

Diagnostyka

Diagnostic

Clavibacter michiganensis* subsp. *insidiosus

Zakres

Standard opisuje protokół diagnostyczny dla *Clavibacter michiganensis* subsp. *insidiosus*.

Zatwierdzenie

Zatwierdzony jako Standard EPPO w 2010–09.

Wprowadzenie

Clavibacter michiganensis subsp. *insidiosus* jest rozpowszechnioną, przenoszoną przez nasiona chorobą *Medicago sativa* (lucerna). Została zgłoszona jako istotna bakteryjna choroba *Medicago sativa*, powodująca redukcję siły i wzrostu upraw i znacząco zmniejszająca plony. Patogen został zgłoszony w najbardziej znaczących, produkujących lucernę obszarach USA i Kanady w XX wieku. Mimo wcześniejszych zgłoszeń w regionie EPPO (Włochy, Litwa, Rumunia, Rosja oraz Wielka Brytania) wykrycia były sporadyczne i nie zgłaszane od 1980 roku. Dalsze szczegóły dotyczące rozmieszczenia geograficznego są prezentowane na mapie rozkładu EPPO (patrz <http://www.eppo.org>). *Medicago sativa* jest najbardziej znaczącym żywicielem, ale *Lotus corniculatus*, *Medicago falcate* (Lucerna sierpowata), *Medicago* spp., *Melilotus alba* (Nostrzyk biały),), *Onobrychis viciifolia* (Sparceta) oraz *Trifolium* sp. także zostały zgłoszone jako naturalni żywiciele (Bradbury, 1986). Wiele innych gatunków lucerny zostało zakwalifikowanych jako potencjalni żywiciele po inokulacji (Bradbury, 1986). Patogen może przetrwać do 10 lat w wysuszonych szczątkach roślin i nasionach (Cormack, 1961). Nie ma udokumentowanych dowodów odnośnie długości przetrwania bakterii w glebie.

Patogen może być obecny w partiach nasion zarówno jako zanieczyszczenie (na powierzchni nasion, w pyłe lub szczątkach roślin), jak i zakażenie wewnątrz nasion. Transmisja nasion wydaje się być niska i zanieczyszczone rośliny najczęściej produkują niskiej jakości nasiona. Zaraza może rozprzestrzenić się z rośliny na roślinę szczególnie poprzez wiatr przenoszący glebę i szczątki, wodę z irygacji lub maszyny do zbioru. Stwierdzono fakt przenoszenia bakterii przez nicienia *Ditylenchus dipsaci* oraz nasilenie infekcji w obecności *Meloidogyne hapla* (Hunt et al., 1971). Dalsze informacje dotyczące zasięgu żywicieli, rozmieszczenia geograficznego i biologii mogą zostać znalezione w arkuszu danych EPPO *C. michiganensis* subsp. *insidiosus* (EPPO/CABI, 1997). Procedura diagnostyczna dla

C. michiganensis subsp. *insidiosus* (Rys. 1 i 2) opisuje ekstrakcję z rośliny lub nasion, przypuszczalną diagnozę za pomocą szybkiego testu, izolację domniemanych kolonii bakteryjnych, identyfikację domniemanych izolatów i, kiedy celowe, określenie patogenności.

Tożsamość

Nazwa: *Clavibacter michiganensis* subsp. *insidiosus* (McCulloch) Davis et al.

Synonimy: *Corynebacterium insidiosum* (McCulloch) Jensen.,

Corynebacterium michiganense pv. *insidiosum* (McCulloch) Dye

& Kemp, *Aplanobacter insidiosum*, *Corynebacterium michiganense* subsp. *insidiosum* (McCulloch) Carlson & Vidaver.

Pozycja taksonomiczna: Procaryotae, Actinobacteria, Actinomycetales, Microbacteriaceae.

Rodzaj *Clavibacter* został zaprojektowany dla bakterii chorobotwórczych maczugowatych, których peptydoglikan ściany komórkowej zawiera kwas 2,4-dwuaminomasłowy jako dwuzasadowy aminokwas (Davis et al., 1984). Te ściśle tlenowe Gram-dodatnie pałeczki nie wytwarzają endospor. Zwykle obserwuje się układ komórek w kształcie V, Y i palisady.

Kod EPPO: CORBIN.

Kategoria fitosanitarna: EPPO lista A2 pozycja 49/EU Załącznik II/A2.

Wykrywanie

Objawy chorobowe

Ogólnie, *C. michiganensis* subsp. *insidiosus* powoduje zakażenia lucerny. Choroba może powodować więdnienie w suchych i ciepłych warunkach, najczęściej jednak objawy składają się tylko z zahamowania wzrostu i proliferacji pędów. Chloroza, redukcja rozmiaru i drobnienie listków są dość powszechne, podobnie jak marginalne, papierowe białoszare zmiany martwicze listków (ADAS, 1979). W niektórych odmianach system naczyniowy korzeni może być przebarwiony na żółto-brązowo. Wilgotne lub całobrzegie przebarwienia mogą pojawiać się w zewnętrznej korze przeciętych korzeni. Objawy więdnienia spowodowane przez *C. michiganensis* subsp. *insidiosus* mogą zostać pomyłone z innymi chorobami ogólnoustrojowymi lucerny spowodowanymi, na przykład, przez szczep *Verticillium albo-atrum*.

Wykrywanie w materiale roślinnym wykazującym objawy chorobowe innym niż nasiona

Ekstrakcja z roślin wykazujących objawy chorobowe

Więdzące lub skarłate rośliny powinny zostać wykorzenione, a górna część pnia i małe korzenie usunięte. Analiza laboratoryjna powinna zostać przeprowadzona tak szybko jak to możliwe (najlepiej w ciągu 72h). Próbkę przed analizą powinna być przechowywana w odpowiednich warunkach (np. unikać należy nadmiernych temperatur). Korzenie powinny zostać starannie umyte za pomocą wody

wodociągowej w celu usunięcia gleby i uniknięcia zanieczyszczenia przez roztocza w możliwie największym stopniu. Główne korzenie i podstawy łodyg powinny zostać przecięte poprzecznie za pomocą czystego, zdezynfekowanego ostrza i zbadane pod kątem obecności przebarwień naczyń. Tam, gdzie objawy są widoczne w przeciętych częściach, naskórek należy ostrożnie usunąć, a małe części symptomatycznych tkanek wyekstrahować i umieścić w małej objętości sterylnej wody destylowanej lub buforu fosforanowego. (50 mM PB; patrz Załącznik 1). Tkankę następnie rozdrabnia się za pomocą czystego i zdezynfekowanego skalpela w celu umożliwienia dyfuzji bakterii przez 5-10 min. Ta zawiesina powinna zostać użyta, najlepiej natychmiastowo, do izolacji (patrz poniżej), immunofluorescencji (patrz PM7/97), testu ELISA (patrz załącznik 2) lub PCR (patrz załącznik 3). Komercyjne przeciwciała są dostępne (np. Florilab, Neogen-Agden, Plant Research International). Jeśli konieczne, zawiesina może być przechowywana w lodówce przez okres do 24h. Przy dłuższym przechowywaniu zawiesina powinna być przechowywana poniżej minus 18°C z 10-30% glicerolem.

Metoda rozcieńczeń płytkowych

Oba podłoża King B oraz YPGA z dodatkiem 200 mg/ ml cykloheksymidu są odpowiednie do izolacji *C. michiganensis* subsp. *insidiosus* z chorych tkanek (patrz Załącznik 1). Z uwagi na to, że płytki mogą być porośnięte przez szybko rosnące saprofity, technika rozcieńczeń płytkowych jest najbardziej wiarygodna do izolacji (np. posiewanie w sektorach lub seryjne rozcieńczenia zawiesiny). Rozprowadzić lub rozsmarować zawiesinę i jej rozcieńczenia (1:10, 1:100) na powierzchni podłoża. Jako materiał odniesienia zastosować płytki z podłożem zainokulowane rozcieńczeniami zawiesiny referencyjnego izolatu *C. michiganensis* subsp. *insidiosus*. Płytki inkubować w temp. 24°C do 14 dni. Zignorować kolonie, które wyrosły w ciągu 72 godzin izolacji, bo izolacja bakterii trwa dłużej. Na ogół 2-3 mm kolonie *C. michiganensis* subsp. *insidiosus* pojawiają się w ciągu 4-5 dni. Kolonie te są początkowo jasnożółte, płaskie i częściowo śluzowate, okrągłe lub nieregularne. Z czasem, po dłuższej inkubacji kolonie stają się bardziej żółte, nieprzezroczyste i błyszczące. Wiele szczepów na określonych podłożach może wytwarzać charakterystyczny niebieski dyfundujący do podłoża pigment (indygo) (włącznie z YPGA i YDC). Domniemane kolonie powinny zostać oczyszczone przez pasażowanie na podłożu King B lub YPGA.

Testy molekularne

Znanych jest kilka testów molekularnych do identyfikacji czystych kultur *C. michiganensis* subsp. *insidiosus*. Jakkolwiek, żadna z metod ekstrakcji DNA nie została zwalidowana w odniesieniu do naturalnie porażonego materiału roślinnego. Dlatego metody te nie powinny być stosowane bez wcześniejszej walidacji.

Wykrywanie w materiale roślinnym bez objawów chorobowych innym niż nasiona

Ekstrakcja z roślin bez objawów chorobowych

W materiale bez objawów choroby, taki sam proces jaki opisano powyżej powinien być przeprowadzony przez wycięcie i zmacerowanie w wodzie sterylnej lub w buforze fosforanowym małych fragmentów bezobjawowej tkanki przewodzącej z korzenia głównego. Macerat powinien zostać użyty bezpośrednio do izolacji (patrz poniżej) lub immunofluorescencji (patrz PM 7/97). Optymalna wielkość próbki w celu testowania bezobjawowego porażenia i okres pobierania próbek nie zostały określone.

Rozcieńczenia płytkowe

Zobacz sposób opisany dla materiału z objawami choroby. Na roślinach nie wykazujących objawów chorobowych, prawdopodobieństwo powodzenia izolacji jest mniejsze niż w przypadku izolacji z roślin z objawami choroby.

Testy molekularne

Znanych jest kilka testów molekularnych do identyfikacji czystych kultur *C. michiganensis* subsp. *insidiosus*. Jakkolwiek, żadna z metod ekstrakcji DNA nie została zwalidowana w odniesieniu do naturalnie porażonego materiału roślinnego. Dlatego metody te nie powinny być stosowane bez wcześniejszej walidacji.

Wykrywanie w nasionach

Ekstrakcja

Standardowa wielkość próbki wynosi 5000 sztuk nasion. Próbkę powinna zostać podzielona na podpróbki po 1000 sztuk nasion każda. Każda podpróbka licząca 1000 sztuk nasion jest umieszczana w sterylnej zakręcaniej butelce lub w sterylnej plastikowej torebce do stomachera. Następnie do nasion dodawane jest około 10-20 ml sterylnej buforu fosforanowego do próbek (patrz Załącznik 1). Torebki lub butelki umieszcza się na wstrząsarce obrotowej na 72 godziny i wytrząsa przy 100-150 obrotach na minutę w temp. 5°C ($\pm 4^\circ\text{C}$). Okres ekstrakcji pozwala na wydobycie bakterii, lecz wystąpić może kontaminacja saprofitami. Należy zachować ostrożność podczas przechowywania torebek podczas moczenia nasion w trakcie inkubacji, pozwolić na wymianę powietrza bez rozlewania maceratu lub krzyżowej kontaminacji (odpowiedni statyw do torebek powinien być używany). Około 1-1,5 ml każdego ekstraktu umieszczonego w próbówce typu Eppendorf lub równoważnej sterylnej mikropróbówce, powinno być przetrzymywane jako materiał referencyjny w temperaturze w 5°C ($\pm 4^\circ\text{C}$) do 48 godzin. Alternatywnie w celu dłuższego przechowywania, ekstrakt może być zamrożony poniżej - 18°C po dodaniu 10-30% glicerolu. Pozostały ekstrakt może być użyty bezpośrednio do izolacji (patrz poniżej) lub immunofluorescencji (zobacz PM 7/97)

Rozcieńczenia płytkowe:

Podłoże King B z agarem z dodatkiem 200 mg cykloheksymidu może być używane rutynowo z dobrymi rezultatami w odniesieniu do ekstraktów z nasion (Nemeth et al., 1991). Niestety, zaobserwowano że izolacja z nasion jako test przesiewowy jest trudna, z uwagi na fakt przerastania podłoża przez bakterie saprofityczne włącznie z licznymi bakteriami Gram dodatnimi. Dlatego też często nie jest łatwe rozróżnienie na podstawie charakterystycznych cech fenotypowych bakterii *C. michiganensis* subsp. *insidiosus*. Nieselektywne lub pół selektywne podłoża są dostępne do dziś do izolacji *C. m.* subsp. *insidiosus* z nasion *Medicago sativa*. Zobacz proces opisany dla materiału roślinnego wykazującego objawy chorobowe.

Inne testy:

Do wykrywania *C. michiganensis* subsp. *insidiosus* z wykorzystaniem przeciwciał monoklonalnych do powlekania i poliklonalnych przeciwciał do wykrywania lub sztucznej kontaminacji nasion i czystych kultur zaprojektowano podwójną kanapkę przeciwciałową ELISA (Gooden & Ophel Keller, 2005). Test ten nie został jeszcze poddany walidacji na naturalnie zainfekowanych nasionach i nie powinien być używany bez wcześniejszej walidacji do wykrywania w nasionach. Przydatność monoklonalnych przeciwciał nie jest poznana, w konsekwencji czego test nie został całkowicie opisany.

Odnosnie testów PCR, testy próbne przeprowadzone przez Gooden & Ophel Keller (2005) i Caffier (wyniki niepublikowane) na sztucznie kontaminowanych nasionach wskazują że próg wykrywalności jest w najlepszym wypadku na poziomie 10^5 – 10^6 jednostek tworzących kolonie w 1 mililitrze zawiesiny z nasion. W zależności od wszystkich dostępnych starterów czułość zmienia się w zależności od warunków reakcji PCR. Dlatego więc istniejące dziś testy PCR nie powinny być używane bez wcześniejszej walidacji.

Identyfikacja

Z testów opisanych poniżej, do identyfikacji domniemanych kolonii powinny być zastosowane dwa testy oparte o różne zasady biologiczne.

Charakterystyka biochemiczna

Następujące fenotypowe cechy, które są powszechnie obecne lub nieobecne w *C. michiganensis* subsp. *insidiosus* powinny zostać wyznaczone zgodnie z metodami Dye & Kemp (1977). Niektóre szczepy *C. michiganensis* subsp. *insidiosus* mogą wytwarzać bardzo charakterystyczny, niebieski, dyfundujący barwnik na podłożu agarowym King B, ale nie zawsze w każdym przypadku. Charakterystyka biochemiczna powinna zostać sprawdzona, zgodnie z wytycznymi zawartymi w Tabeli 1.

Tabela 1. Charakterystyka biochemiczna dla *C. michiganensis* subsp. *insidiosus*

Barwienie Grama	+
O/F metabolizm glukozy	O
Katalaza	+
Oksydaza cytochromowa	-
Hydroliza eskuliny	+
Produkcja kwasu z mannozy	+
Produkcja kwasu z mannitolu	-
Produkcja kwasu z ramnozy	-
Produkcja kwasu z galaktozy	+
Produkcja kwasu z ksylozy	+
Produkcja kwasu z sorbitolu	-
Wykorzystywanie octanu sodu	-
Wykorzystywanie bursztynianu sodu	-
Wykorzystywanie mleczanu	-
Wzrost w 6% NaCl	-
Hydroliza skrobi ziemniaczanej	+
Wytwarzanie H ₂ S z peptonu	

- = wynik ujemny, + = wynik dodatni (z Vidaver & Starr, 1981; Lelliott & Stead, 1987; Bradbury, 1986).

Testy serologiczne:

Test IF

Dostępne w handlu przeciwciała (np. Florilab, Neogen-Agden, Plant Research International).
Test IF został opisany w PM 7/97.

Test ELISA

Dostępne w handlu przeciwciała (np. Florilab, Neogen-Agden, Plant Research International).
Test jest opisany w Załączniku 2.

Testy PCR:

Test PCR może być wykorzystywany do identyfikacji czystych kultur *C. michiganensis* subsp. *insidiosus*. Trzy różne konwencjonalne testy PCR opisano w Załączniku 3 (Samac *et al.*, 1998; Pastrik & Rainey, 1999; Borowicz, 2001). Dwa testy real-time PCR zostały opublikowane (Bach *et al.*, 2003; Marefat *et al.*, 2007). Są one opisane w Załączniku 4. W odniesieniu do testu Samac *et al.* (1998) i Pastrik & Rainey (1999) w oparciu o szczepy referencyjne i szczepy wyizolowane z nasion przeprowadzono międzylaboratoryjne badania porównawcze. Badania te wykazały, że test PCR może prowadzić do fałszywie pozytywnych wyników (Caffier, wyniki nie publikowane), w zależności od genotypowej zmienności i warunków amplifikacji. Dlatego też, zalecane jest aby każdy z testów był najpierw zaadaptowany i zwalidowany do warunków PCR obowiązujących w laboratorium (odczynniki, amplifikator) i co najmniej dwie pary starterów powinny być użyte do identyfikacji. Test PCR powinien być uznawany za pozytywny dla *C. michiganensis* subsp. *insidiosus*, jeżeli otrzyma się dwa pozytywne wyniki z różnymi zestawami starterów.

Genomowy “odcisk palca”

Domniemane izolaty identyfikowane jako *C. michiganensis* subsp. *insidiosus* mogą być charakteryzowane następnie za pomocą metody “odcisk palca” przez BOX-PCR. Na podstawie polimorfizmu w regionie 1 Kb wyodrębniono cztery wyraźne grupy (Louws *et al.*, 1998). Test został opisany w PM 7/100 w oparciu o test Rep-PCR do identyfikacji czystych kultur bakterii.

Profil kwasów tłuszczowych (FAP)

Test ten opisany został w Załączniku 5.

Test patogeniczności

W przypadku, gdy wymaga tego diagnoza test ten służy do potwierdzania pozytywnej identyfikacji *C. michiganensis* subsp. *insidiosus* wykonanej w oparciu o dwa inne testy oparte na różnych zasadach biologicznych. Test ten opisany został w Załączniku 6.

Metody do oznaczania szczepu

Genomowy odcisk palca i profil kwasów tłuszczowych bakterii mogą być wykorzystywane do charakterystyki szczepu.

Szczepy odniesienia

NCPPB 1109 (oznaczenie szczepu równoważnego: LMG 3663, CFBP2404, ICMP 2621).

Sprawozdawczość i dokumentacja

Wskazówki dotyczące raportowania i dokumentacji zawiera EPPO Standard PM7 / 77 (1)
Dokumentacja i raportowanie w diagnostyce.

Informacje dodatkowe

Dodatkowe informacje na temat organizmu mogą być uzyskane od:

J. Nemeth, Agricultural office directorate for plant protection and soil, Kodo d.1., 7634 Pécs, Hungary, nemeth.jozsef@baranya.ontsz.hu.

D. Caffier, Laboratoire National de la Protection des Végétaux / French National Laboratory for Plant Health, 7 rue Jean Dixme´ras, 49044 Angers Cedex 01, France, lnqv.sdqpv.dgal@agriculture.gouv.fr

Podziękowania

Protokół został napisany w oryginale przez:

D. Caffier, Laboratoire national de la protection des végétaux / National laboratory for plant health, 7 rue Jean Dixme´ras, 49044 Angers Cedex 01, France.

Materiały źródłowe

zachowana wersja oryginalna (przyp. tłum)

ADAS (1979) Agricultural Development and Advisory Service, Lucerne bacterial wilt, leaflet 651 Ministry of Agriculture and Fisheries.

Bach HJ, Jessen I, Schloter M & Munch JC (2003) A TaqMan-PCR protocol for quantification and differentiation of the pathogenic *Clavibacter michiganensis* subspecies. *Journal of Microbiological Methods* 52,85–91.

Bradbury JF (1986). Guide to plant pathogenic bacteria.

Borowicz BP (2001) Use of the DNA sequence of the intergenic spacer region between the 16S and 23S rRNA genes for the identification of *Clavibacter michiganensis* subsp. *insidiosus* at the molecular level. Bulletin OEPP. EPPO bulletin 31, 489–491.

Cormack MW (1961) Longevity of the bacterial wilt organism in alfalfa hay, pod debris, and seed. Phytopathology 5, 260–261.

Cormack MW, Peake RW & Downey RK (1957) Studies on methods and materials for testing alfalfa for resistance to bacterial wilt. Canadian Journal of Plant Science 37, 1–11.

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. and *Clavibacter xyli* subsp. *cynodontis* subsp. nov. International Journal of Systematic Bacteriology 34, 107–117.

Dickstein ER, Jones JB & Stead DE (2001) Automated techniques. In: Laboratory Guide for Identification of Plant Pathogenic Bacteria, 3rd edn (Eds Schaad N, Jones J & Chun W), pp. 343–355. APS, St Paul, USA

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

EPPO/CABI (1997) *Clavibacter michiganensis* subsp. *michiganensis*. In: Quarantine Pests for Europe, 2nd edn (Eds Smith IM, McNamara DG, Scott PR & Holderness M), pp. 977–980. CAB International, Wallingford (GB).

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

Gooden J & Ophel Keller K (2005). Development of a Bacterial Wilt Test to Facilitate the Export of Lucerne Seed. RIRDC Publication No W05/186, of plant pathogenic bacteria. Journal of Applied Bacteriology 72, 315–321.

Vauterin L & Vauterin P (1992) Computer-aided objective comparison of electrophoresis patterns for grouping and identification of microorganisms. European Journal of Microbiology 1, 37–41.

V'ichova' J & Kozova' Z (2004) The virulence of *Clavibacter michiganensis* subsp. *insidiosus* strains and test of alfalfa varieties for resistance to the wilt pathogen. Journal of Plant Protection Research 44, 147–154.

Vidaver A & Starr M (1981) Phytopathogenic coryneform and related bacteria. In: Phytopathogenic Bacteria, pp. 1879–1887. Springer Verlag, New-York, USA.

Weller SA, Aspin A & Stead DE (2000) Classification and identification of plant associated bacteria by fatty acid profiling. Bulletin OEPP. EPPO bulletin 30, 375–380.

Zhang S & Goodwin PH (1997) Rapid and sensitive detection of *Xanthomonas fragariae* by simple alkaline DNA extraction and the Polymerase Chain Reaction. Journal of Phytopathology 145, 267–270.

ZAŁĄCZNIKI

Załącznik 1 – Przygotowanie podłoży i buforów

Podłoża

Nutrient glucose agar		Yeast peptone glucose agar	
Difco nutrient agar	11,5 g	Difco yeast extract	2,5 g
D(+) glukoza	5,0 g	Difco bacto peptone	2,5 g
Woda destylowana	500 ml	D(+) glukoza	5,0 g
		Difco bacto agar	7,5 g
		Woda destylowana	500 ml

King's B podłoże (King <i>et al.</i>, 1954):		Yeast Dextrose Chalk agar (YDC)	
Proteose peptone N°3	10 g	Difco yeast extract	5,0 g
Gliceryna	5 ml	D-glukoza	10,0 g
K ₂ HPO ₄	0,75 g	Strącony węglan wapnia (CaCO ₃)	10,0 g

King's B podłoże (King <i>et al.</i>, 1954):		Yeast Dextrose Chalk agar (YDC)	
MgSO ₄ ·7H ₂ O	1,5 g	Oxoid agar no.3	6,0 g
Agar	7,5 g	Woda destylowana	500 ml
Woda destylowana	500 ml		

Doprowadzić pH do 7.0–7.2.

Przygotować 0,5 l podłoża w kolbie Erlenmayera o pojemności 1 l.

Rozpuścić składniki i sterylizować przez autoklawowanie w temp. 121°C przez 15 min.

Bufory

50 mM bufor fosforanowy (PB) o pH 7,0

Na ₂ HPO ₄	4,26 g
KH ₂ PO ₄	2,72 g
Woda destylowana	1 l

Rozpuścić składniki, sprawdzić pH i doprowadzić do pH 7,0, jeśli konieczne, sterylizować przez autoklawowanie w temp. 121°C przez 15 min.

50 mM bufor fosforanowy z Tween[®] (PB-T), pH 7,0

Dodać Tween[®] 20 do 50 mM buforu fosforanowego o pH 7,0 (zobacz wcześniej) do końcowego stężenia 0,2%.

Bufor węglanowy o pH = 9,6

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

Doprowadzić pH do 9,6 za pomocą HCl (objętość roztworu HCl wyznaczana jest doświadczalnie względem objętości wody destylowanej). Sterylizować przez autoklawowanie.

Bufor powlekający

Albumina wołowa	0,02 g
PB-T	10 ml

Doprowadzić pH do 7.4. Bufor ten nie powinien być autoklawowany. Przygotować bezpośrednio przed użyciem.

Bufor substratowy (dla alkalicznej fosfatazy)

Dietyloamina	97,0 ml
Woda destylowana	Dopełnić do 1,0 l

Doprowadzić pH do 9,8 za pomocą stężonego roztworu HCl (objętość roztworu HCl wyznaczana jest doświadczalnie względem objętości wody destylowanej). Sterylizować przez autoklawowanie.

Bezpośrednio przed użyciem przygotować roztwór paranitrofenylofosfatu (pNPP) o końcowym stężeniu 1 mg ml^{-1} .

Załącznik 2 – ELISA

Do ekstrakcji bakterii z próbek roślin lub kolonii, używać buforu zalecanego przez dostawcę zestawu. Zgodnie instrukcją do zestawu, test DAS ELISA lub test ACP ELISA mogą być zastosowane.

W przypadku testu ACP ELISA i kiedy braku protokołu dołączonego przez dostawcę, testy należy wykonać zgodnie następującą procedurą.

Dodać 200 μl każdej próbki w buforze węglanowym o $\text{pH} = 9,6$ (patrz załącznik 1) w celu opłszczenia płytek. Płytki inkubować w temperaturze $37 \text{ }^\circ\text{C}$ przez 4 godziny ($\pm 15 \text{ min}$), najlepiej w zamkniętym pudełku i wypłukać 3 razy po 5 min. ($\pm 1 \text{ min}$) w buforze PBS-T (patrz załącznik 1).

Dodać 200 μl odpowiednio rozcieńczonych specyficznych przeciwciał króliczych do każdej pustej studzienki płytki, inkubować w temperaturze $37 \text{ }^\circ\text{C}$ przez 4 godziny ($\pm 15 \text{ min}$), jak opisano powyżej i wypłukać jak powyżej.

Dodać 200 μl odpowiednio rozcieńczonego koniugatu koziego przeciw króliczym przeciwciałom sprzężonego z fosfatazą alkaliczną w buforze do koniugatu (patrz załącznik 1) do każdej pustej studzienki płytki, inkubować w temperaturze $37 \text{ }^\circ\text{C}$ przez 4 godziny jak wyżej ($\pm 15 \text{ min}$).

Przygotować roztwór o stężeniu 1 mg/ ml substratu alkalicznej fosfatazy (paranitrofenylofosforan) w buforze substratowym (patrz załącznik 1). Wypłukać płytki ELISA jak wyżej i dodać 200 μl substratu fosfatazy do każdej studzienki płytki, inkubować w temperaturze pokojowej, najlepiej bez dostępu bezpośredniego światła i odczytać przy długości fali 405 nm, najlepiej wtedy gdy kontrole pozytywne lub pozytywne próbki osiągną wartość OD pomiędzy 1,2 a 1,6.

Należy pamiętać, że badanie może być również wykonane z wykorzystaniem objętości 100 μl w każdej studzience, ale z niższą czułością wykrywania.

Próbki są dodatnie, gdy wartość ich OD jest co najmniej dwukrotnie wyższa niż wartości OD uzyskanego z roślin próbek kontroli negatywnej.

Załącznik – 3 Konwencjonalny PCR

Testy te zostały zwalidowane tylko w odniesieniu do czystych kultur i jeśli testy te są wykorzystywane do ekstraktów materiału roślinnego i kontroli muszą zostać dostosowane.

Po ekstrakcji /oczyszczeniu DNA z próbek, przenieś odpowiednią objętość próbki do probówek do PCR. Dodaj mieszaninę PCR do próbki zgodnie z opisem poniżej i wymieszaj delikatnie w końcówce pipety.

Wydajność amplifikacji może się różnić w zależności od zastosowanych polimeraz DNA, mieszaniny reakcyjnej (PCR master mix), $MgCl_2$, stężeń itp., a zatem test PCR powinien zostać zwalidowany w każdym laboratorium w przed włączeniem do rutynowego użytkowania.

W przypadku zastosowania termocyklerów innych niż opisane przez autorów modyfikacje podczas trwania cykli amplifikacji mogą być wymagane.

Wizualizacja ampikonów DNA w świetle UV po elektroforezie wymaga zastosowania odpowiednich wzorców masy i barwienia bromkiem etydyny.

We wszystkich przypadkach źródłem kwasu nukleinowego jest kolonia bakteryjna, do przygotowania mieszaniny reakcyjnej używana jest woda ultraczysta o czystości molekularnej (MGUPW).

(1) Przygotowanie próbek DNA.

Zawiesić pojedynczą kolonię z każdej wstępnej izolacji, w sterylnej probówce wirówkowej zawierającej 100 μ l sterylnej wody destylowanej. Pomocna jest alkaliczna liza komórek (Zhang i Goodwin, 1997). Dodać 50 μ l 0,25N NaOH do 100 μ l zawiesiny bakterii. Zworteksować. Zamknąć probówki i ogrzewać przez 6 min. w temperaturze 95 °C. Po ochłodzeniu dodać 50 μ l 0,25 N HCl. Zworteksować. Dodać 25 μ l 0,5 M Tris-HCl (pH 8,0) – Tween 20 (1% v / v). Zamknąć probówki i ogrzewać przez kolejne 6 min. w temp. 95 °C. Zwirować pulsacyjnie po ochłodzeniu na lodzie. Zamknięte probówki ogrzewać w temp. 95 ° C przez 12 min. w celu rozerwania komórek. Przenieść natychmiast ogrzewaną zawiesinę do topniejącego lodu (lub odpowiednika) na co najmniej 1 min. Odwirować po schłodzeniu.

(2) Przebieg testu PCR

(A) PCR test (Samac *et al.*, 1998).

1. Informacje ogólne

1.1 Startery oligonukleotydowe pochodzą z IS 1122, a 1.1 kbp- sekwencja o wielkości jest powtarzalna w genotypie *C. michiganensis* subsp. *insidiosus*.

1.2 Wielkość ampikonu DNA z *C. michiganensis* subsp. *insidiosus* wynosi 132 pz.

1.3 Oligonukleotydy:

Forward primer CIRS 1: 5'- TTC AAC CGC ACC CTC GCG AC - 3'

Reverse primer CIRS 2: 5'- CGT CAG CCC GTG GCT CGA GT - 3'

1.4 Eurogentec Goldstar Red DNA polymeraza (5 U/ul na przykład, ale Perkin Elmer ` AmpliTaq i 10x PCR i bufor również mogą być używane w tych samych stężeniach.

1.5 Termocykler: Applied Biosystems, Foster City, CA, US Perkin Elmer model 480 lub 9700.

1.6 Test został opracowany z wykorzystaniem 3 szczepów *C. michiganensis* subsp. *insidiosus* (szczepy 33114, 10253, Ci4). Należy zauważyć, że test ten pozwala wykryć, jedynie ilość produktu amplifikacji z *C. michiganensis* subsp. *sepedonicus* ale większa ilość produktu, powstaje, gdy matryca wzrasta 2000-krotnie. Jednak te IS1122 pochodne produktów z *C. michiganensis* subsp. *sepedonicus* nie hybrydują z 32P-znakowanym CIRS-3. Brak produktu amplifikacji obserwuje się dla innych testowanych podgatunków *C. michiganensis*: *michiganensis*, *nebraskensis* i *tessellarius*. Dalsze badania DNA z nie zainfekowanej lucerny i 39 innych bakterii, w tym *Agrobacterium tumefaciens*, *Agromyces ramosus*, *Arthrobacter ilicis*, *globiformis* A., *Auroebacterium testaceum*, *Bacillus cereus*, *B. subtilis*, *Brevibacterium casei*, *Clavibacter xyli cynodontis*, *Corynebacterium glutamicum*, *Curtobacterium flaccumfaciens* subsp. *betae*, *C. flaccumfaciens* subsp. *laccumfaciens*, *C. flaccumfaciens* subsp. *oortii*, *C. flaccumfaciens* subsp. *poinsettiae*, *Erwinia carotovora* subsp. *amylovora*, *E. carotovora* subsp. *carotovora*, *E. herbicola*, *E. stewartii*, *Escherichia coli*, *Microbacterium lacticum*, *Micrococcus luteus*, *Mycobacterium phlei*, *Pseudomonas aurantiaca*, *Ralstonia. solanacearum*, *Rathayibacter iranicus*, *R. rathayi*, *R. toxicus*, *R. tritici*, *Rhizobium phasioli*, *Rhodococcus fascians*, *m*, *Serratia marcescens* i *S. scabies* wykazały, że test był selektywny dla *C. michiganensis* subsp. *insidiosus*.

2. Metody

Warunki amplifikacji są następujące:

2.1 Całkowita standardowa objętość pojedynczej reakcji PCR wynosi 50,0 µl

2.2 Odpowiednia ilość wody do PCR, tak aby ostateczna objętość wynosiła 50 µl na próbkę.

2.3 5 µl 10x bufor PCR

2.4 1,5 uM MgCl₂

2.5 0,2 uM dNTPs

2.6 0,75 jednostki polimerazy Taq

2.7 1 uM starter forward

2.8 1 uM starter reverse

2.9 10 µl próbki DNA (roztwór powinien być świeży).

2.10 parametry PCR dla termocyklera Applied Biosystems Perkin Elmer model 480: 30 cykli (4 cykle 2 min, 26 cykli 60 s) w temperaturze 94 ° C (denaturacja DNA), 60 s 58 ° C (dołączanie starterów), 60 s (pierwszych 29 cykli), a następnie 5 min (ostatni cykl) 75 ° C (wydłużenie DNA) przetrzymywać w temperaturze 4 ° C.

Dla termocyklera Applied Biosystems PE 9700, następujący cykl może być używany (Caffier, wyniki niepublik.): 1 cykl 3 min 94 ° C, 35 cykli 40 s 94 ° C, 40 s 65 ° C, 40 s 72 ° C, 1 cykl 5 min 72 ° C, przetrzymywać w temperaturze 4 ° C. Praca z tym rodzajem termocyklera umożliwia przeprowadzenie tej amplifikacji i amplifikacji opisanej w części B niniejszego Załącznika w tym samym czasie na tym samym termocyklerze. Niemniej jednak protokół ten nie nadaje się do testu multiplex PCR.

3. Informacje dotyczące istotnych wymogów proceduralnych

3.1 Kontrole: w każdym przypadku przeprowadzania testu PCR następujące kontrole powinny być dołączone:

Istotne:

- Kontrola kontaminacji ("negatywna")
- Kontrola ("pozytywna") kontrola z referencyjnej kultury odniesienia *C. michiganensis* subsp. *insidiosus*.

Zalecane:

- Kontrola kontaminacji ekstrakcji wykonywana jest dla każdej partii badanych próbek. Polega ona na wykonaniu ekstrakcji kwasu nukleinowego (NA) przy użyciu znanych "ślepych" próbek, które nie zawierają docelowego NA (np. czysty bufor ekstrakcyjny)
- Kontrola inhibicji ekstrakcji stosowana do monitorowania współekstrakcji inhibitorów testu. Może ona polegać na testowaniu ekstrakcji NA testem PCR znanego badania w celu amplifikacji nie poszukiwanej specyficznej sekwencji (np. konserwatywny gospodarz genu lub uniwersalny gen ITS). Alternatywnie, jeśli są dostępne, syntetyczne kontrole wewnętrzne z kultury szczepu *C. michiganensis* subsp. *insidiosus*.

3.2 Interpretacja wyników: w celu odczytania wyników z testu PCR następujące kryteria powinny być stosowane:

- Test PCR będzie uważany za pozytywny, jeżeli wytwarza amplikon o wielkości 132 pz i pod warunkiem, że kontrole kontaminacji są negatywne
- Test PCR będzie uważany za negatywny, jeśli nie produkuje prążków lub nie wytwarza prążków o podobnej wielkości i pod warunkiem, że test i kontrole inhibicji ekstrakcji są pozytywne
- Badania powinny być powtarzane w przypadku uzyskania sprzecznych lub niejasnych wyników.

Słaby prążek o wielkości 132 pz może być wytwarzany przez kultury *C. michiganensis* subsp. *sepedonicus*. Aby sprawdzić, czy fragment nie pochodzi z *C. michiganensis* subsp. *insidiosus* można zastosować hybrydyzację zgodnie z Samac et al. (1998).

(B) PCR (Pastrik i Rainey, 1999).

1. Informacje ogólne

1.1 Startery oligonukleotydowe pochodzą z 16S-23S rRNA regionu międzygenowego.

1.2 Wielkość amplikonu z *C. michiganensis* subsp. *insidiosus* DNA 393 pz

1.3 Oligonukleotydy:

Starter Forward PSA-5: 5' - CCC TTT CCG TCG TCC CGG - 3'

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

1.4 Polimeraza DNA Taq (Life Technology, Niemcy)

1.5 termocyklera: Applied MJ Research PTC 200.

1.6 Test ten został opracowany z wykorzystaniem trzech szczepów *C. michiganensis* subsp. *insidiosus*. Przebadano inne podgatunki *C. michiganensis*: 7 szczepów *C. michiganensis* subsp. *sepedonicus*, 6 szczepów *C. michiganensis* subsp. *michiganensis*, 1 szczep *C. michiganensis* subsp. *tessellarius* i 1 szczep *C. michiganensis* subsp. *nebraskensis*. Podgatunki te dały prążki o różnych wielkościach, innych niż *C. michiganensis* subsp. *insidiosus* i innych niż *C. michiganensis* subsp. *nebraskensis*, który dał prążek, który był tej samej wielkości, ale jako szkodnik kukurydzy, *C. michiganensis* subsp. *nebraskensis* nie powinien być znaleziony na

lucernie. Badanie zostało również przeprowadzone na 5 szczepach *Ralstonia solanacearum*, 4 szczepach *Pectobacterium atrosepticum*, 4 szczepach *Pectobacterium carotovorum* subsp. *carotovorum*, 2 szczepach *Erwinia* sp., 2 szczepach *Erwinia rhapontici*, 2 szczepach *Pseudomonas syringae* pv. *atrofaciens*, 1 szczepie *Pseudomonas syringae* pv. *morsprunorum* i 1 szczep *Pseudomonas syringae* pv. *phaseolicola* i wykazał, że test był selektywny dla *C. michiganensis* subsp. *insidiosus* na lucernie.

2. Metody

2.1 Warunki amplifikacji są następujące: całkowita objętość pojedynczej reakcji PCR wynosi 25,0 µl, test można przeprowadzić o łącznej objętości 50 µl; w tym przypadku objętości wszystkich odczynników mogą zostać podwojone i odpowiednia ilość wody o jakości PCR dodana do końcowej całkowitej objętości wynoszącej 50 µl

2.2 Odpowiednia ilość wody do PCR, tak aby ostateczna objętość wynosiła 25 µl na próbówkę .

2.3 2,5 µl PCR bufor

2.4 1,5 µM MgCl₂

2.5 100µ M dNTPs

2.6 1 jednostka polimerazy Taq

2.7 0,2 µM startera forward

2.8 0,2 uM startera reverse

2.9 10 µl próbki DNA (roztwór powinien być świeży).

2.10 Parametry PCR termocyklera MJ Research PTC 200:

1 cykl 90 s 94 ° C, 30 cykli 30 s 94 ° C, 20 s 64 ° C, 45 s 72 ° C, 1 cykl 5 min w temperaturze 72 ° C. Trzymać w temp. 4 ° C. W termocyklerze Applied Biosystems PE 9700, kolejny cykl może być używany (Caffier, wyniki nieopublikowane.): 1 cykl 3 min 94 ° C, 35 cykli 40 s 94 ° C, 40 s 65 ° C, 40 s 72 ° C, 1 cykl 5 min 72 ° C, trzymać w temperaturze 4 ° C. Praca z tym rodzajem termocyklera umożliwia przeprowadzenie tej amplifikacji i amplifikacji opisanej w części A niniejszego Załącznika w tym samym czasie na tym samym termocyklerze. Niemniej jednak protokół ten nie nadaje się do testu multiplex PCR.

3. Informacje dotyczące istotnych wymogów proceduralnych

3.1 Kontrole: w każdym przypadku przeprowadzania testu PCR następujące kontrole powinny być dołączone:

Istotne:

- Kontrola kontaminacji ("negatywna")
- Kontrola ("pozytywna") kontrola z referencyjnej kultury odniesienia *C. michiganensis* subsp. *insidiosus*.

Zalecane:

- Kontrola kontaminacji ekstrakcji wykonywana jest dla każdej partii badanych próbek. Polega ona na wykonaniu ekstrakcji kwasu nukleinowego (NA) przy użyciu znanych "ślepych" próbek, które nie zawierają docelowego NA (np. czysty bufor ekstrakcyjny)
- Kontrola inhibicji ekstrakcji stosowana do monitorowania współekstrakcji inhibitorów testu. Może ona polegać na testowaniu ekstrakcji NA testem PCR znanego badania w celu amplifikacji nie poszukiwanej specyficznej sekwencji (np. konserwatywny gospodarz genu lub uniwersalny gen ITS). Alternatywnie, jeśli są dostępne, syntetyczne kontrole wewnętrzne z kultury szczepu *C. michiganensis* subsp. *insidiosus*.

3.2 Interpretacja wyników: w celu odczytania wyników z testu PCR następujące kryteria powinny być stosowane:

- Test PCR będzie uważany za pozytywny, jeżeli wytwarza amplikon o wielkości 132 pz i pod warunkiem, że kontrole kontaminacji są negatywne
- Test PCR będzie uważany za negatywny, jeśli nie produkuje prążków lub nie wytwarza prążków o podobnej wielkości i pod warunkiem, że test i kontrole inhibicji ekstrakcji są pozytywne
- Badania powinny być powtarzane w przypadku uzyskania sprzecznych lub niejasnych wyników.

(C) PCR test (Borowicz, 2001).

1. Informacje ogólne

1.1 Startery oligonukleotydowe pochodzą z 16S-23S rRNA regionu międzygenowego.

1.2 wielkość amplikonu z *C. michiganensis* subsp. *insidiosus* DNA 218 pz

1.3 Oligonukleotydy:

Starter forward CMI-III / BB1: 5' - GAG GGA CCG GAC CGC ATC TTT CGG GG - 3'

Starter reverse CMI-III / BB2: 5' - GAT TGA TTC GTT TCG WTC CCC CTA GA - 3'

1.4 Rekombinowana polimeraza DNA (Takara TaqTakara Shuzo Co, Kioto, Japonia).

1.5 Termocykler z Biometra Gettingen, Niemcy.

1.6 Do badań użyto następujących bakterii *C. michiganensis insidiosus*, *C. michiganensis* subsp. *michiganensis*, *C. michiganensis* subsp. *sepedonicus*, *Pseudomonas* sp. i *Pseudomonas syringae* pv. *pisi*. Bakterie te zostały uzyskane z Kolekcji Kultur Instytutu Ochrony Roślin w Poznaniu (PL).

2. Metody

2.1 Warunki amplifikacji są następujące: całkowita objętość pojedynczej reakcji PCR wynosi 20,0 µl i test można przeprowadzić o łącznej objętości 50 µl, w tym przypadku objętości wszystkich odczynników mogą być dostosowane i objętość wody klasy PCR dostosowana do końcowej całkowitej objętości 50 µl.

2.2 Odpowiednie objętość PCR jakości wody, tak aby ostateczna objętość wynosiła 20 µl na próbkę.

2.3 2 µl PCR bufor (bez Mg + + z Takara ShuzoCo)

2.4 1,2 µl 25 mM MgCl₂

2.5 1,6 µl 2,5 mM każdego dNTP

2.6 0,17 µl Takara Taq polimerazy DNA (5U/ul)

2.7 2 µl 5 pM/l) startera forward

2.8 2 µl 5 pM /l) startera reverse

2.9 2 µl DNA (roztwór powinien być świeży).

2.10 parametry PCR dla termocyklera: 34 cykle 60 s przy 95 °C, 60 s przy 65 °C, 1 cykl 2 min 72 °C, ostatnie wydłużenie przy 72 °C w czasie 10 min. Przetrzemywać w temperaturze 4 °C.

3. Informacje dotyczące istotnych wymogów proceduralnych

3.1 Kontrole: w każdym przypadku przeprowadzania testu PCR następujące kontrole powinny być dołączone:

Istotne:

- Kontrola kontaminacji ("negatywna")
- Kontrola ("pozytywna") kontrola z referencyjnej kultury odniesienia *C. michiganensis* subsp. *insidiosus*.

Zalecane:

- Kontrola kontaminacji ekstrakcji wykonywana jest dla każdej partii badanych próbek. Polega ona na wykonaniu ekstrakcji kwasu nukleinowego (NA) przy użyciu znanych "ślepych" próbek, które nie zawierają docelowego NA (np. czysty bufor ekstrakcyjny)
- Kontrola inhibicji ekstrakcji stosowana do monitorowania współekstrakcji inhibitorów testu. Może ona polegać na testowaniu ekstrakcji NA testem PCR znanego badania w celu amplifikacji nie poszukiwanej specyficznej sekwencji (np. konserwatywny gospodarz genu lub uniwersalny gen ITS). Alternatywnie, jeśli są dostępne, syntetyczne kontrole wewnętrzne z kultury szczepu *C. michiganensis* subsp. *insidiosus*.

3.2 Interpretacja wyników: w celu odczytania wyników z testu PCR następujące kryteria powinny być stosowane:

- Test PCR będzie uważany za pozytywny, jeżeli wytwarza amplikon o wielkości 132 pz i pod warunkiem, że kontrole kontaminacji są negatywne
- Test PCR będzie uważany za negatywny, jeśli nie produkuje prążków lub nie wytwarza prążków o podobnej wielkości i pod warunkiem, że test i kontrole inhibicji ekstrakcji są pozytywne
- Badania powinny być powtarzane w przypadku uzyskania sprzecznych lub niejasnych wyników.

Załącznik – 4 Real-time PCR

Badania te zostały zatwierdzone wyłącznie dla czystych kultur i jeśli są one wykorzystywane do ekstrakcji materiału roślinnego muszą zostać dostosowane.

(A) Real-time PCR (Marefat *et al.*, 2007).

1. Informacje ogólne

1.1 startery oligonukleotydowe forward (CMIF) i reverse (CMIR) pochodzą z regionu 16S-23S rRNA.

1.2 wielkość ampliconu z DNA *C. michiganensis* subsp. *insidiosus* wynosi 224 par zasad

1.3 Oligonukleotydy:

Starter forward CMIF: 5' - GTC AGG CGT TTG TCC TGG T - 3'

Starter reverse CMIR : 5' - CSW CSW CSW TCC ACT CCG - 3'

Sonda BW: FAM – 5' - CTG CTA GTA CGC CTC CTT GTGG-3' TAMRA

1.4 termocykler: ABI Prism 7900HT.

1.5 Test został opracowany w oparciu o 13 szczepów *C. michiganensis* subsp. *insidiosus* pochodzących z różnych regionów geograficznych: 11 z Australii, jeden z USA jeden z Wielkiej Brytanii. Również w oparciu o *C. michiganensis* subsp. *nebraskensis*, *C. michiganensis* subsp. *michiganensis*, *Arthrobacter ilicis*, *Curtobacterium flaccumfaciens*, *Rathayibacter iranicus*, *R. rathayi*, *R. tritici* i *R. toxicus* i *Corynebacterium agropyri*. A także inne bakterie naturalnie występujące w uprawach lucerny. Średnia minimalna liczba komórek wykrywana przez test, kiedy wykonywany jest on na czystych kulturach wynosi 3,4 (wartości średnie z trzech powtórzeń) komórek na reakcji PCR. Podobną czułość uzyskano dla ekstraktów roślinnych kontaminowanych *C. michiganensis* subsp. *insidiosus* i inkubowanych przez 2 h. W badaniach porównawczych test okazał się być bardziej wrażliwy niż test Bacha *et al.* (2003) opisany w części B.

2. Metody

Mieszanina reakcyjna zawiera:

2.1 1 µl bakteryjnej zawiesiny komórek (około 10⁸ komórek na ml) lub wyciąg roślinny.

2.2 5 µl QuantiTect sondy PCR Master Mix (Qiagen Pty Ltd, Victoria, AU).

2.3 0,2 µM TaqMan sondy i 0,4 µM każdego startera w końcowej objętości 10 µl

Warunki reakcji PCR są następujące: 95 ° C 15 minut, w celu aktywacji Taq polimerazy DNA, a następnie 40 cykli 95 ° C przez 15 s i 65 ° C przez 1 min.

3. Istotne informacje dotyczące wymagań proceduralnych

3.1 Sterowanie: za każdym razem podczas przeprowadzania testu PCR powinny być zastosowane następujące kontrole:

Niezbędne:

- kontrola kontaminacji ("negatywna")
- kontrola ("pozytywna") kontrola z referencyjnej kultury odniesienia *C. michiganensis* subsp. *insidiosus*

Zalecane:

- Kontrola zanieczyszczeń ekstrakcji dla każdej partii testowanych próbek. Polega ona na wykonaniu ekstrakcji DNA przy użyciu znanych "ślepych" próbek, które nie zawierają docelowego NA (np. nie zainfekowany materiał roślinny lub czysty bufor ekstrakcyjny)
- Kontrola hamowania ekstrakcji stosowana do monitorowania współekstrakcji inhibitorów testu. Może obejmować badanie wyodrębnionego NA w teście PCR (np. konserwatywny gospodarz genu lub uniwersalny gen ITS). Ewentualnie, jeśli są dostępne, syntetyczne kontrole wewnętrzne amplifikacji mogą być wykorzystane, które pochodzą ze szczepu z hodowli *C. michiganensis* subsp. *insidiosus*.

3.2 Interpretacja wyników: w celu przypisania wyników z testu PCR następujące kryteria powinny być zastosowane:

- Wynik testu zostanie uznany za pozytywny, jeżeli wytwarza Ct poniżej 40 (bez rozcieńczania próbek) i pod warunkiem, że kontrole zanieczyszczeń są negatywne
- Wynik testu uznany zostanie za negatywny, jeśli nie produkuje sygnału poniżej Ct40 pod warunkiem, kontrole dla próbek i kontrola inhibicji ekstrakcji są pozytywne
- Badania powinny być powtarzane w przypadku uzyskania sprzecznych lub niejasnych wyników

B) Real Time PCR (Bach *et al.*, 2003).

1. Informacje ogólne

1.1. Test ten został opracowany w celu identyfikacji podgatunku *Clavibacter michiganensis* w jednym cyklu PCR.

1.2 forward (FP Cm) i reverse (RP Cm) oligonukleotydowe struktury pochodzą z 16S-23S rRNA regionu międzygenowego

1.3 wielkość ampliconu *C. michiganensis* subsp. *insidiosus* DNA wynosi 223 par zasad

1.4 Oligonukleotydy:

Starter forward FP Cm: 5' - TGT CGA GGG CAT GTT GCA CG -3'

Starter reverse RP Cm: 5' - GGA GAC AGA ATT GAC CAA TGA T-3'

Sonda BW: FAM -5' - TTC CGT CGT CCC GGA GTG GAT - 3' TAMRA.

FAM jest fluoresceiny, 6 izomer TAMRA jest tetraetylu-rodaminy 6 izomerem.

1.5 termocykler: ABI 7700 Sequence Detection System.

1.6 Test został opracowany w oparciu o 6 szczepów *Clavibacter michiganensis* subsp. *sepedonicus*, 2 szczepy *C. subsp michiganensis. michiganensis*, 3 szczepy *C. michiganensis* subsp. *nebraskensis*, 2 szczepy *C. michiganensis* subsp. *insidiosus*, 3 szczepy *C. michiganensis* subsp. *tessellarius*, *Rathayibacter iranicus*, *R. rathayi*, *R. tritici*, *R. toxicus*, *Frigoribacter faeni*, *Cellulomonas biazotea*, *C. FIMI*, *C. turbata*, *Arthrobacter globiformis*, *simplex* *Nocardioidea*, *N.*

jensenii, *Brevi-bakteria Sp.*, *Curtobacterium citreum*, *C. żółtego*, *Rhodococcus fascians* i *Streptomyces griseus* subsp. *griseus*. Szczepy zostały zakupione z niemieckiego banku mikroorganizmów(DSMZ).

Czułość analityczna jest $8,0 \cdot 10^5$ kopii na ml (wartości średnie).

2. Metody

Mieszanina reakcyjna zawiera na 50 μ l:

2.1 5 μ l bakteryjnej zawiesiny komórek (około 10^8 komórek na ml, co odpowiada 1 ng DNA) lub ekstrakt roślinny.

2.2 10 nmol z dNTP.

2.3 10 pmol startera forward

2.4 20 pmol reverse starter

2.5 5 pmol TaqMan sondy

2.6 5 μ l 10 x bufor reakcyjny

2.7 40 mM MgCl₂.

2.8 1 U polimerazy Taq Ampli Gold DNA (Applied Biosystems).

2.9 wodę klasy molekularnej do całkowitej objętości 50 μ l .

Warunki reakcji PCR są następujące:

95 °C przez 10 min w celu denaturacji DNA i aktywacji polimerazy, a następnie 35 cykli 95 °C przez 20 s i 66 °C przez 60 s.

3. Istotne informacje dotyczące wymagań proceduralnych

3.1 Sterowanie: za każdym razem podczas przeprowadzania testu PCR powinny być zastosowane następujące kontrole:

Niezbędne:

- kontrola kontaminacji ("negatywna")
- kontrola ("pozytywna") kontrola z referencyjnej kultury odniesienia *C. michiganensis* subsp. *insidiosus*

Zalecane:

- kontrola zanieczyszczeń ekstrakcji dla każdej partii testowanych próbek. Polega ona na wykonaniu ekstrakcji DNA przy użyciu znanych "ślepych" próbek, które nie zawierają docelowego NA (np. czysty bufor ekstrakcyjny)
- kontrola hamowania ekstrakcji stosowana do monitorowania współekstrakcji inhibitorów testu. Może obejmować badanie wyodrębnionego NA w teście PCR (np. konserwatywny gospodarz genu lub uniwersalny gen ITS). Ewentualnie, jeśli są dostępne, syntetyczne kontrole wewnętrzne amplifikacji mogą być wykorzystane, które pochodzą ze szczepu z hodowli *C. michiganensis* subsp. *insidiosus*.

3.2 Interpretacja wyników: w celu przypisania wyników z testu PCR następujące kryteria powinny być zastosowane:

- Wynik testu zostanie uznany za pozytywny, jeżeli wytwarza Ct poniżej 40 (bez rozcieńczania próbek) i pod warunkiem, że kontrole zanieczyszczeń są negatywne
- Wynik testu uznany zostanie za negatywny, jeśli nie produkuje sygnału poniżej Ct40 pod

warunkiem, kontrola dla próbek i kontrola inhibicji ekstrakcji są pozytywne

- Badania powinny być powtarzane w przypadku uzyskania sprzecznych lub niejasnych wyników

Załącznik – 5 Kwasy tłuszczowe bakterii - protokół dla *C. michiganensis* subsp. *insidiosus* i *C. michiganensis* subsp. *michiganensis*

Analiza kwasów tłuszczowych bakterii jest szeroko stosowana do szybkiej, dość efektywnej identyfikacji bakterii chorobotwórczych roślin. Istnieją standardowe metody służące do przygotowania profilu kwasu tłuszczowego (FAP), głównie w oparciu o korzystanie z Systemu Identyfikacji bakterii MIDI (MIDI, Newark, USA). Technika ta może być podzielona na szereg etapów, które obejmują hodowlę bakterii na podłożu wzrostowym i ich zebranie, etap saponifikacji tłuszczów, metylacji kwasów tłuszczowych do estrów metylowych (FAMEs), ekstrakcję w rozpuszczalniku organicznym, wyodrębnienie i identyfikację profilu kwasów tłuszczowych metodą chromatografii gazowej. Oprogramowanie MIDI identyfikuje i wylicza wytwarzane piki i porównuje wzór uzyskanych profili z profilem zawartym w bibliotece znanych szczepów. Biblioteki te można kupić w MIDI, np. TSBA 6 Aerobic Library lub wynik może być generowany samodzielnie. Kluczem do skutecznego wykorzystania FAPs jest standaryzacja wszystkich elementów metody.

Izolaty bakterii hoduje się na podłożu Trypticase Soy agar (BBL Trypticase Soy broth z dodatkiem 1,5% Bacto agar) przez określony czas w temp. 28°C. Jeśli dokonuje się porównania z MIDI biblioteką, na ogół stosuje się 24 h kultury. W przypadku bakterii wolno rosnących takich jak np. *Clavibacter michiganensis*, 48 lub 72 godzinny czas wzrostu powinien być zastosowany.

Szczegółowe informacje na temat metody podane są na stronie internetowej MIDI (http://www.midi-inc.com/pdf/MIS_Technote_101.pdf).

Nawet jeśli wykonywane jest porównanie izolowanych kolonii z biblioteką, najlepiej jest włączyć szczepy odniesienia.

Tabela 1 Profile kwasów tłuszczowych dla *Clavibacter*, *Rathayibacte* i gatunków *Curtobacterium*. Tabela ta powstała jako standardowa procedura.

Kwas tłuszczowy	Cmi	Cmm	Cmn	Cms	Cmt	Cff	Rr
14:0 Iso	0	t	0.4 (0.1)	t	0.5 (0.2)	0.4 (0.1)	1.4 (0.1)
15:1 Anteiso A	1.45 (1.4)	5.1 (1.4)	2.0 (0.9)	6.9 (2.8)	1.1 (0.8)	0	0.7 (0.1)
15:0 Iso	0	0.75 (0.3)	1.0 (0.6)	t	0.6 (0.3)	2.1 (0.6)	2.9 (0.4)
15:0 Anteiso	44.2 (1.8)	42.9 (2.2)	45.0 (1.3)	39.0 (3.2)	46.3 (0.8)	25.2 (1.7)	44.2 (1.2)
15:0	0	0.5 (0.4)	0.8 (0.4)	t	t	0	0
16:0 Iso	3.6 (1.0)	17.1 (3.1)	20.0 (1.0)	14.9 (1.6)	23.0 (2.1)	7.6 (2.4)	21.6 (1.0)
16:1 A	0	0	0	0	0	0.5 (0.1)	0

16:0	1.4 (0.6)	2.3 (0.4)	1.8 (0.3)	2.9 (0.9)	2.7 (1.0)	0.6 (0.1)	2.9 (1.6)
17:0 Iso	0	0.6 (0.2)	0.7 (0.3)	t	0.4 (0.3)	0.6 (0.1)	2.9 (0.4)
17:0 Anteiso	48.3 (2.4)	30.1 (2.1)	27.7 (2.2)	35.0 (2.6)	25.2 (4.0)	19.6 (2.6)	22.8 (1.7)
17:0	0	t	0.7 (0.2)	t	t	0	t
18:1w7c	0	0	0	0	0	43.0 (6.3)	0
Szczepy nr	12	14	5	14	10	6	4

Cmi, *C. michiganensis* subsp. *insidiosus*; *Cmm*, *C. michiganensis* subsp. *michiganensis*; *Cmn*, *C. michiganensis* subsp. *nebraskensis*; *Cms*, *C. michiganensis* subsp. *sepedonicus*; *Cmt*, *C. michiganensis* subsp. *tesselarius*; *Cff*, *Curtobacterium flaccumfaciens* pv. *flaccumfaciens*; *Rr*, *Rathayibacter rathayi*; t, ilości śladowe

Istnieje kilka publikacji poświęconych profilom kwasów tłuszczowych *Clavibacter michiganensis* i innych bakterii Gram-dodatnich chorobotwórczych dla roślin. Należą do nich Gitaitis i Beaver (1990), Henningson i Gudmestad (1991), Stead i wsp., 1992; Weller i wsp., 2000 i Dickstein et al. (2001). Profile kwasów z kilku podgatunków *Clavibacter michiganensis* przedstawiono w tabeli 2, wraz z profilami dla *Rathayibacter rathayi* i *Curtobacterium flaccumfaciens* pv. *flaccumfaciens*. Te pochodzą z siebie generowane NCPPB 3 biblioteki (Stead, DE, wyniki nieopublikowane).

Jak widać w Tabeli 1, profile różnych taksonów są podobne. Wszystkie podgatunki *Clavibacter michiganensis* i niektóre gatunki *Rathayibacter* mają 15: anteiso, który nie znajduje się w *Curtobacterium*. Większość *Curtobacterium flaccumfaciens* szczepy 18:1 w7c, które nie znajdują się w podgatunkach *Clavibacter michiganensis* i gatunkach *Rathayibacter*. Różnice między podgatunkami *Clavibacter michiganensis* mają charakter ilościowy, nie jakościowy. *C. michiganensis* subsp. *insidiosus* ma znacznie mniejsze ilości 16:0 iso i znacznie wyższe ilości 17:0 anteiso niż u innych podgatunków. *C. michiganensis* subsp. *michiganensis* i *C. michiganensis* subsp. *sepedonicus* mają znacznie większe ilości 15:1 Anteiso niż u innych podgatunków. W studium oceny bibliotekę zawierającą profile przedstawiono w Tabeli 1, 31 z 31 szczepów *C. michiganensis* subsp. *sepedonicus* i 12 z 15 *C. michiganensis* subsp. *michiganensis* szczepy zostały wymienione jako pierwszy wybór (Stead et al., 1992).

Wyniki o niskim wskaźniku podobieństwa należy interpretować z ostrożnością.

Załącznik – 6 Testy patogeniczności

Hodować podatne rośliny testowe lucerny (odmiany Europa i Orca wydają się być bardzo podatne; V'ichova "i Kozova", 2004) w doniczkach z wystarczającą ilością podłoża, w temp. około 20-25 °C (dzień) i > 70% wilgotności względnej w szklarni lub komorze wzrostu roślin. Co najmniej 10 sztuk 5-6 tygodniowych sadzonek powinno być używane dla każdego testu patogeniczności. Użyj szczepu odniesienia (o znanej patogeniczności) jako kontrolę dodatnią do zaszczepienia serii 10 sadzonek dla każdego doświadczenia, jak również szereg sadzonek zainokulowanych sterylnym roztworem soli fizjologicznej jako kontrolę ujemną.

Przygotuj odpowiednią objętość około zawiesiny o gęstości 10^9 jednostek tworzących kolonie w 1 ml przez zawieszenie przypuszczalnego 24-72 h izolatu i szczepu referencyjnego w sterylnej soli fizjologicznej (kultury 24-48 godzinne).

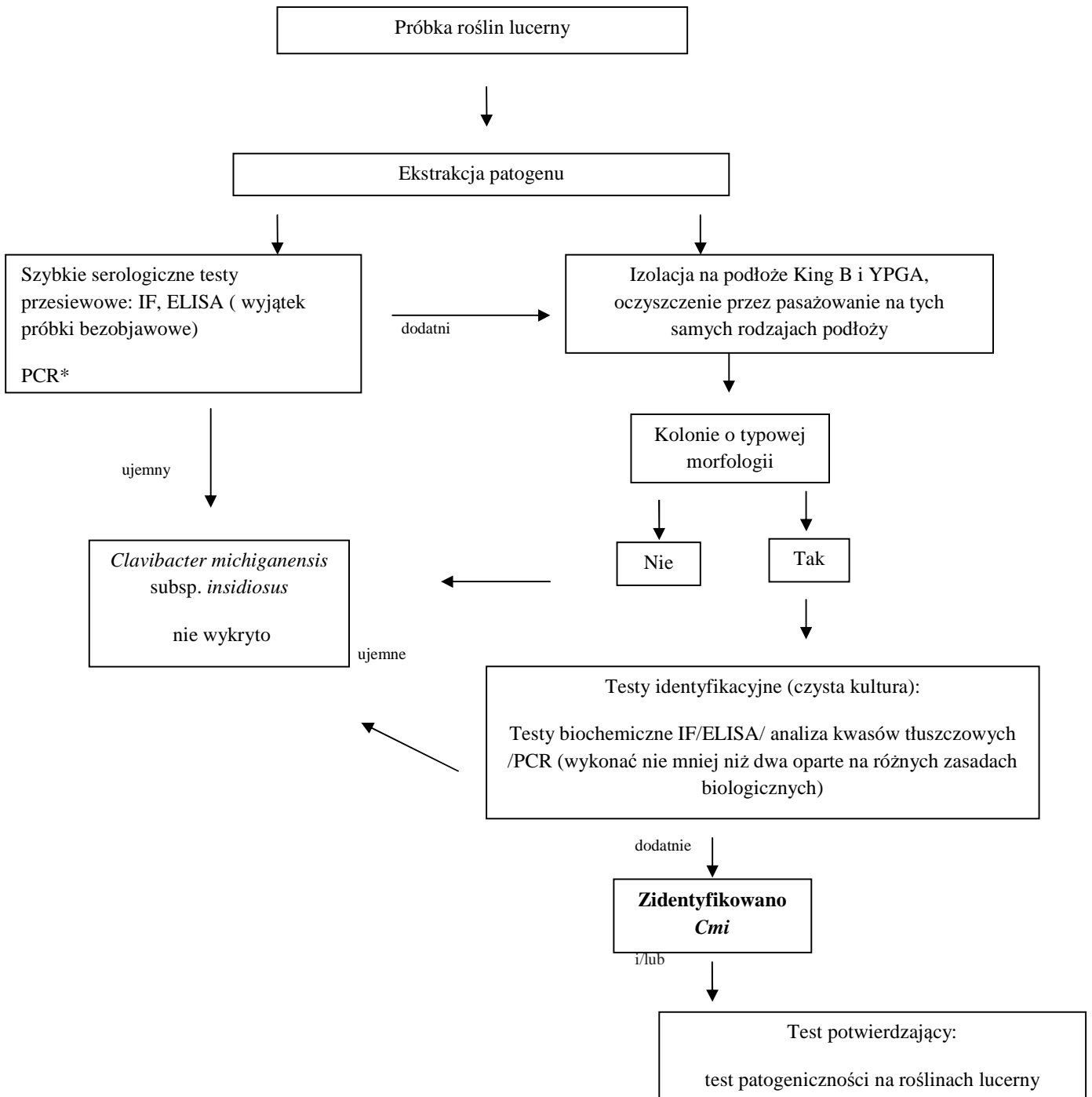
Do inokulacji użyte mogą być trzy sposoby.

- Metoda 1: zanurzenie wcześniej zdezynfekowanych nożyczek w zawieszynie bakterii i wykorzystanie ich do cięcia sadzonek. Zanurz nożyczki tyle razy, ile wymagane do zawieszenia, aby mieć pewność że odpowiednia ilość zawiesiny została pobrana.
- Metoda 2: cięcie sadzonek za pomocą zdezynfekowanych nożyczek i dodanie kropli zawiesiny bakteryjnej do każdego zranienia za pomocą pipety.
- Metoda 3: zanurzenie skróconych korzeni rośliny testowej w zawieszynie bakteryjnej na 17-18 godzin (V'ichova "i Kozova", 2004).

Cormack *et al.* (1957) stwierdził, że inokulacja korzeni jest bardziej skuteczna niż inokulacja łodyg, co najmniej w przypadku testów hodowlanych. Ale ta metoda nie jest łatwa do wykonania.

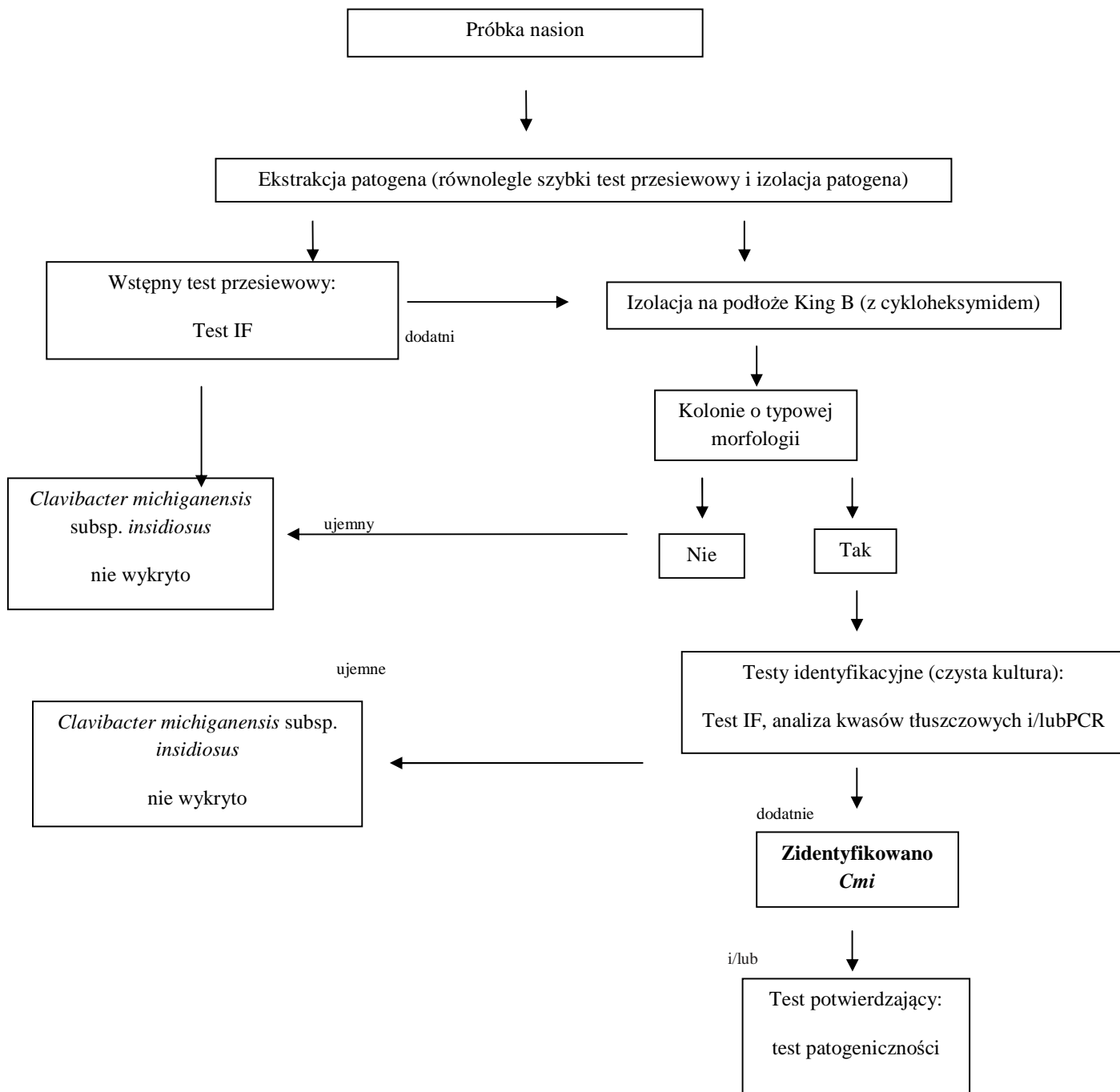
Bezpośrednio po zakażeniu, sadzonki należy umieścić w plastikowej torbie lub zastosować inny odpowiedni system, pozwalający zachować sadzonki w warunkach wysokiej wilgotności do 24 h, optimum temperatury wynosi 17-24 °C. Po tym, sadzonki mogą być przechowywane w normalnych warunkach szklarniowych. Sadzonki należy przetrzymywać pod obserwacją przez co najmniej 6-8 tygodni. Od czwartego tygodnia, należy przynajmniej raz w tygodniu dokonywać obserwacji więdnienia. Z więdnących roślin dokonywać izolacji bakterii przez wycięcie 1 cm fragmentu łodygi każdej rośliny 2 cm powyżej miejsca inokulacji i zawiesić w buforze fosforanowym (zobacz załącznik 1). Stosując metodę rozcieńczeń płytkowych posiać na podłożu King B lub YPGA. Oczyścić domniemane izolaty i wykonać testy w celu potwierdzenia identyfikacji jako *C. michiganensis* subsp. *insidiosus*.

Rys.1. Schemat wykrywania i identyfikacji *Cmi* w roślinach lucerny



PCR* - testy PCR zwalidowane były w odniesieniu do czystych kultur, w przypadku stosowania do materiału roślinnego należy je zwalidować

Rys.2. Schemat wykrywania i identyfikacji *Cmi* w nasionach lucerny



Tłumaczenie z jęz. angielskiego:	Sprawdził:	Zatwierdził:
Monika Kordyla-Bronka (GIORiN CL)	Anna Kołodziejska (GIORiN CL)	Janina Butrymowicz (GIORiN CL)
04.11.2011	04.11.2011	04.11.2011