszkodzeń powiększają się stopniowo, a plamki mogą łączyć się i stawać widoczne na górnej stronie blaszki liściowej (Rat, 1993). Obumarłe tkanki widoczne są jako czerwono – brązowe nieregularne plamy, które rozrywają się i wykruszają. Infekcja systemiczna korony roślin truskawki została opisana w USA przez Hildebrand *et al.* (1967), a endofityczne przemieszczanie się bakterii zostało potwierdzone przez Stefani *et al.* (1989).

Objawy bakteryjnej kanciastej plamistości liści truskawki powodowane przez *X. fragariae* można pomylić z objawami powodowanymi przez grzyb *Mycosphaerella fragariae*, a także z objawami powodowanymi przez nowy patovar - *X. arboricola* pv. *fragariae* (Janse *et al.*, 2001). Wstępne badania wykazały, że *X. a. fragariae* może być szerzej rozprzestrzeniona w regionie EPPO niż to zostało pierwotnie określone. Ostateczna diagnoza powinna być zawsze oparta na wynikach analiz laboratoryjnych.





Rys. 1. Schemat wykrywania bakteryjnej kanciastej plamistości liści truskawki (*Xanthomonas fragariae*) w przypadku roślin żywicielskich wykazujących objawy.

Identyfikacja w roślinach wykazujących objawy chorobowe

Procedury do wykonania zostały przedstawione w schemacie na Rys. 1.

Pobieranie i przygotowanie próbek

Próbkę roślin wykazujących objawy, przeznaczonych do analizy na obecność bakteryjnej kanciastej plamistości liści truskawki powinny, jeśli to możliwe, stanowić liście ze świeżymi wodnistymi plamami, lub przeciwnie, z suchymi plamami z wyciekami lub bez wycieków. W przypadku podejrzenia o infekcję systemiczną, badaniu należy poddać tkankę pobraną z korony roślin. Procedura ogólnego przygotowania próbki do badania na obecność *X. fragariae* (Załącznik 1 – rośliny z objawami) obowiązuje w przypadku izolacji, testu biologicznego, testu serologicznego oraz dla amplifikacji PCR (przed lub po biologicznym wzbogaceniu).

Szybkie test przesiewowe

Wstępną diagnozę ułatwiają szybkie testy przesiewowe (Załącznik 2). Ponieważ bakteria *X. fragariae* jest trudna do izolacji, w celu potwierdzenia wstępnej diagnozy należy uzyskać dodatkowe wyniki dwóch testów – testu serologicznego (ELISA lub test Immunofluorescencji (IF) i testu PCR/ Nested PCR.

Izolacja

Bezpośrednia izolacja *X. fragariae* jest trudna ponieważ bakteria wykazuje bardzo wolny wzrost na sztucznym podłożu odżywczym, nawet jeśli są obecne objawy i wycieki. Z roślin wykazujących objawy chorobowe należy pobrać liście z młodymi uszkodzeniami, a następnie zdezynfekować je pojedynczo za pomocą wacika nasączonego 70% etanolem. Izolację należy wykonać ze świeżych wodnistych uszkodzeń lub z brzegów starszych uszkodzeń wycinając małe fragmenty tkanki ostrym, sterylnym skalpelem. Pobraną tkankę miażdżyć przez 10–15 min w kilku ml sterylnej wody destylowanej lub buforze PBS (Załącznik 7) i postępować zgodnie z Załącznikiem 3 (metoda 1). Izolacja jest zwykle skuteczniejsza na podłożu Wilbrink zawierającym azotan (Wilbrink-N) (Załącznik 7) niż na podłożu YPGA lub na innym zwykłym podłożu. Zaleca się używać do wszystkich podłoży oczyszczonego agaru (Difco) ponieważ brak oczyszczenia agaru może hamować wzrost bakterii *X. fragariae*.

Alternatywna metoda izolacji oparta jest na powierzchniowej dezynfekcji zainfekowanego materiału roślinnego, poprzedzającej dyfuzję bakterii do buforu ekstrakcyjnego, posiew i wzrost bakterii na podłożu odżywczym (Załącznik 3, metoda 2).

Interpretacja wyników izolacji

Izolacja jest negatywna jeśli po 7 dniach, na żadnym z dwóch podłoży nie obserwuje się wzrostu kolonii bakterii o typowej morfologii dla *X. fragaria* (pod warunkiem, że nie podejrzewa się zahamowania wzrostu z powodu konkurencji lub antagonizmu), a na płytkach z kontrolą pozytywną stwierdza się typowe kolonie dla *X. fragariae*. Wynik negatywny nie gwarantuje nieobecności patogena. Izolacja jest pozytywna jeśli poszukiwane kolonie *X. fragariae* zostaną wyizolowane na co najmniej jednym z użytych podłoży.

Analizując próbki wykazujące objawy, nie zawsze obserwuje się dobrą korelację pomiędzy izolacją a szybkimi testami przesiewowymi, ponieważ izolacja często nie udaje się. Najlepszych wyników izolacji można oczekiwać w przypadku użycia świeżo przygotowanych próbek w formie ekstraktu uzyskanego z młodych uszkodzeń. Nawet w przypadku nieudanej izolacji jeśli test serologiczny i test PCR są pozytywne próbka powinna zostać uznana za przypuszczalnie porażoną przez *X. fragariae*.

Odrębna analiza liści

Próbki przygotowane w buforze do maceracji mogą być bezpośrednio użyte do inokulacji odrębnych liści truskawki, według Civerolo *et al.* (1997) (Załącznik 4). Odrębna analiza liści jest negatywna jeśli po 28 dniach w żadnym miejscu inokulacji nie pojawią się typowe kanciaste plamistości liści lub chlorotyczne strefy halo. Kontrole negatywne powinny być negatywne lub co najmniej pokazać całkowicie odmienne uszkodzenia. Odrębna analiza liści jest pozytywna jeśli po 28 dniach w niektórych miejscach inokulacji pojawią się typowe kanciaste plamistości liści lub chlorotyczne strefy halo. Uszkodzenia te powinny różnić się od tych, które mogą czasami być obserwowane w kontrolach negatywnych.

PCR lub posiew po odrębnej analizie liści

Zainokulowane w odrębnej analizie liście mogą być użyte do testu PCR lub posiewu po wzbogaceniu. Po 24 godzinach po inokulacji z odrębnie analizowanych liści poddanych inokulacji pobrać po 1 liściu z próbki, a z każdego zainokulowanego miejsca pobrać 10–12 małych fragmentów o średnicy 0,5 cm i zmiażdżyć je w 4,5 ml PBS (Załącznik 7).

Dla testu PCR, próbki można na tym etapie przechowywać w temperaturze -20°C . Zastosować metodę *Szybkich testów przesiewowych* (powyżej) (Załącznik 2). Każdą ze wzbogaconych próbek posiać na płytce z podłożem, a po 4 dniach pobrać bakterie do analizy metodą PCR. Metoda ta

jest modyfikacją bio- wzbogaconego PCR opisanego przez Schaad *et al.* (1995).

Do posiewu należy użyć próbki bezpośrednio, bez zamrażania. Po przygotowaniu rozcieńczeń w buforze PBS: 1:10, 1:100 i 1:1000 wzbogacone próbki posiać na podłoże Wilbrink N (Załącznik 7). W celu uzyskania pojedynczych koloni każde rozcieńczenie posiać na trzech szalkach (Załącznik 3). Po inkubacji w 25 °C przez 5–7 dni, z podejrzanymi koloniami *X. fragariae* -postępować jak w części *Izolacja* (Załącznik 3).

Identyfikacja w próbkach nie wykazujących objawów chorobowych

Choć schemat diagnostyczny ma zastosowanie w identyfikacji bakterii w roślinach wykazujących objawy (Rys, 1) to nie ma wystarczających informacji co do zastosowania tego schematu w identyfikacji próbek nie wykazujących objawów chorobowych.

Próbkobranie i przygotowanie próbki

Próbki nie wykazujące objawów można poddać badaniu indywidualnie lub w grupach do 50 roślin. Jeśli przeprowadzane są lustracje powinny one bazować na próbkach statystycznie reprezentatywnych. Próbki z przechowalni mogą być pobrane losowo natomiast pochodzące z sadów lub szkółek nie mogą.

Próbkobranie i przygotowanie do badań próbki rozłogów nie wykazujących objawów mogą być przeprowadzone zgodnie z modyfikacją procedury OEPP/EPPO (1994) (Załącznik 1 – rośliny bez objawów, metoda 1) lub badając korony i ogonki liściowe roślin (Randhawa Kalifornijskie Laboratorium Nasion i Roślin) (Załącznik 1 rośliny bez objawów, metoda 2).

Izolacja

Do bezpośredniej izolacji może zostać użyty roztwór po płukaniu, osad lub macerat z koron roślin, tak jak w metodzie badania próbek z objawami (Załącznik 3). Niestety, izolacja *X. fragariae* z próbek bez objawów jest zwykle negatywna z powodu niskiej populacji bakterii.

Testy przesiewowe

Procedury dla testu ELISA, IF i PCR są takie jak dla próbek z objawami (Załącznik 2). Jeśli dwa testy przesiewowe są pozytywne a izolacja jest negatywna, należy ponowić próbę izolacji patogena z nowej świeżej próbki.

Potwierdzenie

Identyfikacja biochemiczna i fizjologiczna

Testy klasyczne

X. fragariae posiada cechy charakterystyczne dla wszystkich xanthomonad: Gram-ujemne, tlenowe, pałeczki, z pojedynczą polarną wicią, brak redukcji azotanów, katalaza pozytywna, aspargina nie jest wykorzystywana jako jedyne źródło węgla i azotu i producenta xanthomonadin, słaba produkcja kwasów z węglowodanów. Na podłożu YPGA i Wilbrink-N kolonie są śluzowate, wypukłe i lśniące (Dye, 1962; van den Mooter i Swings, 1990; Swings *et al.*, 1993). Przy wykorzystaniu cech przedstawionych w Tabeli 1 na podstawie: (Schaad i Stall, 1989; Schaad *et al.*, 2001) można łatwo odróżnić *Xanthomonas* spp. od innych rodzajów bakterii tlenowych, Gram-ujemnych pałeczek i innych

żółto zabarwionych bakterii.

Najbardziej istotne lub użyteczne cechy służące odróżnieniu *X. fragariae* od innych *Xanthomonas* (Schaad i Stall 1989; Goszczyńska *et al.*, 2000; Janse *et al.*, 2001) zostały przedstawione w Tabeli 2. Różnice pomiędzy *X. campestris* uzasadniają status *X. fragariae* jako osobnego gatunku. Na podłożu odżywczym wzrost jest słaby, ale przy wprowadzeniu 5% glukozy jest znacznie lepszy. Dla wzrostu większości szczepów wymagany jest agar oczyszczony. W celu dłuższego przechowywania, kultury należy zamrozić w temperaturze – 80 °C, w postaci zawiesiny o gęstości większej niż 10¹⁰ kom/ml w sterylnym 30% glicerolu.

Charakterystyka biochemiczna z wykorzystaniem testów dostępnych w handlu

X. fragariae można zidentyfikować biochemicznie dzięki specyficznym profilom w testach API 20 NE oraz API 50 CH (BioMérieux, Francja). Dla API 20 NE, w celu sprawdzenia właściwości enzymatycznych, instrukcja producenta zaleca przygotowanie zawiesiny 48 godzinnej kultury na podłożu Wilbrink-N (Załącznik 7), inokulację pasków i ich inkubację w 25–26 °C oraz odczyt testu po 48 h oraz celu sprawdzenia rozkładu substratu (Tabela 3) po 96 h w. Dla API 50 CH, 1 ml zawiesiny przygotowanej w PBS o wartości OD = 1.0 (Załącznik 7), należy dodać do 20 ml podłoża C - Dye (1962) (Załącznik 7). Zgodnie z instrukcją producenta wykonać inokulację paska, a następnie inkubować w temp. 25 °C w warunkach tlenowych i odczytać wynik po 2, 3 i 6 dniach. Po okresie inkubacji wykorzystanie różnych węglowodanów jest widoczne w postaci żółtego zabarwienia studzienki (Tabela 4).

Tabela 1 Cechy fenotypowe wykorzystywane do różnicowania *Xanthomonas* od *Pseudomonas* oraz innych żółto zabarwionych bakterii jak *Flavobacterium*

Test	<i>Xanthomonas</i>	<i>Pseudomonas</i>	<i>Flavobacterium</i>	<i>Pantoea</i>
Wić	1, polarna	>1, polarna	brak	peritrichalna
Xanthomonadin	+	–	–	–
Fluorescencja	–	v	–	–
Prod. lewanu z sacharozy	+	v	–	–
Prod H ₂ S z cysteiny	+	–	–	–
Oksydaza	–	v	+	–
Fermentacja	–	–	–	+
Wzrost na 0.1% TTC	–	+	+	+

V: reakcja zmienna

Tabela 2 Testy diagnostyczne do różnicowania *Xanthomonas* spp

Testy	<i>X. campestris</i>	<i>X. arboricola</i> pv. <i>fragariae</i>	<i>X. fragariae</i>
Wzrost w 35 °C	+	ND	–
Wzrost w 2% NaCl	+	+	–
Hydroliza eskuliny	+	+	–
Uplynnianie żelatyny	V	+	+
Trawienie białka	+	ND	–
Hydroliza skrobi	V	+	+
Produkcja mocznika	–	–	–
Prod. kwasu: z arabinozy	+	ND	–
Galaktozy	+	+	–
Trehalozy	+	ND	–
Celobiozy	+	+	–

V: reakcja zmienna

ND: nie określona

Tabela 3 Reakcja *X. fragariae* w teście API 20 NE

Test	reakcja (48 lub 96h) ¹
Fermentacja glukozy	–
Arginina	–
Ureaza	–
Eskulina	+
Żelatyna	słabo +
PNPG	+
Przyswajanie:	
Glukozy	+
Arabinozy	–
Mannozy	+
Mannitolu	–
N-acetylo-glukozoaminy	+
Maltozy	–
Glukanu	–
Kaprynianu	–
Adypinianu	–
Jabłczanu	+
Cytrynianu	–
Fenylooctanu etylu	–

¹Przeanalizowano reakcje 90% szczepów *X. fragariae* (Domínguez *et al.*, pers. ccomm.). Dla pierwszych 6 testów, odczytanych po 48 h. Dla pozostałych, odczytanych po 96 h.

Testy serologiczne

W celu wykonania testu IF, przygotować w buforze PBS zawiesinę bakterii o gęstości około 10^6 komórek na ml i zastosować procedurę IF dla próbek z objawami (Załącznik 2). Zamiennie można użyć test pośredni ELISA lub DAS-ELISA (Załącznik 2). W Załączniku 2 podano również zalecane przeciwciała. Jeśli zastosowane zostaną tylko dwa testy identyfikacyjne tylko jeden z nich powinien być serologiczny.

Test PCR

W molekularnie sterylnej wodzie przygotować zawiesinę bakterii o gęstości 10^6 komórek na ml z 48 h kultury wyhodowanej na podłożu Wilbrink-N. Dla próbek z objawami należy zastosować procedurę (Załącznik 2) lub alternatywnie protokół wg. Roberts *et al.* (1996), bez ekstrakcji DNA (Załącznik 5).

Analiza kwasów tłuszczowych (FAP)

Hodować kultury bakterii na podłożu tryptozowo sojowym przez 48 h w 28 °C. Analiza kwasów tłuszczowych jest dostępna z MIDI (Newark, US), NCPPB (CSL, York, GB), oraz PD (Wageningen, NL). Test jest pozytywny jeśli uzyskany profil badanej kultury jest identyczny z kontrolą pozytywną *X. fragariae*.

REP-PCR

Przedstawione protokoły były wykorzystywane przez Opgenorth *et al.* (1996) do swoistej identyfikacji szczepów *X. fragariae*. Mieszanina reakcyjna PCR oraz warunki amplifikacji są w istocie takie same jak opisane przez Louws *et al.* (1994). Sekwencje starterów są następujące:

REP1R-I, 5'-IIIICGICGICATCIGGC-3';
REP2-I, 5'-ICGICTTATCIGGCCTAC-3';
ERIC1R,5'-ATGTAAGCTCCTGGGGATTAC-3';
ERIC2,5'-AAGTAAGTGACTGGGGGTGAGCG-3'.

Warunki amplifikacji: 95 °C przez 6 min, następnie 35 cykli w 94 °C przez 1 min, 44 °C (REP startery) lub 52 °C (ERIC startery) przez 1 min, 65 °C przez 8 min. Po cyklach amplifikacji następuje końcowy cykl wydłużania w 68 °C przez 16 min.

Inokulacja

Aby udowodnić patogeniczność podejrzanych kolonii *X. fragariae* pochodzących z izolacji i wzbogaconych płytek należy zainokulować rośliny truskawki, szczególnie w przypadku nowych wykryć. W tym celu można wykorzystać odrębną analizę liści opisaną dla próbek z objawami (Załącznik 4) lub inne procedury (Hazel i Civerolo, 1980) (Załącznik 6).

Tabela 4 Odczyt reakcji typowej kultury *X. fragariae* w teście API 50 CH po 6 dniach

Test ¹	Reakcja
d-arabinoza	zmienna
Galaktoza	+
d-glukoza	+
d-fruktoza	+
d-mannoza	+
N-acetylglucozamina	+
Eskulina	+
Melibioza	zmienna
Sacharoza	+
Trehaloza	+
d-ksyloza	+
I-fukoza	+

¹Pozostałe cukry nie są rozkładane przez *X. fragariae* (Domínguez, pers. comm.)

Materiał odniesienia

Patrz Załącznik 8.

Sprawozdawczość i dokumentacja

Wskazówki dotyczące sprawozdawczości i dokumentacji są dostępne w Standardzie EPPO PM7/- (w przygotowaniu).

Informacje dodatkowe

Informacje dodatkowe dotyczące tego organizmu można uzyskać pod adresem: M.M. López, Departamento de Protección Vegetal y Biotecnología, Instituto Valenciano de Investigaciones Agrarias (IVIA), Carretera de Moncada-Náquera km 5, 46113 Moncada (Valencia) (ES), E-mail: (mlopez@ivia.es); E.L. Civerolo, USDA, ARS, PWA, San Joaquin Valley Agricultural Sciences Center, Exotic and Invasive Diseases and Pests Research, 9611 So, Riverbend Ave., Parlier, CA 93648, E-mail: (eciverolo@fresno.ars.usda.gov).

Podziękowania

Protokół ten został pierwotnie opracowany przez M.M. Lopez, F. Domínguez, C. Morente, C.I. Salcedo i A. Olmos (IVIA, 46113, Moncada (Valencia), Hiszpania), oraz E. Civerolo (USDA-ARS. PWA Parlier, CA 93648, USA). Główne testy diagnostyczne zalecane w tym protokole przeszły badania porównawcze w różnych laboratoriach diagnostycznych².

Materiały źródłowe³

- Bosshard E & Schwind M (1997) Detection of different bacterial and fungal pathogens in apparently healthy strawberry plants. In: *Diagnosis and Identification of Plant Pathogens* (Ed. H-W Dehne, et al.), pp. 37–41. Kluwer, Dordrecht (NL).
- Bradbury JF (1986) *Guide to Plant Pathogenic Bacteria*. CAB International, Wallingford (GB).
- Civerolo EL, Feliciano AJ, Melvin JA & Gubler WD (1997) A detached leaf bioassay for *Xanthomonas fragariae*. In: *Proceedings of the 9th International Conference of Plant Pathogenic Bacteria* (Ed. by Mahadevan, A), pp. 89–94. University of Madras, Madras (IN).
- Civerolo EL & Roberts P (1997) Comparative detection of *Xanthomonas fragariae* in strawberry plants by detached leaf inoculation, ELISA and PCR. In: *Proceedings of the 9th International Conference of Plant Pathogenic Bacteria* (Ed. Mahadevan, A), pp. 95–99. University of Madras, Madras (IN).
- Dye DW (1962) The inadequacy of the usual determinative test for the identification of *Xanthomonas* spp. *New Zealand Journal of Science* **5**, 393–416.
- EPPO/CABI (1998) *Distribution Maps of Quarantine Pests for Europe*. CAB International, Wallingford (GB).
- Epstein AH (1966) Angular leaf spot of strawberry. *Plant Disease* **50**, 167.
- EU (1998) Interim testing scheme for the diagnosis, detection and identification of *Ralstonia solanacearum* in potatoes. Annex II to Council Directive 98/57/EC of 20 July 1998 on the control of *Ralstonia solanacearum*. *Official Journal of the European Communities* **L235**, 8–39.
- Goszczyńska T, Serfontein JJ & Serfontein S (2000) *Introduction to Practical Phytobacteriology*. Swiss Agency for Development and Cooperation, Bern (CH).
- Hayward C (1960) A method for characterizing *Pseudomonas solanacearum*. *Nature* **186**, 405–406.
- Hazel WJ & Civerolo EL (1980) Procedures for growth and inoculation of *Xanthomonas fragariae*, causal organism of angular leaf spot of strawberry. *Plant Disease* **64**, 178–181.
- Hildebrand DC, Schroth MN & Wilhelm S (1967) Systemic invasion of strawberry by *Xanthomonas fragariae* causing vascular collapse. *Phytopathology* **57**, 1260–1261.
- Janse JD, Rossi MP, Gorkink RFJ, Derks JHJ, Swings J, Janssens D & Scortichini M (2001) Bacterial leaf blight of strawberry (*Fragaria x ananassa*) caused by a pathovar of *Xanthomonas arboricola*, not similar to *Xanthomonas fragariae* Kennedy & King. Description of the causal organism as *Xanthomonas arboricola* pv. *fragariae* (pv. nov., comb. nov.). *Plant Pathology* **50**, 653–665.
- Kennedy BW & King TH (1962a) Angular leaf spot of strawberry caused by *Xanthomonas fragariae* sp. nov. *Phytopathology* **52**, 873–875.
- Kennedy BW & King TH (1962b) Studies on epidemiology of bacterial angular leaf spot of strawberry. *Plant Disease Reporter* **46**, 360–363.

²J. Janse (Plant Protection Service, Wageningen, NL); M. Keck (Bundesamt und Forschungszentrum für Landwirtschaft, Vienna, AT); A. Sletten (Plant Protection Centre, Ås, NO); S. Simpkins (Central Science Laboratory, York GB); L. Cruz (Centro Nacional da Producao Tapada de Ajuda, Lisbon, PT);

F. Poliakoff (LNPV Unité Bactériologie, Angers, FR); J. Van Vaerenbergh Rijkstation voor Plantenziekten, Merelbeke (BE); A. Baudry NPV, Villenave d'Ornon (FR); M.M. López (IVIA, Moncada-Valencia, ES).

³ Została zachowana oryginalna pisownia. (przyp. tłum.)

- Koike H (1965) The aluminium-cap method for testing sugarcane varieties against leaf scald disease. *Phytopathology* **55**, 317–319.
- López MM, Aramburu JM, Cambra M & Borrás V (1985) [Detection and identification of *Xanthomonas fragariae*. Spain.] *Anales INIA* **28**, 245–257 (in Spanish).
- 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.
- Mazzucchi U, Alberghina A & Dally A (1973) Occurrence of *Xanthomonas fragariae*. Italy. *Phytopathologische Zeitschrift* **76**, 367–370.
- OEPP/EPPO (1994) EPPO Standards PM 3/58 Phytosanitary procedures *Xanthomonas fragariae*. *Bulletin OEPP/EPPO Bulletin* **24**, 343–346.
- Opgenorth DC, Smart CD, Louws FJ, Bruijn FJ & Kirkpatrick BC (1996) Identification of *Xanthomonas fragariae* field isolates by rep-PCR genomic fingerprinting. *Plant Disease* **80**, 868–873.
- Pooler MR, Ritchie DF & Hartung JS (1996) Genetic relationships among strains of *Xanthomonas fragariae* based on random amplified polymorphic DNA PCR, repetitive extragenic palindromic PCR, and enterobacterial repetitive intergenic consensus PCR data and generation of multiplexed PCR primers useful for the identification of this phytopathogen. *Applied and Environmental Microbiology* **62**, 3121–3127.
- Rat B (1993) *Xanthomonas fragariae*: causal agent of angular leaf spot of strawberry. In: *Xanthomonas* (Ed. Swings, JG & Civerolo, EL), pp. 69–70. Chapman & Hall, London (GB).
- Roberts PD, Jones JB, Chandler CK, Stall RE & Berger RD (1996) Survival of *Xanthomonas fragariae* on strawberry in summer nurseries in Florida detected by specific primers and nested polymerase chain reaction. *Plant Disease* **80**, 1283–1288.
- Schaad NW, Cheong SS, Tamaki S, Hatziloukas E & Panapoulos NJ (1995) A combined biological and enzymatic amplification (Bio-PCR) technique to detect *Pseudomonas syringae* pv. *phaseolicola* in bean seed extracts. *Phytopathology* **85**, 243–248.
- Schaad NW, Jones JB & Lacy GH (2001) *Xanthomonas*. *Guide for Identification of Plant Pathogenic Bacteria*, 2nd edn., pp. 175–200. APS Press, St Paul (US).
- Schaad NW & Stall RE (1989) *Xanthomonas*. *Guide for Identification of Plant Pathogenic Bacteria*, pp. 81–94. APS Press, St Paul (US).
- Stefani E, Mazzucchi U & Calzolari A (1989) Evidence of endophytic movement of *Xanthomonas fragariae* in strawberry. *Phytopatologia Mediterranea* **28**, 147–149.
- Stoger A & Ruppitsch W (2004) A rapid and sensitive method for the detection of *Xanthomonas fragariae*, causal agent of angular leafspot disease in strawberry plants. *Journal of Microbiological Methods* **58**, 281–284.
- Swings J, Vauterin L & Kersters K (1993) The bacterium *Xanthomonas*. In: *Xanthomonas* (Ed. Swings, J & Civerolo, EL), pp. 138–144. Chapman & Hall, London (GB).
- van den Mooter M & Swings J (1990) Numerical analysis of 295 phenotypic features of 266 *Xanthomonas* strains and related strains and an improved taxonomy of the genus. *International Journal of Systematic Bacteriology* **40**, 348–369.
- Zimmermann C, Hinrich-Berger C, Moltmann E & Buchenhauer H (2004) Nested PCR for detection of *Xanthomonas fragariae* in symptomless strawberry plants. *Zeitschrift für Pflanzenkrankheiten und Pflanzenschutz* **111**, 39–51.

Załącznik 1 Przygotowanie próbki

Rośliny wykazujące objawy chorobowe

Wybrać rośliny z młodymi objawami (wodniste plamy na spodniej stronie liści). Części wybrane do badań zdezynfekować powierzchniowo 70% etanolem. Z każdego liścia z wodnistymi plamami pobrać w sposób aseptyczny 0,1 g tkanki. W przypadku gdy rośliny wykazują objawy ze strony

wiązek przewodzących należy usunąć korzenie oraz liście, ostrożnie wypłukać pod bieżącą wodą korony oraz ogonki liściowe, a następnie zdezynfekować je poprzez zanurzenie w 70% etanolu na 1 min, a następnie wypłukać każdą roślinę osobno trzy razy w sterylnej wodzie destylowanej. Pobrać z próbki po 0,1 g liści lub korony i ogonków liściowych i dodać 9 ml buforu PBS (Załącznik 7), umieścić w plastikowym woreczku z mocną siatką. Za pomocą młotka lub innego odpowiedniego przyrządu zmiażdżyć lekko materiał roślinny w plastikowym woreczku. Pozostawić wszystkie próbki na 15 min w temperaturze otoczenia w celu maceracji. Przenieść do 3 sterylnych probówek Eppendorfa odpowiednio po: 2 ml, 1 ml i 1 ml z każdej zmacerowanej próbki. Natychmiast (tego samego dnia), użyć 2 ml do izolacji, inokulacji odrębnej liści oraz testu IF.

Pozostałe 2 próbki przechować z 30% glicerolem (po 1 ml), odpowiednio w -20°C i -80°C . Test ELISA oraz PCR należy przeprowadzić tak szybko jak to możliwe używając zawiesinę z probówek przechowywanych w temp. -20°C .

Rośliny nie wykazujące objawów

Metoda 1

Z rozłogów usunąć liście oraz korzenie, zachowując ogonki liściowe. Pozostałe korony wypłukać pod bieżącą wodą, osuszyć i przeciąć wzdłuż na ćwiartki. Z 200 ćwiartek pobrać losowo próbkę wielkości 30 g. Każdą próbkę umieścić w 150 ml buforu PBS (Załącznik 7). Wytrząsać przez 30 min a uzyskany roztwór użyć bezpośrednio do badania lub po odwirowaniu przy prędkości 10 000 g przez 10 min. Otrzymany osad zawiesić w sterylnej wodzie destylowanej tak aby otrzymana objętość była równa 5 ml. Pozostawić w celu sedymentacji na 15 min, pobrać wierzchnią, klarowną warstwę i przygotować rozcieńczenia (1:10 i 1:100) w sterylnej wodzie destylowanej. Do analizy wykorzystać 2 ml, 1 ml zamrozić w -20°C i 1 ml w -80°C z 30% glicerolem.

Metoda 2

Rozłogi zdezynfekować powierzchniowo przez 2 min za pomocą 0,5% podchlorynu sodu + 0,02% Tween 20, a następnie wypłukać dwukrotnie w sterylnej wodzie destylowanej. Z korony i ogonków liściowych każdej rośliny pobrać małe krążki tkanki o średnicy około 0,3–0,5 cm, wypłukać w wodzie bieżącej, a następnie zmacerować i miażdżyć je w 10 mM buforze MOPS pH 7.3 przez 15–30 min w temperaturze otoczenia.

Załącznik 2 Szybkie testy przesiewowe

ELISA

Użyć 2 ml próbki świeżo przygotowanej lub zamrożonej w -20°C . W wyniku przeprowadzonych przez 10 laboratoriów badań porównawczych zvalidowano dwa protokoły do testu ELISA z przeciwciałami poliklonalnymi dostępnymi w handlu (Załącznik 8). Na każdej płytce użyć czystej kultury *X. fragariae* jako kontroli pozytywnej oraz szczepu nie będącego *X. fragariae* jako kontroli negatywnej. Z powodu częstych reakcji krzyżowych z przeciwciałami poliklonalnymi należy jako kontroli użyć zdrowych roślin. Dla każdej nowej partii przeciwciał należałoby ustalić miano.

Pośredni test ELISA

Zmieszać 210 μl każdej próbki z 210 μl buforu powlekającego pH 9,6 (Załącznik 7). Dodać po 200 μl tej mieszaniny do 2 studzienek płytki do testu ELISA (Nunc-Polysorp lub równoważna). W buforze PBS przygotować zawiesinę kontroli pozytywnej w ilości 10^9 kom./ml (Załącznik 7). Zmieszać 210 μl tej zawiesiny z 210 μl buforu powlekającego, a następnie wypełnić dwie studzienki.

Przygotować zawiesinę kontroli negatywnej bakterii o gęstości 10^9 kom./ml, wymieszać w proporcji 1:1 z buforem powlekającym, a następnie wypełnić dwie następne studzienki. Zmiażdżyć 0,01 g materiału roślinnego (liść lub korona) truskawki (*X. fragariae*- wolna) w 0,9 ml PBS (Załącznik 7) i dodać 0,9 ml buforu powlekającego (Załącznik 7). Tak przygotowany materiał użyć jako kontrolę negatywną dla materiału roślinnego i wypełnić dwie kolejne studzienki. Owinąć ściśle płytkę za pomocą przylegającej folii lub umieścić w plastikowym pudełku z niewielką ilością wilgotnego papieru. Inkubować płytkę przez noc w temp. 4°C.

Płytkę płukać trzykrotnie buforem PBS rozcieńczonym w $\frac{1}{2}$ + 0,05% Tween 20 (Załącznik 7). Wypełnić studzienki płytki buforem $\frac{1}{2}$ PBS +0.05% Tween 20, odwrócić płytkę w celu usunięcia buforu. Powtórzyć czynność dwa razy. Położyć płytkę na ręczniku papierowym aby wyschła. Dodać po 200 μ l buforu blokującego (PBS +1% bovine serum albumin (BSA), lub mleko odtłuszczone w proszku) do każdej studzienki testu. Opakować płytkę jak opisano wcześniej i inkubować w 37°C przez 1 h. Płukać płytkę jak wyżej. Przygotować przeciwciała *X. fragariae* w odpowiednim rozcieńczeniu w PBS (Załącznik 7) i dodać po 200 μ l do każdej studzienki. Opakować płytkę jak poprzednio i inkubować w temp. 37°C przez 2 h. Płukać płytkę jak wyżej. Przygotować koniugat przeciwciał-enzym w odpowiednim rozcieńczeniu w buforze PBS +0.2% BSA (Załącznik 7) i dodać po 200 μ l do każdej studzienki testu. Opakować płytkę jak wyżej i inkubować w temp. 37°C przez 1 h. Płukać płytkę cztery razy. Przygotować substrat bezpośrednio przed użyciem. Dodać p-nitrofenylofosfat w ilości 1 mg/ml do buforu substratowego pH 9,8 (Załącznik 7). Dodać po 200 μ l przygotowanego substratu do każdej studzienki testu. Inkubować w ciemności w temperaturze otoczenia przez 15, 30 i 60 min. Odczytać absorbancję przy 405 nm.

DAS-ELISA

Przygotować odpowiednie rozcieńczenie przeciwciał w buforze powlekającym o pH 9,6 (Załącznik 1). Nanieść po 200 μ l do każdej studzienki z dwóch płytek. Inkubować przez 4 h w temp. 37°C. Płukać trzykrotnie studzienki za pomocą buforu $\frac{1}{2}$ PBS (Załącznik 7) +0.05% Tween 20. Dodać po 200 μ l każdej próbki do 2 studzienek każdej płytki. Nanieść także na każdej płytce po dwie studzienki po 200 μ l kontroli pozytywnej i negatywnej, jak to opisano w przypadku ELISA pośredniej. Inkubować w temp. 4°C. przez 16 h. Płukać trzykrotnie studzienki za pomocą buforu $\frac{1}{2}$ PBS (Załącznik 7)+0.05% Tween 20. Inkubować przez 1 h w temp. 37°C, płukać trzykrotnie jak poprzednio. Przygotować odpowiednie rozcieńczenie koniugatu w PBS (Załącznik 7) zawierającym 0.2% BSA i nanieść po 200 μ l do każdej studzienki. Inkubować w temp. 37°C przez 3 h. Płukać studzienki cztery razy buforem $\frac{1}{2}$ PBS +0.05% Tween 20. Przygotować substrat bezpośrednio przed użyciem. Rozpuścić p-nitrofenylofosfat w ilości 1 mg/ml w buforze substratowym pH 9,8 (Załącznik 7). Dodać 200 μ l przygotowanego substratu do każdej studzienki. Inkubować w ciemności w temp. otoczenia przez 15, 30 i 60 min. Odczytać absorbancję przy 405 nm.

Interpretacja wyników testu ELISA

Test ELISA jest negatywny gdy średnia absorbancja dla próbki odczytana z dwóch studzienek jest < niż 2x średnia absorbancja studzienek z kontrolą negatywną. Pod warunkiem, że absorbancja dla kontroli pozytywnej jest powyżej 1.0 po 60 min inkubacji i jest większa niż podwojona absorbancja uzyskana z negatywnych próbek.

Test ELISA jest pozytywny gdy średnia absorbancja dla próbki odczytana z dwóch studzienek jest > niż 2x średnia absorbancja studzienek z kontrolą negatywną. Pod warunkiem, że 2x średnia absorbancja dla wszystkich kontroli negatywnych jest niższa niż dla kontroli pozytywnej.

Negatywny odczyt ELISA dla kontroli pozytywnej wskazuje, że test został przeprowadzony niepoprawnie i/lub odczynniki zostały źle przygotowane. Pozytywny odczyt ELISA dla kontroli negatywnej wskazuje, że ma miejsce kontaminacja lub nie specyficzne wiązanie przeciwciał. W takim przypadku należy powtórzyć ten test lub wykonać inny test oparty na innej zasadzie biologicznej.

Immunofluorescencja

Zgodnie ze standardem opisanym w EU (1998) należy użyć przeciwciał ze zwalidowanego źródła. Zwalidowane zostały dwa rodzaje przeciwciał dostępnych w handlu (Załącznik 8) wykorzystujące koniugat FITC.

Na oczka szkiełek IF nanieść próbki nie rozcieńczone oraz rozcieńczenia: 1:10, 1:100 i 1:1000 w PBS (Załącznik 7). Dla każdej próbki przygotować jedno szkiełko IF. Przygotować kontrole pozytywne o gęstości 10^6 kom./ ml zawiesiny czystej kultury szczepu referencyjnego *X. fragariae* w PBS oraz kontrole negatywne (zdrowe rośliny kontrolne i inne bakterie). Włączyć kontrole negatywne buforu z przeciwciałami i koniugatem, oraz z samym koniugatem. Wysuszyć na powietrzu i utrwalić poprzez opalenie lub w absolutnym 95% etanolu. Do czasu wykorzystania przechowywać szkiełka w temperaturze -20°C . Przeciwciała użyć w zalecanej rozcieńczeniu w PBS (Załącznik 7). W celu wykrycia reakcji krzyżowych z innymi bakteriami należy użyć dwa rozcieńczenia przeciwciał. Nanieść odpowiednią ilość przeciwciał na oczko szkiełka. Inkubować szkiełka w wilgotnej komorze przez 30 min w temperaturze otoczenia. Strzepnąć krople ze szkiełka i spłukać szkiełko buforem PBS. Płukać szkiełka w tym samym buforze przez 10 min. Ostrożnie usunąć nadmiar wilgoci. Rozcieńczyć odpowiednio koniugat FITC w PBS (Załącznik 7). Na oczka szkiełka do testu IF nanieść odpowiednią ilość rozcieńczonego koniugatu i inkubować w wilgotnej komorze 30 min w temperaturze otoczenia. Powtórzyć płukanie. Aby zapobiec wyświeceniu na każde oczko nanieść 0,1 M bufor fosforanowo-glicerynowy i przykryć szkiełkiem nakrywkowym. Obserwować szkiełka pod olejkim immersyjnym przy powiększeniu 500–1000x, oglądać dwie średnice w prawym rogu i obwód wokół oczka. Policzyc komórki, które wykazują fluorescencję i mają podobny kształt do komórek szczepu referencyjnego *X. fragariae* jak to opisano w EU (1998).

Interpretacja wyników testu IF

Test jest negatywny jeśli w kontroli pozytywnej są obserwowane zielone fluoryzujące komórki o typowej morfologii dla *X. fragariae*, ale nie są one widoczne w badanych próbkach.

Test jest pozytywny jeśli zielone fluoryzujące komórki o typowej morfologii są obserwowane w kontroli pozytywnej i badanej próbce, ale nie są one widoczne w kontroli negatywnej. Ponieważ ilość 10^3 komórek na ml jest uznana za limit rzeczywistej czułości testu IF, test IF jest uznany za pozytywny dla próbek z ilością $> 10^3$ komórek na ml. Dla próbek z ilością $< 10^3$ komórek na ml, wynik testu IF może być uznany za wątpliwy. W takim przypadku należy wykonać dalsze testy lub pobrać nową próbkę. Próbki, które w porównaniu z kontrolą pozytywną posiadają dużą ilość niecałkowicie lub słabo wybarwionych komórek, wymagają dalszego badania. Test powinien być oparty na innej zasadzie biologicznej, lub należy powtórzyć test IF stosując inne rozcieńczenie przeciwciał lub osadu lub zastosować przeciwciała pochodzące z innego źródła.

PCR

Test PCR wykonać zgodnie z protokołem używając zwalidowanych odczynników. Opracowana została metoda nested PCR w dwóch probówkach, ale jeszcze nie został on zwalidowany (Zimmerman *et al.*, 2004). Nested PCR należy ostrożnie stosować odkąd wzrost czułości może spowodować wystąpienie wyników fałszywie pozytywnych. Należy zwrócić szczególną uwagę aby uniknąć kontaminacji próbek poszukiwanym DNA. Jako kontrolę pozytywną użyć zawiesinę próbki truskawek, która dała negatywne wyniki z zastosowaniem kilku technik, do której dodano 10^4 i 10^6 kom./ml oszczepu referencyjnego *X. fragariae*, oraz zawiesinę 10^4 kom. bakterii/ml. Kontrole pozytywne należy przygotować osobno. Jako kontroli negatywnych użyć ekstrakt, który wcześniej dał wynik negatywny dla *X. fragariae*, oraz próbkę ultra czystej wody. Wykonać ekstrakcję DNA dla kontroli pozytywnej i negatywnej a także dla próbek, włączyć także kontrolę negatywną po ekstrakcji.

Protokół dla ekstrakcji DNA z próbek roślin i protokół dla amplifikacji opracowany przez Pooler, Ritchie i Hartung (1996), został zwalidowany w ramach badań porównawczych. Dostępne są w handlu inne zestawy do ekstrakcji DNA, np: RED Extract-N-Amp Plant PCR-Kit (Sigma) (Stoger i

Ruppitsch, 2004) oraz inne startery PCR (Roberts *et al.*, 1996), ale nie zostały one zwalidowane.

Protokół ekstrakcji DNA z użyciem zestawu: Qiagen Dneasy Plant Kit

Ekstrakcja DNA zawsze powinna być przeprowadzona przed amplifikacją. Najlepsze wyniki we wstępnych testach dla The Qiagen Dneasy Plant dał zmodyfikowany kit, z ekstrakcji MLO DNA opracowany przez R. Martin, USDA/ARS, Corvallis (USA).

Pobrać 250 µl zamrożonej próbki. Zawsze włączać do badań jako kontrolę negatywną zdrowy materiał roślinny truskawki zawieszony w buforze PBS, a czystą kulturę *X. fragariae* jako kontrolę pozytywną dla ekstrakcji i amplifikacji. Dodać 250 µl buforu CTAB do ekstrakcji oraz 4 µl RNA-zy A (dostarczanej przez Qiagen w stężeniu 100 mg/ml). Odwrócić delikatnie 5 razy i inkubować w temp. 65°C przez 10 min mieszając sporadycznie poprzez odwracanie. Dodać 200 µl buforu AP2 (dostarczony przez Qiagen) i delikatnie odwracać 5 razy. Inkubować w lodzie przez 5 min. Przenieść zawartość próbki do kolumny QIAshredder (purpurowa) poprzez zlanie. Odwirować przy dużej prędkości przez 5 min. Jeśli to konieczne powtórzyć wirowanie przez 5 min. Przenieść 450 µl zawiesiny do nowej 1,5-ml próbki, uważać aby nie przenieść osadu. Do nowej próbki zawierającej supernatant, dodać 675 µl buforu AP3/E dostarczonego przez Qiagen. Wymieszać poprzez 5-krotne delikatne odwracanie. Przenieść 650 µl do kolumny Qiaamp (biała) umieścić w 2-ml próbce zbiorczej. Odwirować przez 1 min. z prędkością 10 000 obrotów/min. Odrzucić poprzez zlanie i powtórzyć wirowanie. Jeśli to konieczne powtórzyć trzeci raz. Usunąć próbkę zbiorczą i przenieść kolumnę do nowej próbki zbiorczej. Płukać kolumnę dwukrotnie za pomocą 500 µl buforu AW- Qiagen. Dodać pierwsze 500 µl i odwirować przez 1 min przy prędkości 10 000 obr./min. Odrzucić poprzez zlanie. Dodać drugie 500 µl i wirować przez 1 min. przy prędkości 14 000 obr./min. Aby uzyskać DNA, przenieść kolumnę do nowej 1,5-ml próbki. Dodać 100 µl 10 mM Tris-HCl o pH 9 podgrzać do 65°C. Wirować przez 1 min. przy 10 000 obr./min. Dodać dodatkowo 100 µl Tris-HCl i powtórzyć wirowanie. Za pomocą buforu TE, otrzymać zawiesinę DNA o całkowitej objętości 300 µl. Dodać 200 µl 5M octanu amonu i 1 ml etanolu absolutnego. Dobrze wymieszać. Inkubować przez 1 h lub przez noc w temp. -20°C. Po inkubacji wirować przez 10 min. przy 14 000 obr./min.

Usunąć supernatant zatrzymując osad. Dodać do osadu 1 ml czystego etanolu i wirować przez 5 min. przy 14 000 obr./min. Usunąć supernatant zatrzymując osad. Dodać 500 µl 80% etanolu i wirować przez 5 min przy 14 000 obr./min. Usunąć supernatant zatrzymując osad. Odwrócić próbki i pozostawić do wyschnięcia w temperaturze otoczenia. Całkowicie wysuszony osad zawiesić w 50 µl sterylnej wody destylowanej.

Amplifikacja poprzez multiplex PCR

Protokół ten dał najlepsze rezultaty we wstępnych testach i został zwalidowany w badaniach porównawczych. Przygotować następujący master mix dla każdej próbki: 2,5 µl buforu Perkin Elmer (z 15 mM MgCl₂); 5,0 µl dNTP (1 mM); 2,0 µl każdego startera (5 mM) w sumie 6 starterów; 0,5 µl Taq polimerazy; 5,0 µl DNA próbki. Całkowita objętość 25,0 µl. Używać trzech zestawów starterów: Pooler, Richie i Hartung (1996):

241 A-5'-GCC CGA CGC GAG TTG AATC-3'
241 B-5'-GCC CGA CGC GCT ACA GAC TC-3'
245 A-5'-CGC GTG CCA GTG GAG ATC C-3'
245 B-5'-CGC GTG CCA GAA CTA GCA G-3'
295 A-5'-CGT TCC TGG CCG ATT AAT AG-3'
295 B-5'-CGC GTT CCT GCG TTT TTT CG-3'

Wykonać PCR następująco: 95°C przez 15 min, 35 cykli w 95 °C przez 1 min, 57 °C przez 1 min, 72 °C przez 1 min, na koniec 72 °C przez 7 min.

Przygotować 1,5% żel agarozowy w buforze 0,5 x TAE. Umieścić kroplę 3-µl buforu obciążającego na parafilmie, wymieszać z 20 µl produktu PCR poprzez delikatne wciągnięcie do końcówki pipety przez naniesieniem. Wypełnić studzienki żelu włączając kontrolę pozytywną i

negatywną. Do pierwszej studzienki żelu wprowadzić marker DNA 100 pz. Rozwijać żel przez 20 min przy napięciu 120 V (taca średniej wielkości: 15 x 10 cm) lub 40 min przy 160 V (taca duża lub aparat do elektroforezy: 15 x 25 cm). Moczyć żel w roztworze bromku etydyny przez 20 min. Obserwować zamplifikowane fragmenty DNA w transiluminatorze UV. Obserwować specyficzne amplikony o wielkości: 300, 550 i 615 pz, jak to opisali: Pooler, Ritchie i Hartung (1996). Prążek dla 300 pz zwykle jest obecny w przypadku porażenia roślin przez *X. fragariae* a pozostałe prążki (550 i 615 pz) pojawiają się sporadycznie.

Interpretacja wyników PCR

Test PCR jest negatywny jeśli dla badanej próbki amplikony *X. fragariae* nie mają oczekiwanej wielkości lub nie ma żadnych amplikonów, a produkt jest obecny dla wszystkich próbek będących kontrolami pozytywnymi.

Test PCR jest pozytywny jeśli zostanie wykryty amplikon o oczekiwanej wielkości specyficzny dla *X. fragariae*, pod warunkiem, że nie jest amplifikowany w żadnej z próbek będących kontrolą negatywną. Wiarygodne potwierdzenie pozytywnego wyniku można otrzymać poprzez powtórzenie testu. Obecność inhibitorów reakcji PCR należy podejrzewać jeżeli oczekiwany amplikon otrzymamy z próbki kontroli pozytywnej zawierającej zawiesinę *X. fragariae* w wodzie, a dla próbki kontroli pozytywnej zawierającej zawiesinę *X. fragariae* w ekstrakcji uzyskamy wynik negatywny. W takim przypadku zaleca się powtórzenie amplifikacji dla rozcieńczeń ekstraktu 1:10, 1:100 i 1:1000 lub powtórzenie ekstrakcji DNA.

Załącznik 3 Izolacja

Metoda 1

Dla każdej próbki zmiażdżonej w buforze PBS (Załącznik 7) należy przygotować rozcieńczenia: 1:10, 1:100 i 1:1000. Przygotowane rozcieńczenia 1:10, 1:100 i 1:1000 posiać na płytki z podłożem Wilbrink N oraz YPGA (Załącznik 7). Na osobną płytkę każdego podłoża nanieść 50 µl rozcieńczonych i nie rozcieńczonych próbek. Dla każdej próbki użyć po 4 płytki każdego z podłoży. Posiew rozpocząć od rozcieńczenia 1:1000 i kontynuować aż do próbek nie rozcieńczonych. Przy użyciu sterylnych ez, delikatnie rozcierać próbkę na powierzchni podłoża poprzez trzykrotne wykonanie pasm lub alternatywnie użyć szklanej głaszczki wysterylizowanej poprzez opalenie w płomieniu. Można również użyć podłoża SPA dla wybrednych bakterii chociaż nie zostało ono zwalidowane w badaniach porównawczych (Hayward, 1960). W celu kontroli jakości podłoża oraz dla porównania cech charakterystycznych kultur bakterii należy posiać zawiesiny 10^4 , 10^5 oraz 10^6 kom./ml szczepu odniesienia *X. fragariae*. Płytki inkubować w temp. 25°C przez 7 dni, ale należy zaznaczyć kolonie pojawiające się po 2-3 dniach ponieważ one nie będą koloniami *X. fragariae*. Ostateczny odczyt należy przeprowadzić po 5-7 dniach inkubacji w temp. 25°C. Kolonie *X. fragariae* na podłożu Wilbrink N są na początku białe, a następnie bladożółte, okrągłe lekko wypukłe, gładkie i śluzowate i pojawiają się po 4-6 dniach. Na podłożu YPGA, kolonie są podobne pod względem morfologii, ale mają one bardziej intensywne żółte zabarwienie. Dla każdej próbki uzyskać czystą kulturę dla każdej pojedynczej podejrzanej kolonii (z każdego z dwóch podłoży) poprzez posiew na podłożu Wilbrink-N zawiesiny koloni charakterystycznych dla *Xanthomonas*. Nie analizować żółtych kolonii które pojawiły się po 2-3 dniach ponieważ nie są to kolonie *X. fragariae*. Podejrzane kolonie *X. fragariae* można potwierdzić metodami przedstawionymi w części – Potwierdzenie.

Metoda 2

Z podejrzanych o *Xanthomonas fragariae* czystych i nie zgniłych liści wyciąć fragmenty wykazujące objawy chorobowe (nieregularne, wodniste plamy na liściach), jeśli to możliwe w ilości 25 typowych plamistości. Pobrane fragmenty liści umieścić w jednorazowych plastikowych

pojemnikach zawierających 50 ml wody wodociągowej i 5 kropli (5 x 10 µl) Tween-20. Mieszać delikatnie fragmenty liści w płynie i usunąć pęcherzyki powietrza oraz nieczystości jeśli takie się pojawiają. Inkubować przez 10 minut. Wymieszać i opłukać ponownie. Usunąć płyn po płukaniu (spokojnie). Powtórzyć trzykrotnie z użyciem czystej wody demineralizowanej. Fragmenty liści osuszyć za pomocą bibuły. Umieścić fragmenty liści w jednorazowym pojemniku zawierającym 35 ml alkoholu (70%), upewniając się, że wszystkie są całkowicie w nim zanurzone. Po 5 s zamieszać i usunąć fragmenty liści. Bezzwłocznie osuszyć fragmenty liści umieszczając je na innej suchej bibule aby umożliwić całkowite odparowanie alkoholu. Pociąć fragmenty liści na bardzo małe kawałki (1–4 mm²) i umieścić je w probówce zawierającej 5 ml 0,01 M PBS. Oznakować probówkę numerem próbki. Mieszać i inkubować przez 30 min w temperaturze pokojowej w celu ekstrakcji bakterii z tkanki roślinnej. Przygotować rozcieńczenie ekstraktu 1:100 w buforze 0,01 M PB. Posiać ekstrakt na podłoże odżywcze jak w metodzie 1.

Ekstrakt można użyć również w metodzie IF i PCR. W tym przypadku z nie rozcieńczonego oraz rozcieńczonego 1:100 ekstraktu nanieść 150 µl na 10-cio oczkowe szkiełko do testu IF. Szkiełko wysuszyć, a komórki bakteryjne utrwalić na szkiełku poprzez opalenie w płomieniu. Do reakcji PCR przenieść do probówki typu Eppendorf 200 µl ekstraktu próbki. 1 ml ekstraktu przenieść do innej probówki typu Eppendorf, dodać 1 kroplę 5–10% glicerolu i przechowywać w temperaturze –20 lub –80 °C.

Załącznik 4 Test na liściach

Użyć młodych liści (7–14 dni), pochodzących z roślin odmian wrażliwych na *X. fragariae* (np. ‘Camarosa’, ‘Seascape’, ‘Selva’, ‘Korona’), wyhodowanych w warunkach szklarniowych, wolnych od *X. fragariae*. Jakość pobranych liści oraz ich wiek są istotne dla powodzenia testu. Dla każdej próbki usunąć w sposób aseptyczny 3–5 liści (każdy z 3 listkami) i natychmiast umieścić ogonki liściowe w szklanych probówkach (13 mm x 100 mm) zawierających wodę sterylną. W sposób aseptyczny odciąć nasadową część ogonków liściowych i pod bieżącą wodą umieścić ogonki liściowe w probówkach. Użyć zawiesinę szczepu referencyjnego *X. fragariae* o gęstości 10⁹ kom/ml jako kontrolę pozytywną oraz bufor PBS (Załącznik 7) jako kontrolę negatywną. Za pomocą strzykawki bez igły nastrzyknąć zawiesinę (3 ml plastikowa, jednorazowa B-D; wylot o średnicy 2 mm) w 4 miejscach na powierzchni każdego liścia (po dwa miejsca po każdej stronie żyły głównej liścia). Po upływie 1 godziny od inokulacji, po umożliwieniu wnikięcia inokulum, spłukać nadmiar inokulum za pomocą wody sterylnej. Umieścić liście w ich probówkach w statywie w plastikowych pudełkach (ze szklaną lub plastikową pokrywką), z wilgotnymi ręcznikami papierowymi na dnie pudełka w celu zapewnienia odpowiedniej wilgotności. Zainokulowane liście inkubować w temperaturze 18–20 °C przez 21 dni z 12 godzinnym okresem świetlnym zapewnionym przez standardowe lampy fluorescencyjne. W celu uniknięcia wyników fałszywie negatywnych warunki temperatury i oświetlenia stanowią punkty krytyczne. Zainokulowane liście nie powinny wykazywać widocznych uszkodzeń, a wodniste plamistości spowodowane wnikięciem inokulum powinny zniknąć w ciągu 24 godzin. Specyficzne objawy (takie jak: nieregularne ciemne plamistości) podobne do tych jakie można obserwować na naturalnie porażonych liściach powinny pojawić się po upływie kilku dni od inokulacji. Wymieniać wodę w probówkach co 2-3 dni lub inaczej jeśli to konieczne. Zapisywać objawy przez 21 dni w odstępach co 2 dni.

Załącznik 5 PCR jako inna metoda potwierdzająca

Dodać 5 µl zawiesiny próbki do 20 µl następującej mieszaniny reakcyjnej PCR (Roberts *et al.*, 1996): 5,65 µl H₂O; 2,5 µl 10 x bufor; 0,75 µl MgCl₂ (50 mM); 0,5 µl dNTPs (10 mM); 0,25 µl startera XF9 (100 pmol µl⁻¹); 0,25 µl startera XF11 (100 pmol µl⁻¹); 0,2 µl polimerazy *Taq*. Sekwencja starterów jest następująca:

XF9 5'-TGGGCCATGCCGGTGGAAGTGTGTGG-3'
XF11 5'-TACCCAGCCGTCGCAGACGACCGG-3'

Warunki amplifikacji są następujące: 95 °C 2 min; 40 cykli w 94 °C 30 s, 60 °C 30 s, 72 °C 1 min; 72 °C 10 min.

Przygotować żel agarozowy 1,5% w buforze 0,5 x TAE (Załącznik 7). Umieścić kroplę 3 µl buforu obciążającego (Załącznik 7) na parafilmie, przed naniesieniem na żel wymieszać delikatnie z 20 µl produktu PCR poprzez wprowadzenie do końcówki pipety i powrotne wypuszczenie. Napełnić kieszonki żelu włączając kontrolę pozytywną i negatywną. Dołączyć marker DNA o wielkości 100 pz w pierwszej kieszonce żelu. Rozwijać żel przez 20 min przy 100 V (średni aparat do elektroforezy: 15 x 10 cm). Zanurzyć żel w roztworze bromku etydydy na 20 minut. Wizualizacji amplifikowanych fragmentów DNA dokonać w świetle UV. Specyficzny fragment o wielkości 537 pz został opisany przez Roberts *et al.* (1996).

Interpretacja wyników PCR

Test PCR jest negatywny jeśli ampikon o oczekiwanej wielkości specyficznej dla *X. fragariae* nie zostanie wykryty w próbce poddanej badaniu, ale zostanie wykryty dla wszystkich próbek będących kontrolami pozytywnymi.

Test PCR jest pozytywny jeśli ampikon o oczekiwanej wielkości specyficznej dla *X. fragariae* zostanie wykryty, pod warunkiem, że nie nastąpiła amplifikacja żadnej z próbek będących kontrolami negatywnymi. W przypadku użycia skondensowanej zawiesiny może wystąpić zahamowanie reakcji PCR. W takim przypadku należy rozcieńczyć wyekstrahowane DNA w stosunku: 1:10, 1:100 lub 1:1000, a następnie przeprowadzić nową amplifikację lub wykonać nową ekstrakcję DNA z próbki.

Załącznik 6 Inne metody inokulacji

Przygotować w buforze 10 mM PBS (patrz Załącznik 7) zawiesinę podejrzaną 48-72 h kolonii wyhodowanych na podłożu Wilbrink- N o gęstości 10⁹ kom/ml. Wykonać inokulację roślin truskawki należących do jednej z wrażliwych odmian (np. 'Camarosa', 'Seascape', 'Selva', 'Korona', 'Pájaro') poprzez rozpylenie, za pomocą rozpylacza Sigma Preval lub podobnego, zawiesiny bakteryjnej na spodniej powierzchni blaszki liściowej po wcześniejszym zranieniu liści (poprzez nakłucia za pomocą igły). Dla każdej badanej kolonii użyć 5–10 liści.

Do inokulacji co najmniej jednej rośliny jako kontroli pozytywnej użyć zawiesiny szczepu odniesienia o gęstości 10⁹ kom/ml. W taki sam sposób przygotować kontrolę negatywną używając buforu PBS zamiast szczepu odniesienia. Rośliny będące kontrolą pozytywną i negatywną powinny być zainokulowane i utrzymywane osobno w taki sposób, aby wykluczyć wzajemną kontaminację. Utrzymywać rośliny w zamkniętym worku plastikowym przez 72 h zapewniając wysoką wilgotność, a następnie inkubować w temperaturze 20 °C przez 4 tygodnie w wilgotności 80–100%. W każdym tygodniu zapisywać objawy. Początkowymi objawami są wodniste uszkodzenia powstające na blaszce liściowej. Później uszkodzenia te stają się obumarłymi plamami, otoczone żółtą obwódką lub nekrozami brzegowymi. Następnie bakterie mogą być reizolowane jak to podano w Załączniku 3 i/lub identyfikowane za pomocą testu PCR, IF lub ELISA (Załącznik 2).

Test nadwrażliwości na liściach tytoniu (HR) może sugerować obecność genów *hrp*, choć daje również wynik pozytywny w stosunku do wielu innych bakterii patogenicznych dla roślin. Przygotować zawiesinę bakterii o gęstości 10⁹ kom/ml (OD = 1.0) i wykonać inokulację dorosłych liści tytoniu poprzez wstrzyknięcie zawiesiny w przestrzeń międzykomórkową za pomocą igły i strzykawki o rozmiarze 25. Do testu użyć roślin tytoniu odmiany: 'Samsun' lub 'Xanthi' z co najmniej 5-6 liśćmi. Całkowite zapadnięcie się po 24-48 h zainokulowanej tkanki jest uznane za wynik pozytywny testu. Większość szczepów *X. fragariae* daje reakcję pozytywną na liściach tytoniu, ale niektóre szczepy mogą dać reakcję negatywną, szczególnie jeśli były one przez jakiś czas przechowywane.

Załącznik 7 Bufory i podłoża

PBS (bufor fosforanowy 10 mM, pH 7,2): 8 g NaCl, 0,2 g KCl, 2,9 g Na₂HPO₄·12H₂O, 0,2 g KH₂PO₄, woda destylowana 1 l

Bufor węglanowy pH 9,6: 1,59 g Na₂CO₃, 2,93 g NaHCO₃, woda destylowana 1 l.

Bufor do płukania (PBS, pH 7,2–7,4 z dodatkiem 0,05% Tween 20): 8 g NaCl, 0,2 g KCl, 2,9 g Na₂HPO₄·12H₂O, 0,2 g KH₂PO₄, 500 µl Tween 20, woda destylowana 1 l.

Kolorymetryczny bufor substratowy dla fosfatazy alkalicznej: 97 ml dietanolaminy, rozpuścić w 800 ml wody destylowanej, ustalić pH 9,8 za pomocą stężonego HCl, uzupełnić wodą destylowaną do 1000 ml.

Bufor do ekstrakcji CTAB : 50 ml 1 M Tris-HCl, 50 ml 5 M EDTA, 40,9 g NaCl, 40,5 g PVP, 12,5 g CTAB, 500 ml wody destylowanej.

Bufor TE, pH 8,0: 0,1 ml 5 M EDTA pH 8; 0,5 ml 1 M Tris-HCl pH 8; woda destylowana 500 ml.

50X bufor TAE: 242 g Tris, 100 ml 0,5 M Na₂EDTA pH 8,0, 57,1 ml lodowatego kwasu octowego, uzupełnić wodą destylowaną do 1 l.

Bufor obciążający: 0,025 g błękitu bromofenolowego, 3 g glicerolu w H₂O, 10 ml wody destylowanej.

Podłoże Wilbrink-N (Koike, 1965; z dodatkiem azotu): 10 g sacharozy – Sigma S-8501; 5 g proteose peptone (L85 Oxoid); 0,5 g K₂HPO₄; 0,25 g MgSO₄·7H₂O; 0,25 g NaNO₃; 15 g agaru oczyszczonego (L28 Oxoid); 1 l wody destylowanej. Ustalić pH 7,0–7,2. Jeśli podejrzewa się obecność grzybów należy przygotować podłoże z dodatkiem cycloheximidu. Po autoklawowaniu dodać 0,25 g cycloheximidu na 1l (przygotować roztwór wyjściowy w ilości 2,5 g na 33,33 ml etanolu absolutnego i przechowywać w \square -20 °C).

Podłoże YPGA: 5 g wyciągu drożdżowego (L21 Oxoid); 5 g peptonu bakteriologicznego (L37 Oxoid); 10 g glukozy Sigma G-7520; 15 g agaru oczyszczonego (L28 Oxoid); woda destylowana 1l. Ustalić pH 7,0–7,2. Jeśli to konieczne należy przygotować podłoże z zawartością cycloheximidu, tak jak w przypadku podłoża Wilbrink-N.

Podłoże C (Dye, 1962) zmodyfikowane: 0,5 g NH₄H₂PO₄; 0,5g K₂HPO₄; 0,2g MgSO₄ 7H₂O; 5g NaCl; 1g wyciągu drożdżowego; 70 ml błękitu bromofenolowego (0.2%); 1l wody destylowanej. Ustalić pH o wartości 6,8.

Załącznik 8 Dostępny w handlu standaryzowany materiał odniesienia.

Jako kontrole pozytywne polecane są następujące izolaty bakterii *X. fragariae* :NCPBP 1469, NCPBP 1822, CFBP 2510. Szczepy *X. fragariae* są dostępne z następujących kolekcji: National Collection of Plant Pathogenic Bacteria (NCPBP), Central Science Laboratory, York (GB); Culture Collection of the Plant Protection Service (PD), Wageningen (NL); Collection Française de Bactéries Phytopathogènes (CFBP), INRA Station Phytobactériologie, Angers (FR). Autentyczność szczepów może być zagwarantowana tylko wówczas, gdy będą one zakupione z jednej ze wskazanych kolekcji kultur.

Przeciwciała poliklonalne dla *X. fragariae* polecane obecnie do stosowania w testach wykrywania i identyfikacji mogą być zakupione w: Adgen, Ayr (GB) (polecane do testu IF oraz DAS-ELISA); PRI, Wageningen (NL) (do testu IF) oraz Bioreba AG (CH) (do testu DAS-ELISA). Polecany obecnie zestaw do ekstrakcji DNA przed amplifikacją PCR pochodzi z Qiagen Dneasy Plant Kit (Qiagen, USA) oraz REDExtract-N-Amp Plant PCR-Kit (Sigma).

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