

## **Diagnostyka** **Diagnostic**

### **PM 7/110 (1) *Xanthomonas* spp. (*Xanthomonas euvesicatoria*, *Xanthomonas gardneri*, *Xanthomonas perforans*, *Xanthomonas vesicatoria*) sprawca bakteryjnej plamistości pomidora i papryki.**

#### **Zakres**

Standard ten opisuje protokół diagnostyczny dla *Xanthomonas* spp., sprawcy bakteryjnej plamistości pomidora i papryki (*Xanthomonas euvesicatoria*, *Xanthomonas gardneri*, *Xanthomonas perforans*, *Xanthomonas vesicatoria*).<sup>1</sup>

#### **Zatwierdzenie i nowelizacja**

Zatwierdzono 2012-09.

#### **Wprowadzenie**

Pierwsze doniesienia o bakteryjnej plamistości pomidora (*Lycopersicon esculentum*) pochodzą z Afryki Południowej i Stanów Zjednoczonych (Doige, 1921; Gardner & Kendrick, 1921), a pierwsze opisy choroby występującej na papryce (*Capsicum annuum*) pochodzą z Florydy (Gardner & Kendrick, 1923). Chorobę stwierdzono dotąd na wszystkich kontynentach, na których prowadzone są uprawy *Lycopersicon esculentum* i *Capsicum annuum*.

Klasyfikacja bakterii powodujących plamistość liści u obu roślin żywicielskich oraz jej rutynowa identyfikacja jest bardzo trudna. Fenotypowo i filogenetycznie zróżnicowane populacje (określane jako grupy A-D) (Dye, 1966; Stall *et al.*, 1994; Vauterin *et al.*, 1995; Jones *et al.*, 2004) po wielu poprawkach, zakwalifikowano jako *Xanthomonas campestris* pv. *vesicatoria* (Dye, 1978). Na podstawie homologii DNA wśród dużej, lecz niekompletnej kolekcji xanthomonad (Vauterin *et al.*, 1995; Jones *et al.*, 2000), grupy A i C przeniesiono następnie do *Xanthomonas axonopodis* pv. *vesicatoria*, podczas gdy grupa B została wydzielona do poziomu gatunku *X. vesicatoria*. Szczepy grupy D, identyfikowane początkowo w byłej Jugosławii (Šutic, 1957) i identyczne szczepy z Costa Riki, zyskały status gatunku *X. gardneri* (Jones *et al.*, 2004). Nowy gatunek, *X. euvesicatoria*, wyznaczono dla odróżnienia słabo amylolicznej grupy A, wyizolowanej w Afryce Południowej (Doige, 1921) od rozkładających skrobię szczepów grupy C, izolowanych w Stanach Zjednoczonych (Gardner & Kendrick, 1921) i oznaczanych jako *X. perforans*. Patogeny bakteryjnej plamistości liści, obecnie zalicza się do czterech gatunków (*X. vesicatoria*, *X. euvesicatoria*, *X. perforans* i *X. gardneri*), a *X. axonopodis* pv. *vesicatoria* nie jest już nazwą obowiązującą (Bull *et al.*, 2010). Analizy filogenetyczne oparte na podobieństwach w sekwencji DNA pomiędzy pojedynczymi loci i loci wielu

---

<sup>1</sup> Zastosowanie w niniejszym Standardzie EPPO nazw odczynników chemicznych i wyposażenia, nie wyklucza możliwości zastosowania innych, które mogą być właściwe do określonego celu.

genów (Young *et al.*, 2008; Parkinson *et al.*, 2009; Hamza *et al.*, 2010) potwierdzają istnienie trzech odległych gatunków, jednak wskazują duże podobieństwo (jeśli nie identyczność) między *X. euvesicatoria* i *X. perforans*, a także między ostatnio opisywanym *X. alfalfa*. Ponadto odkryto podobieństwo gatunku *X. gardneri* do ustalonego *X. hortorum* i ostatnio opisywanego *X. cynarae*. Mimo, że *X. vesicatoria* wydaje się być gatunkiem dobrze zdefiniowanym, wiele patowarów xanthomonad opisuje się jako kład na poziomie gatunku *X. euvesicatoria/alfalfae/perforans* i *X. hortorum/cynarae/gardneri*. Konieczne są dalsze badania, pozwalające stwierdzić, czy status patowaru dla szczepów występujących na roślinach pomidora i papryki w obrębie tego kładu jest słuszny.

Badania porównawcze sekwencji całych genomów szczepów referencyjnych *X. euvesicatoria*, *X. perforans*, *X. gardneri* i *X. vesicatoria* wykazały znaczące różnice między tymi patogenami. Zidentyfikowano także geny specyficzne dla patogenów papryki i inne geny specyficzne dla danego szczepu bakterii, co może przyczynić się do wyjaśnienia różnic w wirulencji, agresywności i preferencji szczepów względem roślin żywicielskich (Potnis *et al.*, 2011).

Bakterie powodujące bakteryjną plamistość są rozpowszechniane po całym świecie wraz ze skontaminowanym materiałem siewnym. Patogeny pochodzące z zainfekowanego mięszu, znajdują się na powierzchni nasion, a nie w ich wnętrzu. Bakterie mogą rozprzestrzeniać się także wraz z zainfekowanymi sadzonkami, samosiewami pomidora i resztkami roślin. Standard ten opisuje przesiewowe metody stosowane do badań zainfekowanych lub skontaminowanych nasion oraz diagnozowania bakteryjnej plamistości na roślinach pomidora i papryki, wykazujących objawy chorobowe. Relatywnie prostą, niedrogą i niewrażliwą na czynniki zewnętrzne metodą identyfikacji, potwierdzenia tożsamości i różnorodności gatunków *Xanthomonas* powodujących bakteryjną plamistość jest sekwencjonowanie genów (DNA barcoding). Metody te są preferowane bardziej niż kompleksowe i kosztowne analizy homologii DNA:DNA, nieprzydatne do rutynowej diagnostyki.

Schemat diagnostyczny dla bakterii *Xanthomonas* spp., powodujących bakteryjną plamistość roślin pomidora i papryki, został przedstawiony na rys.1.

## Tożsamość

**Nazwy:** *Xanthomonas euvesicatoria* Jones *et al.* (2004).

*Xanthomonas gardneri* e.g. Šutic (1957) Jones *et al.* (2004).

*Xanthomonas perforans* Jones *et al.* (2004).

*Xanthomonas vesicatoria* e.g. Doidge (1920) Vauterin *et al.* (1995).

**Synonimy:** *Bacterium vesicatorium* Doidge (1920).

*Bacterium exitiosum* Gardner & Kendrick (1921).

*Xanthomonas vesicatoria* Doidge (1920), Dowson (1939).

*Pseudomonas gardneri* Šutic (1957) = *Xanthomonas gardneri*.

*Xanthomonas campestris* pv. *vesicatoria* Doidge (1920), Dye (1978).

*Xanthomonas axonopodis* pv. *vesicatoria* Vauterin *et al.* (1995).

Szczepy typu A = *Xanthomonas euvesicatoria*.

*Xanthomonas axonopodis* pv. *vesicatoria* Vauterin *et al.* (1995).

Szczepy typu C = *Xanthomonas perforans*.

**Pozycja taksonomiczna:** domena/królestwo: Bakterie  
dział/gromada: Proteobakterie  
klasa: Gammaproteobakterie  
rząd: *Xanthomonadales*  
rodzina: *Xanthomonadaceae*.

**Kod komputerowy EPPO:** XANTEU, XANTGA, XANTPF, XANTVE.

**Kategoria fitosanitarna:** wszystkie 4 gatunki – lista EPPO A2 numer 157, Załącznik EU numer II/A2.

## Wykrywanie

### Objawy

#### *Lycopersicon esculentum* (pomidor)

Na liściach pomidora powstają uszkodzenia w postaci nieregularnych, nasiąkniętych wodą powierzchni, początkowo zielonych, później brązowiejących i nekrotycznych. Uszkodzenia często otoczone są dużymi chlorotycznymi przejaśnieniami. Powstałe uszkodzenia mogą łączyć się, prowadząc do zamierania liści. Wzdłuż łodygi można obserwować rakowate spękania oraz nekrozy ogonków liściowych. Uszkodzenia liści początkowo mogą wydawać się podobne do tych powodowanych przez *Pseudomonas syringae* pv. *tomato*, jednak otoczone są wyraźniejszym żółtym halo.

Uszkodzenia na owocach początkowo są niewielkie, lekko wypukłe (Rys. 2A,B). Z czasem plamki ulegają powiększeniu, brązowieją i przypominają „strupy” z podsiąkniętymi wodą obrzeżami. Uszkodzenia mogą także łączyć się. W przypadku *P. syringae* pv. *tomato*, uszkodzenia na owocach są mniejsze, nie-strupkowate i czarne.

#### *Capsicum annuum* (papryka)

Uszkodzenia na liściach *Capsicum annuum* są nieregularne, nekrotyczne, w niektórych przypadkach otoczone chlorotycznym halo (Rys. 3A,B i 4A,B). W przypadku nasilenia infekcji, może dochodzić do zamierania liści, które następnie opadają. Na owocach strupowate uszkodzenia powiększają się i dają wrażenie białawo zabarwionych (Rys. 5A,B).

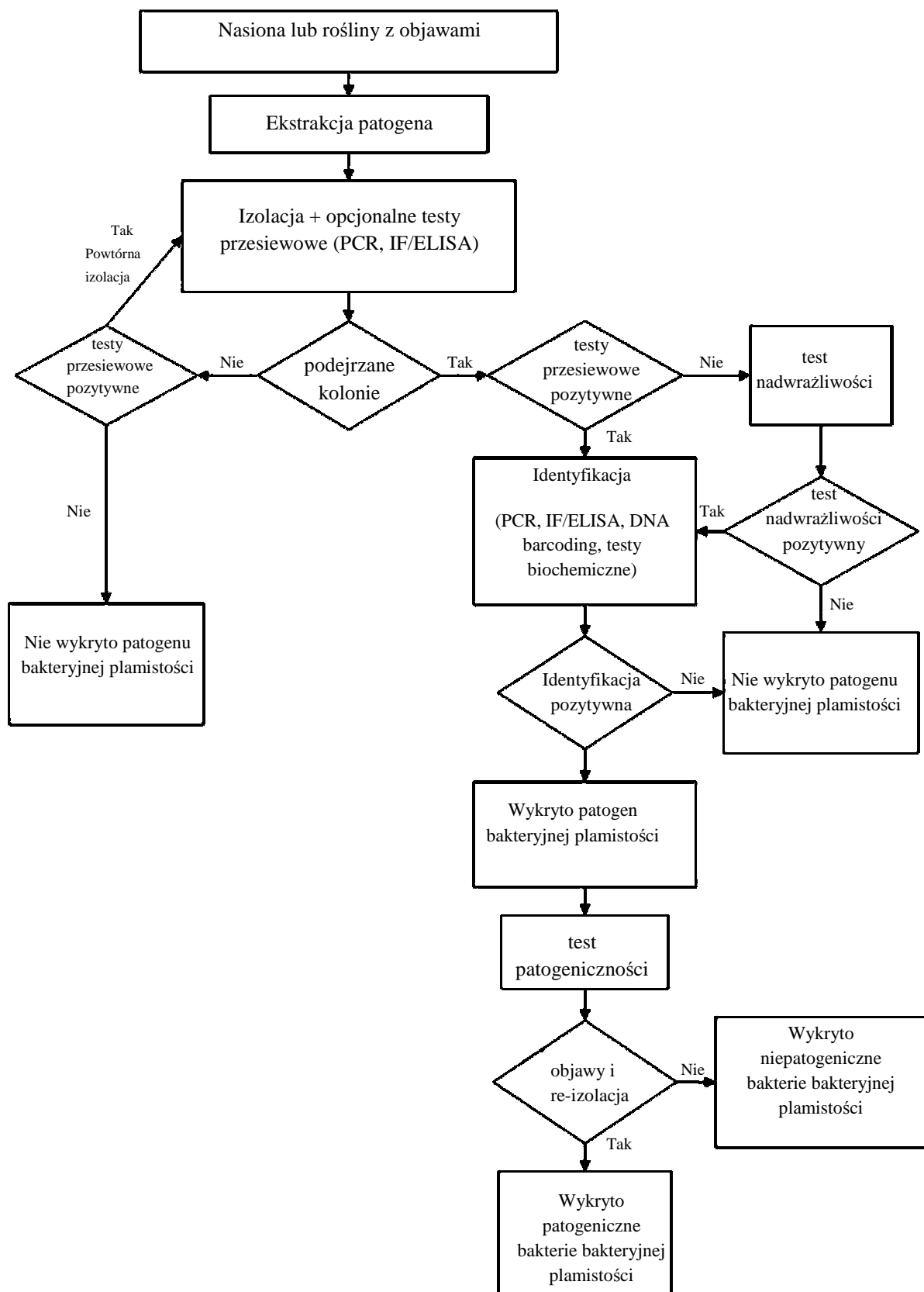
## Identyfikacja w roślinach wykazujących objawy chorobowe

### Ekstrakcja

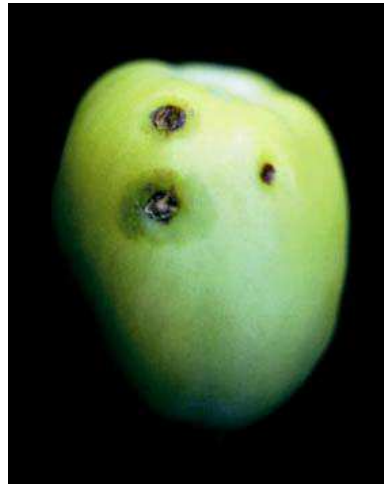
Liście, ogonki liściowe lub owoce należy umyć pod bieżącą wodą, wypłukać wodą destylowaną, osuszyć bibułą lub zdezynfekować powierzchniowo (np. przy użyciu 70% etanolu). Niewielkie fragmenty tkanki pochodzącej z brzegów nekrotycznych uszkodzeń należy zmiażdżyć z dodatkiem 1-2 kropli sterylnej soli fizjologicznej (0,85% roztwór NaCl w sterylnej wodzie destylowanej), 1% peptonu lub 10 mM buforu PBS.

### Izolacja

Uzyskaną zawiesinę lub 100µl 10-krotnego rozcieńczenia zawiesiny w tym samym buforze, którego użyto do ekstrakcji, należy posiać na odpowiednie podłoże nioselektywne, np. Wilbrink (Koine, 1965), NSCAA (Schaad & Franken, 1996) lub YGCA (patrz Załącznik 2.) i inkubować w temperaturze 25-28°C. Typowe, żółte kolonie pojawiają się po 2-5 dniach inkubacji. Przed dalszą identyfikacją, podejrzone kolonie mogą wymagać oczyszczenia poprzez pasażowanie na to samo podłoże.



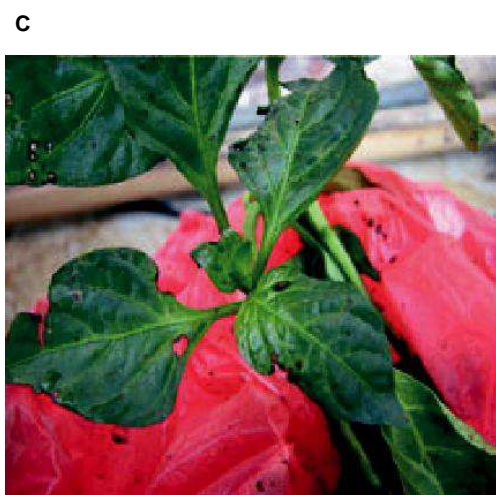
Rys. 1 Schemat diagnostyczny badania nasion pomidora i papryki oraz roślin z objawami, w kierunku wykrycia *Xanthomonas* spp., sprawcy bakteryjnej plamistości



Rys. 2 (A,B) Typowe dla bakteryjnej plamistości martwice na owocach pomidora.



Rys. 3 (A,B) Martwice typowe dla bakteryjnej plamistości na liściach papryki (górną i dolną powierzchnią).



Rys. 4 (A,B,C,D) Objawy bakteryjnej plamistości na liściach papryki, wywołanej przez *Xanthomonas perforans*. Rys 4A przedstawia małe nekrotyczne plamy na liściach, Rys 4B-4D duże nekrotyczne plamy na liściach z wypadającymi centralnie dziurami.



Rys. 5 (A,B) Typowe dla bakteryjnej plamistości uszkodzenia na powierzchni owocu papryki.

### Wykrywanie w nasionach

Międzynarodowa Federacja Nasienna (ISF) zaleca, aby minimalna wielkość próbki wynosiła 10000 nasion [[http://www.worldseed.org/isf/ishi\\_vegetable.html](http://www.worldseed.org/isf/ishi_vegetable.html)], a maksymalna wielkość podpróbki 10000 nasion. Wskazana wielkość próbki powinna pozwolić na wykrycie kontaminacji 0,03% na poziomie ufności 95%. Mniejsze podpróbki (np. 5 x 2000 nasion) są zalecane w przypadku występowania dużej ilości bakterii saprofitycznych, mogących maskować potencjalną obecność *Xanthomonas*. Podpróbki mniejszej wielkości mogą być badane na podstawie tego protokołu, ale z niższą ufnością, która powinna zostać określona dla każdej badanej wielkości próby. Przykład: dla upraw chronionych, lub wysokiej klasy nasion mieszańcowych, minimalna liczba nasion na próbkę, może być obniżona do 2000 z poziomem ufności 98% i wykrywalności 0,2%. Opisane testy nie zostały zwalidowane dla nasion zaprawianych i otoczkowanych.

### Ekstrakcja

Zaleca się dwie metody ekstrakcji bakterii z nasion (patrz Załącznik 1.). Do izolacji zaleca się stosowanie dziesięciokrotnego rozcieńczenia zagęszczonego ekstraktu.

Jeżeli ta sama próbka jest poddawana badaniom w kierunku dodatkowych patogenów (np. *Clavibacter michiganensis* subsp. *michiganensis*), możliwe jest zastosowanie jednej metody ekstrakcji dla wszystkich bakterii. W przypadku zastosowania metody ekstrakcji zoptymalizowanej dla innych patogenów, nie zaleca się moczenia dłużej niż 3 godziny w temperaturze pokojowej, lub przez noc w 4°C, z powodu tendencji do namnażania saprofitów i przerastania *Xanthomonas*.

### Izolacja

Do izolacji zaleca się podłoże YGCA (drożdże-glukoza-węglan wapnia-agar), ale także inne podłoża nie selektywne, np. Wilbrink's, agar odżywczy (NA), dekstroza odżywcza (ND), ekstrakt drożdżowy-dekstroza-węglan wapnia (YDC) agar, bulion odżywczy-ekstrakt drożdżowy (NBY)

agar, lub drożdże-pepton-glukoza agar (YPGA) wzbogacony adeniną (patrz Załącznik 2.). Stosowanie pół-selektywnych podłoży CKTM (Sijam *et al.*, 1992), mMXV (Sijam *et al.*, 1991) lub mTMB (McGuire *et al.*, 1986) może ulepszyć proces izolacji z próbek, gdzie duże ilości bakterii saprofitycznych blokują izolację podejrzanych kolonii *Xanthomonas*. Powodujące plamistości gatunki *Xanthomonas*, mogą wykazywać ograniczony wzrost na wymienionych podłożach. Gdy po przepasażowaniu na agar odżywczy pojawiają się żółto zabarwione kolonie, należy przeprowadzić testy pozwalające zidentyfikować domniemane bakterie.

## **Morfologia kolonii**

Na podłożu YGCA, kolonie są jasno żółte, okrągłe, całobrzegie, mokre i lśniące, śluzowate i nieznacznie wzniesione. Na innych podłożach, kolonie są blado lub jasno żółte, okrągłe, śluzowate i lekko wzniesione. Na podłożu CTKM kolonie są okrągłe, wzniesione, żółte i otoczone białym krystalicznym przejaśnieniem. Izolaty pochodzące z pomidora zwykle otoczone są białym, nieprzezroczystym przejaśnieniem, pojawiającym się w ciągu 3-7 dni. Na podłożu mTMB, kolonie *Xanthomonas* są żółte, lekko śluzowate, wzniesione i okrągłe. Zastosowanie Tweenu, prowadzi do powstawania przejrzystego „halo” wokół żółtych kolonii w ciągu 3-7 dni. Dla dalszego oczyszczenia, żółto zabarwione kolonie należy przepasażować na nieselektywne podłoże – agar odżywczy. Następnie przeprowadza się testy identyfikacyjne dla *Xanthomonas* spp.

## **Testy przesiewowe**

### **Metody serologiczne**

Przeciwciała do użycia w metodach immunofluorescencji i ELISA (Jones *et al.*, 1997; Alvarez, 2004) są komercyjnie dostępne, ale nie ma opublikowanych danych dotyczących ich specyficzności względem *X. euvesicatoria*, *X. gardneri*, *X. perforans* i *X. vesicatoria*. Niektóre przeciwciała monoklonalne wydają się być gatunkowo-specyficzne (Bouzar *et al.*, 1994a). Dlatego stosowanie metod serologicznych do badań przesiewowych nasion lub ekstraktów roślinnych wymaga wcześniejszej walidacji dostępnych przeciwciał przeciwko pełnemu zestawowi różnorodnych patogenów, które mają być wykrywane. Protokoły diagnostyczne EPPO PM 7/97(1) i PM 7/101(1) opisują testy immunofluorescencji pośredniej i testy ELISA do stosowania ze zwalidowanymi przeciwciałami (EPPO, 2009, 2010). Testy powinny być wykonywane na ekstraktach z nasion lub roślin i ich 10-krotnych rozcieńczeniach.

### **Łańcuchowa reakcja polimerazy**

Niektóre publikowane metody PCR są albo gatunkowo-specyficzne (Moretti *et al.*, 2009), lub ich specyficzność jest nieokreślona (Park *et al.*, 2009).

## **Identyfikacja**

Oczyszczone izolaty *Xanthomonas* spp., powodujących bakteryjną plamistość, mogą być identyfikowane poprzez zastosowanie kombinacji procedur opisanych poniżej. Zaleca się wykonanie co najmniej dwóch testów opartych na różnych mechanizmach biologicznych.

## **Reakcja nadwrażliwości**

W celu uniknięcia działania testów identyfikacyjnych na saprofity, test reakcji nadwrażliwości (HR) może być wykonany na strąkach fasoli (Klement & Lovrekovich, 1961) poprzez przenikanie przez tkanki wodnej zawiesiny zawierającej co najmniej  $10^7$  jtk/ml domniemanych xanthomonad. Pozytywny wynik testu HR wskazuje na obecność fitopatogenicznych *Xanthomonas* sp.



## Charakterystyka biochemiczna

Odróżnienie *Xanthomonas* spp. od innych rodzajów tlenowców, Gram-negatywnych pałeczek i innych żółto-wybarwionych bakterii, jest bardzo proste ze względu na cechy zebrane w Tabeli 1. (Schaad & Stall, 1989; Schaad *et al.*, 2001). Kluczowe cechy genotypowe, pozwalające odróżnić cztery gatunki *Xanthomonas* wywołujących bakteryjną plamistość, jak opisuje Jones i in. (2004), zostały zebrane w Tabeli 2. Gatunek *Xanthomonas euvesicatoria* jest słabo amylolytyczny i słabo pektolityczny (patrz poniżej), reaguje z zestawem przeciwciał monoklonalnych według określonego wzoru (Bouzar *et al.*, 1994a; Jones *et al.*, 2000), posiada wyraźny profil w SDS-PAGE (Bouzar *et al.*, 1994b), oraz wykorzystuje kwas *cis*-akonitowy. Szczepy *Xanthomonas vesicatoria* trawią skrobię i substraty pektynowe, reagują odmiennie z zestawem przeciwciał monoklonalnych, nie wykorzystują kwasu *cis*-akonitowego oraz wykazują specyficzne białko od 25 do 27 kDa w profilu SDS-PAGE. *Xanthomonas perforans* jest silnie amylolytyczny i pektolityczny, posiada określony wzór reakcji z zestawem przeciwciał monoklonalnych i wyraźny profil SDS-PAGE. *Xanthomonas gardneri* jest słabo amylolytyczny i pektolityczny, reaguje z zestawem przeciwciał monoklonalnych według określonego wzoru i posiada wyraźny profil w SDS-PAGE.

**Tabela 1.** Cechy fenotypowe użyteczne przy odróżnianiu *Xanthomonas* od *Pseudomonas* i innych żółto-zabarwionych bakterii takich jak *Flavobacterium*

cecha	<i>Xanthomonas</i>	<i>Pseudomonas</i>	<i>Flavobacterium</i>	<i>Pantoea</i>
wici	1, polarna	>1, polarne	brak	perytrychalne
xanthomonadyna	+	–	–	–
fluorescencja		V	–	–
lewan z sacharozy	+	V	–	–
H <sub>2</sub> S z cysteiny	+	–	–	–
oksydaza	–	V	+	–
fermentacja	–	–	–	+
wzrost na 0.1% TTC	–	+	+	+

V – zróżnicowane reakcje.

**Tabela 2.** Cechy charakterystyczne *Xanthomonas* spp. wywołujących bakteryjną plamistość pomidora i papryki.

Grupa	Nazwa	Występowanie	Szczep referencyjny	Wielkość białka specyficznego (kDa)	Aktywność amylolytyczna	Aktywność pektolityczna
A	<i>Xanthomonas euvesicatoria</i>	cały świat	ATCC11633 <sup>T</sup> (NCPFB2968)	32–35	–	–
B	<i>Xanthomonas vesicatoria</i>	cały świat	ATCC35937 <sup>T</sup> (NCPFB422)	25–27	+	+
C	<i>Xanthomonas perforans</i>	Meksyk, Tajlandia, USA	ATCC BAA-983 <sup>T</sup> (NCPFB4321)	25–27	+	+
D	<i>Xanthomonas gardneri</i>	Brazylia, Costa Rica, USA	ATCC19865 <sup>T</sup> (NCPFB881)	25–27	–	–

**Tabela 3.** Zróznicowanie szczepów bazujące na wykorzystaniu źródeł węgla przy użyciu systemu Biolog GN Microplate (Jones *et al.*, 2000)

Utylizacja:	<i>X. euvesicatoria</i>	<i>X. vesicatoria</i>	<i>X. perforans</i>	<i>X.gardneri</i>
dekstryna	+	+	+	–
glikogen	+	V	V	–
N-acetyl-D-glukoamina	+	V	+	–
D-galaktoza	+	V–	+	–
gentibioza	+	V	+	–
$\alpha$ -D-laktoza laktuloza	V	V–	+	–
kw. octowy	V	–	+	–
kw. cis-akoniowy	+	–	V	–
kw. malonowy	+	V	+	–
kw. propionowy	V–	V	+	–
D-alanina	V	V	+	–
kw. glicylo-L-asparaginowy	–	V–	+	–
L-treonina	V	V–	+	–

+ = reakcja pozytywna u wszystkich szczepów; V, 50% lub więcej szczepów utylizuje składnik; V–, <50% szczepów utylizuje składnik; –, żaden szczep nie utylizował składnika.

### Automatyczny system identyfikacji Biolog

Mikropłytki nowej wersji (trzeciej generacji) Biolog GENIII 96 (Biolog, Omnilog, US) pozwala zidentyfikować wyizolowane bakterie na podstawie 94 fenotypowych testów: 71 reakcji wykorzystywania źródeł węgla i 23 analizy wrażliwości chemicznej na czynniki biochemiczne i fizjologiczne, takie jak pH, sole, kwas mlekowy oraz antybiotyki. Każdy testowany gatunek posiada unikalny „fenotypowy odcisk palca”, który jest automatycznie porównywany z bazą danych, zawierającą według instrukcji producenta, 1200 gatunków bakterii tlenowych. *Xanthomonas gardneri* w przeciwieństwie do pozostałych xanthomonad wywołujących bakteryjną plamistość, nie wykorzystuje żadnego z wymienionych w Tabeli 3. źródeł węgla.

### Analiza aktywności amylolitycznej i pektolitycznej

Zdolność izolatów do rozkładu skrobi testuje się na zmodyfikowanym podłożu brylantowy błękit krezylu-skrobia (patrz Załącznik 2.) i agarze odżywczym wzbogaconym 1% skrobią. Płytki inkubuje się w 25-28°C przez 2 dni. Izolaty amylolityczne (Amy<sup>+</sup>) wykazują obfity wzrost na podłożu mBS, podczas gdy nie-amylolityczne (Amy<sup>–</sup>) wzrostu nie wykazują. Izolaty Amy<sup>+</sup> oraz Amy<sup>–</sup> rosną na agarze odżywczym z dodatkiem 1% skrobi. Hydroliza skrobi objawia się poprzez wytwarzanie nieprzeźroczystej strefy otaczającej miejsce wzrostu bakterii. Dla potwierdzenia hydrolizy skrobi, płytki można zalać płynem Lugola (1% jodiny, 2% jodku potasu), ujawniając wyraźną, niezabarwioną strefę, w której skrobia została zhydrolizowana. Aktywność pektolityczną testuje się na podłożu pektanowym (patrz Załącznik 2.). Po 1-2 dni inkubacji płytek w temperaturze 25-28°C, izolaty pektolityczne tworzą w podłożu zagłębienia otaczające kolonie. Jako kontrole należy stosować referencyjne szczepy każdego gatunku *Xanthomonas*.

## **Analiza estrów metylowych kwasów tłuszczowych**

Analiza estrów metylowych kwasów tłuszczowych (FAME) (jak opisali Weller i in., 2000) pozwala poprawnie identyfikować izolowane z pomidora *Xanthomonas* spp. i odróżnić je od innych bakteryjnych patogenów wywołujących objawy w postaci plamistości na liściach.

## **Metody serologiczne**

Zależnie od dostępności zwalidowanych przeciwciał, wodne zawiesiny domniemanych izolatów (zawierających około  $10^6$  jtk/ml) mogą być identyfikowane z zastosowaniem testu immunofluorescencji pośredniej lub testu ELISA, zgodnie z protokołami diagnostycznymi EPPO, odpowiednio: PM7/97 (1) Test immunofluorescencji pośredniej dla bakterii patogenicznych dla roślin (EPPO, 2009) i 7/101 (1) Test ELISA dla bakterii patogenicznych dla roślin.

## **Metody PCR**

Według Koenraadt i in. (2009), wodne zawiesiny domniemanych izolatów (zawierających około  $10^6$  jtk/ml) mogą być identyfikowane z zastosowaniem serii konwencjonalnych testów PCR (Załącznik 3.).

## **Metody DNA fingerprinting**

Porównanie DNA genomowego izolatów i szczepów różnych typów przy zastosowaniu rep-PCR fingerprinting (Stern *et al.*, 1984; Sharples & Lloyd, 1990; Louws *et al.*, 1994; Koeuth *et al.*, 1995) może być przydatnym testem identyfikacyjnym (patrz Standard EPPO PM 7/100 (1) Testy Rep-PCR do identyfikacji bakterii (EPPO, 2010)).

## **Metody DNA barcoding**

Zaliczenie patogenów bakteryjnej plamistości do czterech gatunków *Xanthomonas* wymagało uprzednio kompleksowej analizy homologii DNA:DNA, co jest poza zasięgiem większości laboratoriów diagnostycznych. Rozwiązaniem równoważnym, jednak wymagającym znacznie niższych kosztów i nakładu pracy, jest porównanie komercyjnie sekwencjonowanych produktów PCR amplifikowanych z wybranych loci genów ulegających stabilnej ekspresji. Przykładowe metody sekwencjonowania pojedynczego genu (Parkinson *et al.*, 2009) oraz sekwencjonowanie wielu loci (Young *et al.*, 2008; Hamza *et al.*, 2010) wykazały prawidłowe rozróżnienie szczepów *X. gardneri*, *X. vesicatoria*, *X. euvesicatoria* i *X. perforans*. Procedury są opisane w standardzie EPPO PM 7/XXX *DNA barcoding as an identification tool for plant pests* (w przygotowaniu).

## **Test patogeniczności**

W zależności od warunków użycia (patrz Standard EPPO PM 7/77(2)), test patogeniczności może być wykonany, jeśli jest to potrzebne. Test ten może być przeprowadzony na młodych roślinach papryki lub pomidora w stadium 4-5 liści. Należy stosować odmiany podatne (np. pomidor odmiana MoneyMaker i papryka odmiana Early Calwonder). Rośliny powinny rosnać w temp. 23-35°C, przy normalnym nawadnianiu i nawożeniu. Inokulum należy przygotować przez zawieszenie około  $5 \times 10^7$  jtk/ml z czystej kultury w buforze fosforanowym. Rośliny inokuluje się poprzez pocieranie liści wacikiem nasączonym inokulum, z dodatkiem karborundu do uszkodzenia tkanek, lub poprzez infiltrację przestrzeni między nerwami liści. Zainokulowane rośliny należy przykryć woreczkiem foliowym dla utrzymania wysokiej wilgotności przez 48 godzin po inokulacji. Do badania należy włączyć także kontrole pozytywne i negatywne. Objawy bakteryjnej plamistości zwykle pojawiają się po 3 tygodniach w 25°C w postaci martwic na powierzchni liścia, otoczonych białawym halo.

Obserwować można także chlorozy i epinastie liści pomidora i papryki. Izolaty *X. vesicatoria* mogą powodować powstawanie zapadłych ubytków bez otaczających je przejaśnień. Kompletny test patogeniczności powinien być zakończony re-izolacją i identyfikacją izolatu z tkanek wykazujących objawy.

## **Materiał odniesienia**

*Xanthomonas euvesicatoria* Jones *et al.* (2004).

Typ szczepu: ATCC 11633; ICMP 109; ICMP 98; NCPPB 2968.

*Xanthomonas gardneri* np. Šutic (1957) Jones *et al.* (2004)

Typ szczepu: ATCC 19865; ICMP16689; NCPPB 881; LMG962.

*Xanthomonas perforans* Jones *et al.* (2004).

Typ szczepu: ATCC BAA-983; NCPPB 4321; ICMP 16690.

*Xanthomonas vesicatoria* np. Doidge (1920) Vauterin *et al.* (1995).

Typ szczepu: ATCC 35937; ICMP 63; LMG 911; NCPPB 422; CFBP 2537.

## **Sprawozdawczość i dokumentacja**

Wskazówki dotyczące sprawozdawczości i dokumentacji przedstawiono w standardzie EPPO PM 7/77 (1) *Sprawozdawczość i dokumentowanie wyników badań*.

## **Kryteria walidacji**

Jeśli kryteria walidacji są dostępne, to przedstawiono je z wraz z opisem metody. Dane walidacyjne są również umieszczone w bazie danych ekspertyz diagnostycznych EPPO (<http://dc.eppo.int>). Zaleca się korzystanie z bazy danych, jako dodatkowego źródła informacji (np. więcej szczegółowych danych dotyczących analitycznej specyficzności, pełne raporty walidacji).

## **Informacje dodatkowe**

M. Scortichini, CRA Istituto Sperimentale per la Frutticoltura, Via di Fioranello, 52, I-00040 Ciampino aeroporto, Roma, IT E-mail: marco.scortichini@entecra.it.

E. Stefani, Dept. Agricultural and Food Sciences, via Amendola 2, Pad. Besta, 42100 Reggio Emilia (IT). E-mail: emilio.stefani@unimore.it.

J. Elphinstone, Food and Environment Research Agency (Fera), Sand Hutton, York, YO411LZ (GB). E-mail: john.elphinstone@fera.gsi.gov.uk.

## **Opinie dotyczące niniejszego protokołu diagnostycznego**

Jeśli macie Państwo jakieś opinie dotyczące niniejszego protokołu diagnostycznego albo opisanych metod, lub też możecie dostarczyć dodatkowe dane z ich walidacji do udostępnienia, prosimy o kontakt e-mail: [diagnostics@eppo.int](mailto:diagnostics@eppo.int).

## **Rewizja protokołu**

Każdego roku protokoły diagnostyczne poddawane są przeglądom w celu określenia potrzeby wniesienia poprawek. Te, które zostaną zidentyfikowane, jako ich wymagające są oznaczone na stronie internetowej EPPO. Kiedy spis literówek i omyłek znajduje się już w druku, to również taka informacja umieszczona zostaje na stronie internetowej EPPO.

## Podziękowania

Protokół oryginalnie został opracowany przez M. Scortichini, a następnie zrewidowany przez E. Stefani, J.G. Elphinstone (kontakt, patrz wyżej), a część dotycząca testu PCR przez M. Bergsma Vlami (NRC, NL).

## Materiały źródłowe<sup>2</sup>

Alvarez AM (2004) Integrated approaches for detection of plant pathogenic bacteria and diagnosis of bacterial diseases. *Annual Review of Phytopathology* **42**, 339–366.

Bouzar H, Jones JB, Stall RE, Hodge NC, Minsavage GV, Benedict AA & Alvarez AM (1994a) Physiological, chemical, serological and pathogenic analysis of a worldwide collection of *Xanthomonas campestris* pv. *vesicatoria* strains. *Phytopathology* **84**, 663–671.

Bouzar H, Jones JB, Minsavage GV, Stall RE & Scott JW (1994b) Proteins unique to phenotypically distinct groups of *Xanthomonas campestris* pv. *vesicatoria* revealed by silver staining. *Phytopathology* **84**, 39–44.

Bull CT, De Boer SH, Denny TP, Firrao G, Fischer-Le Saux M, Saddler GS, Scortichini M, Stead DE & Takikawa Y (2010) Comprehensive list of names of plant pathogenic bacteria, 1980 – 2007. *Journal of Plant Pathology* **92**, 551–592.

Doidge EM (1921) A tomato canker. *Annals of Applied Biology* **7**, 407–430.

Dye DW (1966) Cultural and biochemical reaction of additional *Xanthomonas* species. *New Zealand Journal of Science* **9**, 913–919.

Dye DW (1978) Genus IX. *Xanthomonas*. Dowson 1939. In: Young JM, Dye DW, Bradbury JF, Panagopoulos CG & Robbs CF. A proposed nomenclature and classification for plant pathogenic bacteria. *New Zealand Journal of Agricultural Research* **21**, 153–177.

EPPO (2009) PM 7/097 (1) Indirect immunofluorescence test for plant pathogenic bacteria. *Bulletin OEPP/EPPO Bulletin* **39**, 413–416.

EPPO (2010) PM 7/101 (1) ELISA tests for plant pathogenic bacteria. *Bulletin OEPP/EPPO Bulletin* **40**, 369–372.

Gardner MW & Kendrick JB (1921) Bacterial spot of tomato. *Journal of Agricultural Research* **21**, 123–156.

Gardner MW & Kendrick JB (1923) Bacterial spot of tomato and pepper. *Phytopathology* **13**, 307–315.

Hamza AA, Rob\_ene-Soustrade I, Jouen E, Gagnevin L & Lefeuvre P (2010) Genetic and pathological diversity among *Xanthomonas* strains responsible for bacterial spot on tomato and pepper in the Southwest Indian Ocean Region. *Plant Disease* **94**, 993–999.

Jones JB, Somodi GC & Scott JW (1997) Increased ELISA sensitivity using a modified

---

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

- extraction buffer for detection of *Xanthomonas campestris* pv. *vesicatoria* in leaf tissue. *Journal of Applied Microbiology* **83**, 397–401.
- Jones JB, Bouzar H, Stall RE, Almira EC, Roberts P, Bowen BW, Sudberry J, Strickler P & Chun J (2000) Systematic analysis of xanthomonads (*Xanthomonas* spp.) associated with pepper and tomato lesions. *International Journal of Systematic Bacteriology* **50**, 1211–1219.
- Jones JB, Lacy GH, Bouzar H, Stall RE & Schaad NW (2004) Reclassification of the xanthomonads associated with bacterial spot disease of tomato and pepper. *Systematic Applied Microbiology* **27**, 755–762.
- Klement Z & Lovrekovich L (1961) Defence reactions induced by phytopathogenic bacteria in bean pods. *Phytopathologische Zeitschrift* **41**, 217–227.
- Koenraadt H, van Betteray B, Germain R, Hiddink G, Jones JB, Oosterhof J, Rijlaarsdam A, Roorda P & Woudt B (2009) Development of specific primers for the molecular detection of bacterial spot of pepper and tomato. Proceedings of the 2<sup>nd</sup> International Symposium on Tomato Diseases. (Eds H. Saygili, F Sahin & Y Aysan) *Acta Horticulturae* **808**, 99–102.
- Koeuth T, Versalovic J & Lupski JR (1995) Differential subsequence conservation of interspersed repetitive *Streptococcus pneumoniae* BOX elements in diverse bacteria. *Genome Research* **5**, 408–418.
- Koike H (1965) The alluminium-cap method for testing sugarcane varieties against leaf scald disease. *Phytopathology* **55**, 317–319.
- Louws FJ, Fulbright DW, Stephens CT & DeBruijn FJ (1994) Specific genomic fingerprints of phytopathogenic *Xanthomonas* and *Pseudomonas* pathovars and strains generated with repetitive sequences and PCR. *Applied and Environmental Microbiology* **60**, 2286–2295.
- Moretti C, Amatulli MT & Buonauro R (2009) PCR-based assay for the detection of *Xanthomonas euvesicatoria* causing pepper and tomato bacterial spot. *Letters in Applied Microbiology* **49**, 466 – 471.
- McGuire RG, Jones JB & Sasser M (1986) Tween media for semiselective isolation of *Xanthomonas campestris* pv. *vesicatoria* from soil and plant material. *Plant Disease* **70**, 887–891.
- Park DS, Shim JK, Kim JS, Lim CK, Shrestha R, Hahn JH & Kim HG (2009) Sensitive and specific detection of *Xanthomonas campestris* pv. *vesicatoria* by PCR using pathovar-specific primers based on rhs family gene sequences. *Microbiological Research* **164**, 36–42.
- Parkinson NM, Cowie C, Heeney J & Stead DE (2009) Phylogenetic structure of *Xanthomonas* determined by comparison of gyrB sequences. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology* **59**, 264–274.
- Paton AM (1958) Pectin decomposing strains of *Pseudomonas*. *Nature* **181**, 61–62.
- Potnis N, Krasileva K, Chow V, Almeida NF, Patil PB, Ryan RP, Sharlach M, Behlau F, Dow JM, Momol MT, White FW, Preston JF, Vinatzer BA, Koebnik R, Setubal JC, Norman DJ, Staskawicz BJ & Jones JB (2011) Comparative genomics reveals diversity among xanthomonads infecting tomato and pepper. *Genomics* **12**, 146.

Schaad NW & Stall RE (1989) *Xanthomonas*. Guide for Identification of Plant Pathogenic Bacteria. APS Press, St Paul (US), 81–94.

Schaad NW, Jones JB & Lacy GH (2001) *Xanthomonas*. Guide for Identification of Plant Pathogenic Bacteria, 2nd edn. APS Press, St Paul (US), 175–200.

Schaad NW & Franken AAJM (1996) *ISTA Handbook on Seed Health Testing Working Sheet No 50 (2nd edn): Xanthomonas campestris pv. campestris*. ISTA, Zurich, Switzerland.

Sharples GJ & Lloyd RG (1990) A novel repeated DNA sequence located in the intergenic regions of bacterial chromosomes. *Nucleic Acids Research* **18**, 6503–6507.

Sijam K, Chang CJ & Gitaitis RD (1991) An agar medium for the isolation and identification of *Xanthomonas campestris* pv. *vesicatoria* from seed. *Phytopathology* **81**, 831–834.

Sijam K, Chang CJ & Gitaitis RD (1992) A medium for differentiating tomato and pepper strains of *Xanthomonas campestris* pv. *vesicatoria*. *Canadian Journal of Plant Pathology* **14**, 182–184.

Stall RE, Beaulieu C, Egel G, Hodge NC, Leite RP, Minsavage GV, Bouzar H, Jones JB, Alvarez AM & Benedict AA (1994) Two genetically diverse groups of strains are included in *Xanthomonas campestris* pv. *vesicatoria*. *International Journal of Systematic Bacteriology* **44**, 47–53.

Stern MJ, Ames GFL, Smith NH, Robinson EC & Christopher FH (1984) Repetitive extragenic palindromic sequences: a major component of the bacterial genome. *Cell* **37**, 1015–1026.

Šutic D (1957) Bakterioze crvenog patlidzana (Tomato bacteriosis). *Posebna Izd. Inst. Zasht. Bilja Beograd (Spec. Edit. Inst. Plant Prot. Beograd)* **6**, 1–65. English summary: Review of Applied Mycology **36**, 734–735.

Vauterin L, Hoste B, Kersters K & Swings J (1995) Reclassification of *Xanthomonas*. *International Journal of Systematic Bacteriology* **45**, 472–489.

Weller SA, Elphinstone JG, Smith NC, Boonham N & Stead DE (2000) Detection of *Ralstonia solanacearum* strains with a quantitative, multiplex, real-time, fluorogenic PCR (TaqMan) assay. *Applied and Environmental Microbiology* **66**, 2853–2858.

Young JM, Park DC, Shearman HM & Fargier F (2008) A multilocus sequence analysis of the genus *Xanthomonas*. *Systematic and Applied Microbiology* **31**, 366–377.

## **Załącznik 1. – Ekstrakcja z nasion**

Zalecane są 2 metody ekstrakcji bakterii z próbki nasion. Pierwsza polega na moczeniu nasion; druga na użyciu homogenizatora laboratoryjnego Stomacher.

### **Moczenie**

Moczyć każdą podpróbkę nasion przez minimum 14 godzin w temp. 4-10°C w 3 ml/g nasion 10 mM buforowanego roztworu soli (PBS, Załącznik 2.) lub wytrząsać przez 2 godziny w temperaturze pokojowej (18-24°C) przy 115rpm. Przefiltrować (np. przez sterylną gazę) i wirować przy 10000-12000 g przez 20 minut w 10°C. Zlać supernatant, a osad zawiesić w 1-1,5 ml sterylnej wody

destylowanej lub 10 mM PBS do uzyskania końcowego stężenia. Przygotować 10-krotne rozcieńczenia i wykonać bezpośrednią izolację.

### **Procedura homogenizacji z użyciem stomachera**

(zalecana przez ISF; [http://www.worldseed.org/isf/ishi\\_vegetable.html](http://www.worldseed.org/isf/ishi_vegetable.html))

Przenieść każdą podpróbkę nasion do sterylnej torebki do homogenizacji (np. 105 x 50 mm) i dodać 3 ml sterylnego PBS-T na gram nasion (Załącznik 2.). Moczyć przez noc (minimum 14h) w lodówce. Miażdżyć nasiona przez 3 minuty przy pomocy stomachera. Pozostawić na 30 minut w temperaturze pokojowej, aby zawiesina zsedymetowała.

Filtrować powstały homogenat przez sterylną gazę i zwirować przesącz w 10000-12000 g przez 20 minut w 10°C. Zlać supernatant, a osad zawiesić w 1-1,5ml sterylnego wody destylowanej do uzyskania końcowego stężenia, Przygotować 10-krotne rozcieńczenia do izolacji bezpośredniej.

Porcję każdego ekstraktu z nasion można zamrozić jako kontrolę i do użycia do kolejnych testów.

### **Załącznik 2. – Bufory i podłoża**

#### **Bufory**

#### **Bufor fosforanowy (PBS) do ekstrakcji z roślin z objawami i nasion (metoda moczenia).**

10 mM PBS, pH 7,2	g/l
Na <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub> x 12H <sub>2</sub> O	2,7g
NaH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub> x 2H <sub>2</sub> O	0,4g
NaCl	8,0g
Woda destylowana	1000ml
Autoklawować 15 minut w 121°C i schłodzić w temperaturze pokojowej	

#### **Bufor fosforanowy z dodatkiem Tween20 (PBS-T) do ekstrakcji bakterii z nasion (metoda z zastosowaniem Stomachera).**

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

\*Zalecany jeśli nasiona były traktowane podchlorynem

#### **Podłoża**

Wszystkie podłoża sterylizować w 121°C przez 15 minut.

#### **Podłoże CTKM agar (Sijam *et al.*, 1992):**

Woda destylowana	900 ml
Pepton sojowy	2,0 g
Trypton	2,0 g
Dekstroza	1,0 g
L-glutamina	6,0 g



L-histydyna	1,0 g
(NH <sub>4</sub> ) <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub>	0,8 g
KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>	1,0 g
MgSO <sub>4</sub> x 7H <sub>2</sub> O	0,4 g
CaCl <sub>2</sub>	0,25 g
Agar mikrobiologiczny	12,0-15,0 g
Autoklaw	
Tween 80*	10 ml

\*Autoklawować osobno i dodać natychmiast po autoklawowaniu podłoża

Po autoklawowaniu i schłodzeniu do ok. 45°C dodać antybiotyki.

Bacitracyna 2 ml (1,0 g w 2,0 ml wody destylowanej);

Siarczan neomycyny 0,5 ml (0,4 g w 20 ml wody destylowanej);

100 ml wody destylowanej zawierającej: 65 mg cefaleksyny, 12 mg 5-fluorouracylu i 0,4 mg tobramycyny.

W razie potrzeby, w celu zahamowania wzrostu grzybów, po autoklawowaniu dodać 35mg/l nystatyny lub 100 mg/l cykoheksimidu.

#### **Zmodyfikowany TMB agar (McGuire *et al.*, 1986):**

Woda destylowana	do 1 l
Bacto pepton	10,0 g
H <sub>3</sub> BO <sub>3</sub>	0,1 g
KBr	10,0 g
CaCl <sub>2</sub> (bezwodny)	0,25 g
Bacto agar	15,0 g
Tween 80*	10 ml

\*Autoklawować osobno i dodać natychmiast po autoklawowaniu podłoża

Po autoklawowaniu i schłodzeniu do ok. 45°C dodać antybiotyki.

Cefaleksyna 65 mg;

5-fluorouracyl 12 mg;

Siarczan tobramycyny 0,2 mg.

W razie potrzeby, w celu zahamowania wzrostu grzybów, po autoklawowaniu dodać 35mg/l nystatyny lub 100 mg/l cykoheksimidu.

#### **Podłoże YGCA (Yeast glucose calcium carbonate agar):**

Woda destylowana	1 l
Ekstrakt drożdżowy	5,0 g
Glukoza	10,0 g
Węglan wapnia (jasny proszek)	30,0 g
Agar mikrobiologiczny	20,0 g

Agar odżywczy (NA): stosować komercyjnie dostępne składniki, takie jak Oxoid CM3 lub Difco.

Dekstroza odżywcza (ND) agar: dodać 1% (w/v) D-glukozy do agaru odżywczego (Oxoid CM3 lub Difco)

#### **Podłoże YDC (Yeast dextrose chalk agar):**

Woda destylowana	1 l
Ekstrakt drożdżowy	10,0 g
Dekstroza (glukoza)	20,0 g
Węglan wapnia (jasny proszek)	20,0 g
Agar mikrobiologiczny	15,0 g

**Podłoże NBY (Nutrient broth yeast extract agar):**

---

Woda destylowana	1 l
Bulion odżywczy	8,0 g
Ekstrakt drożdżowy	2,0 g
K <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub>	2,0 g
KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>	0,5 g
glukoza	2,5 g
Agar mikrobiologiczny	15,0 g

---

**Podłoże YPGA (Yeast peptone glucose agar):**

---

Woda destylowana	500 ml
Ekstrakt drożdżowy Difco	10,0 g
Bacto pepton Difco	20,0 g
D(+) glukoza	20,0 g
Bacto agar Difco	15,0 g

---

Przygotować 500 ml podłoża w kolbie Erlenmayera o pojemności 1l (jeśli jest to konieczne, dla lepszego wzrostu, dodać 50 mg/l hemisarczanu adeniny).

**Podłoże mBS (modified brilliant cresyl blue-starch medium):**

---

Woda destylowana	1 l
Skrobia ziemniaczana	10,0 g
K <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub> x 3H <sub>2</sub> O	3,0 g
KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>	5,0 g
L-metionina	0,25 g
kw. nikotynowy	0,25 g
L-glutamina	0,25 g
Agar techniczny	15,0 g

---

Doprowadzić pH do 6,8-7,0

**Pectate medium (Paton, 1958):**

---

Woda destylowana	1 l
Pepton	5,0 g
Lab-lemco	5,0 g
Mleczan wapnia	5,0 g
Agar No.3 Oxoid	12,0 g
L-glutamina	0,25 g
Agar techniczny	15,0 g

---

Doprowadzić pH do 7,2 i autoklawować

**Pectate overlay ingredients:**

---

Woda destylowana	1 l
Sodium polypectate (np. Herbstreith and Fox, typ CU 902, Neuenbürg, Germany)	2,0 g
Kwas etylenodiaminotetraoctowy (EDTA)	0,1 g
Błękit bromotymolowy	Do uzyskania koloru

---

Stopniowo rozpuszczać polypectate w gorącej wodzie (80°C), ciągle mieszając. Dodać pozostałe składniki; doprowadzić pH do 7,2 i autoklawować w 115°C przez 4 minuty. Rozlewać 5 ml na płytkę na powierzchnię podłoża podstawowego.

**Podłoże Wilbrink (Koike, 1965):**

Woda destylowana	1 l
Pepton specjalny (Oxoid/LP0072)	5,0 g
K <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub> (Merck/1.05101.)	0,5 g
MgSO <sub>4</sub> x 7H <sub>2</sub> O (Merck/1.05886.)	0,25 g
Sacharoza (Fluka/84100)	10,0 g
Agar techniczny no.3 (Oxoid/LP0013)	18,0 g

Doprowadzić pH do 7,0 przed dodaniem agaru.

#### **Zmodyfikowane podłoże MXV (Sijam *et al.*, 1991):**

Woda destylowana	1 l
Ekstrakt drożdżowy	0,5 g
K <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub>	0,8 g
KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>	0,8 g
Chlorek amonu	1,0 g
Laktoza	10,0 g
Trehaloza	4,0 g
Kwas tiobarbiturowy	0,1 g
Agar mikrobiologiczny	15,0 g
Tween 80*	10 ml

\* Autoklawować osobno i dodać natychmiast po autoklawowaniu podłoża

Doprowadzić pH do 7,4

Po autoklawowaniu i ochłodzeniu do około 45°C, dodać następujące antybiotyki:

Cefaleksyna	32,5 g
Bacytracyna	100 mg
5-fluorouracyl	6 mg
Siarczan neomycyny	6750 µg
Siarczan tobramycyny	0,2 mg
cykloheksimid	100 mg

#### **Podłoże NSCAA (nutrient starch cycloheximide antibiotic agar) (Schaad & Franken, 1996):**

Woda destylowana	1 l
Skrobia ziemniaczana	15 g
Agar odżywczy	23 g

Po autoklawowaniu i ochłodzeniu do około 45°C, dodać następujące antybiotyki:

Cykloheksimid (Sigma/C-7698) 200 mg/l w metanolu

Nitrofurantoina (Sigma/N-7878) 10 mg/l w dimetyloformamidzie

Vankomycyna (Sigma/V-2002) 0,5 mg/l w wodzie destylowanej.

#### **Parametry walidacyjne dla podłoży**

*Parametry walidacyjne dla izolacji z roślin z objawami na podłoża Wilbrink i NSCAA*

Granica wykrywalności na NSCAA wynosiła 1,06 x 10<sup>3</sup> jtk/ml i dla podłoża Wilbrink 3,8 x 10<sup>3</sup> jtk/ml.

*Parametry walidacyjne dla izolacji ekstraktu z nasion na pół-selektywne modyfikowane podłoża MXV i TMB*

Granica wykrywalności na pół-selektywnym podłożu mMXV i mTMB określono na poziomie 53 jtk/ml (*X. euvesicatoria*), 24 jtk/ml (*X. vesicatoria*), 94 jtk/ml (*X. gardneri*) i 34 jtk/ml (*X. perforans*). Niższe wykrywalne stężenia różnią się znacznie między próbkami i pół-selektywnymi podłożami. Szczególnie na podłożu pół-selektywnym mTMB, najniższe wykrywalne stężenie waha

się między próbkami od 1,7 do 16900 jtk/ml (*X. perforans*). Zróżnicowanie pomiędzy próbkami dla podłoża pół-selektywnego mMXV jest znacznie mniejsze, z najniższym wykrywanym stężeniem w zakresie od 16,9 do 169 jtk/ml (*X. perforans*).

### Załącznik 3. – konwencjonalne testy PCR wg Koenraadt *et al.* (2009)

#### 1. Informacje ogólne

1.1. Dostępne są 2 konwencjonalne testy duplex-PCR pozwalające rozróżnić 4 opisane gatunki: *X. euvesicatoria*, *X. vesicatoria*, *X. gardnerii* i *X. perforans*. Specyficzne regiony zostały zidentyfikowane dla każdego z 4 opisanych gatunków, przy użyciu analizy polimorfizmu długości amplifikowanych fragmentów (AFLP). Bazując na sekwencji tych markerów, opracowano 4 kombinacje starterów (Bs-XeF/Bs-XeR, BsXvF/Bs-XvR, Bs-XgF/Bs-XgR i Bs-XpF/Bs-XpR) amplifikujących fragmenty specyficzne dla każdego z czterech gatunków (Koenraadt *et al.*, 2009). Amplifikacja zachodzi w dwóch odrębnych reakcjach. Każda z nich zawiera kombinację dwóch par starterów (test duplex-PCR). Dodatkowo do każdej amplifikacji włącza się kontrolę wewnętrzną - dodatkową parę starterów BAC16-F/BAC16-R, amplifikującą fragment genu 16S rRNA o wielkości 466 pz.

1.2. Test może być stosowany do badania kolonii bakteryjnych.

1.3. Oligonuklotydy:

*Xanthomonas euvesicatoria*

Bs-XeF: 5'-CAT GAA GAA CTC GGC GTA TCG-3'

Bs-XeR: 5'-GTC GGA CAT AGT GGA CAC ATA C-3'

*Xanthomonas vesicatoria*

Bs-XvF: 5'-CCA TGT GCC GTT GAA ATA CTT G-3'

Bs-XvR: 5'-ACA AGA GAT GTT GCT ATG ATT TGC-3'

*Xanthomonas gardnerii*

Bs-XgF: 5'-TCA GTG CTT AGT TCC TCA TTG TC-3'

Bs-XgR: 5'-TGA CCG ATA AAG ACT GCG AAA G-3'

*Xanthomonas perforans*

Bs-XpF: 5'-GTC GTG TTG ATG GAG CGT TC-3'

Bs-XpR: 5'-GTG CGA GTC AAT TAT CAG AAT GTG G-3'

Kontrola wewnętrzna 16S rRNA

BAC16S-F: 5'-TCC TAC GGG AGG CAG CAG T-3'

BAC16S-R: 5'-GGA CTA CCA GGG TAT CTA ATC CTG TT-3'

1.4. Wielkość ampliconów w parach zasad (pz):

startery BS-XeF/R 173 pz;

startery Bs-XvF/R 138 pz;

startery Bs-XpF/R 197 pz;

startery Bs-XgF/R 154 pz;

startery BAC16S-F/R (kontrola wewnętrzna) 466 pz.

1.5. Enzym: platinum Taq polymerase (Invitrogen/Life Technologies, US).

#### 2. Metody

Ekstrakcja i oczyszczanie kwasów nukleinowych: kolonię z czystej kultury zawiesić w 100 µl wody do biologii molekularnej. Do kontroli negatywnej izolacji (NIC) użyć 100 µl wody do biologii molekularnej. Zgodnie z protokołem „High Pure PCR Template Preparation Kit” (Roche, Szwajcaria), DNA izolować z bakteryjnej zawiesiny około  $1 \times 10^8$  jtk/ml.

### 2.1. Łańcuchowa reakcja polimerazy (PCR).

Odczynniki (stężenie robocze w nawiasach)	<i>X. euvesicatoria</i>		<i>X. gardneri</i>	
	<i>X. vesicatoria</i> µl/reakcję	stężenie końcowe	<i>X. perforans</i> µl/reakcję	stężenie końcowe
woda do biologii molekularnej	15,75		15,0	
bufor reakcyjny PCR Rxn (10 x Invitrogen)	2,5	1x	2,5	1x
MgCl <sub>2</sub> (50 mM, Invitrogen)	0,75	1,5 mM	1,5	3,0 mM
dNTP (10 mv każdy)	0,5	0,2 mM	0,5	0,2 mM
BS-XeF (10 µM)	0,5	0,2 µM	-	
BS-XeR (10 µM)	0,5	0,2 µM	-	
BS-XvF (10 µM)	1,0	0,4 µM	-	
BS-XvR (10 µM)	1,0	0,4 µM	-	
BS-XgF (10 µM)	-		0,75	0,3 µM
BS-XgR (10 µM)	-		0,75	0,3 µM
BS-XpF (10 µM)	-		0,75	0,3 µM
BS-XpR (10 µM)	-		0,75	0,3 µM
BAC16S-F (10 µM)	0,15	0,06 µM	0,15	0,06 µM
BAC16S-R (10 µM)	0,15	0,06 µM	0,15	0,06 µM
platinum Taq (5U/µl, Invitrogen)	0,2	1 U	0,2	1 U
razem	23,0		23,0	

### 2.2. Warunki reakcji PCR:

2 min. w 94°C,  
40 cykli: 30 sek. w 95°C,  
30 sek. w 64°C,  
30 sek. w 72°C,  
10 min. w 72°C  
chłodzenie w 20°C.

## 3. Istotne informacje dotyczące procedury

### 3.1. Kontrole:

Dla uzyskania rzetelnych wyników testów, wymienione poniżej kontrole powinny być włączane do każdej serii izolacji i amplifikacji kwasów nukleinowych organizmu docelowego:

- Kontrola negatywna izolacji (NIC) do monitorowania kontaminacji podczas ekstrakcji kwasów nukleinowych: jako NIC stosować 100 µl wody do biologii molekularnej.
- Kontrola pozytywna izolacji (PIC) dla zapewnienia odpowiedniej jakości i ilości wyizolowanych kwasów nukleinowych. Jako PIC stosować zawiesinę  $10^9$  jtk/ml *X. vesicatoria* (podczas badań wydajności, stosowano izolat PD6003).
- Kontrola negatywna amplifikacji (NAC) stosowana w celu wykluczenia wyników fałszywie pozytywnych, których przyczyną może być kontaminacja podczas przygotowania mieszaniny reakcyjnej do PCR: stosować wodę do biologii molekularnej, która używana była do przygotowania mieszaniny reakcyjnej.
- Pozytywne kontrole amplifikacji (PACs) stosowane są w celu monitorowania wydajności

amplifikacji kwasów nukleinowych każdego z docelowych organizmów:

PAC Xe: DNA z *X. euvesicatoria*  $10^9$  jtk/ml (np. PD 3562)

PAC Xv: DNA z *X. vesicatoria*  $10^9$  jtk/ml (np. PD 5212)

PAC Xp: DNA z *X. perforans*  $10^9$  jtk/ml (np. PD 5515)

PAC Xg: DNA z *X. gardneri*  $10^9$  jtk/ml (np. PD 5842)

Dodatkowo oprócz kontroli zewnętrznych (PIC i PAC), stosować wewnętrzną kontrolę pozytywną (IPC) pozwalającą monitorować każdą próbkę z osobna. W tym celu do każdej amplifikacji włącza się parę starterów BAC16-F/BAC16-R (amplifikacja endogennego kwasu nukleinowego, wewnętrzna kontrola 16S rRNA kontrola wewnętrzna). Amplifikowany jest fragment genu 16S rRNA o wielkości 466 pz.

### 3.2. Interpretacja wyników

*Weryfikacja kontroli*

- NIC i NAC – nie powinien powstawać produkt amplifikacji
- PIC i PAC – powinien powstawać produkt odpowiedniej wielkości:
  - X. euvesicatoria* – produkt wielkości 173 pz
  - X. euvesicatoria* – produkt wielkości 138 pz
  - X. perforans* – produkt wielkości 197 pz
  - X. gardneri* – produkt wielkości 154 pz
- IPC genu 16S rRNA powinna dawać produkt wielkości 466 pz

*Gdy powyższe warunki są spełnione:*

- Test jest uznawany za pozytywny, gdy powstają amplikony o wielkościach wskazanych powyżej dla PIC i PAC
- Test jest uznawany za negatywny, jeżeli nie powstają produkty, lub powstają produkty innej wielkości
- Test powinien zostać powtórzony, jeżeli uzyskano wyniki sprzeczne lub niejasne.

## 4. Dostępne parametry walidacyjne

### 4.1. Czulość analityczna

dla *X.gardneri* czulość analityczna wynosiła  $2,5 \times 10^6$  jtk/ml,

dla *X. perforans*  $1,9 \times 10^7$  jtk/ml,

dla *X. euvesicatoria*  $5,5 \times 10^5$  jtk/ml,

dla *X. vesicatoria*  $1,6 \times 10^6$  jtk/ml.

### 4.2. Specyficzność

U pięćdziesięciu trzech izolatów dawnego *Xanthomonas campestris* pv. *vesicatoria* analizowano sekwencję genu *AvrBs2* (stosowany jako materiał odniesienia na podstawie protokołu Quarantine Barcoding of Life (QBOL)) i przypisano izolaty do następujących gatunków:

27 *X. euvesicatoria*, 3 *X. gardneri*, 7 *X. perforans*, 12 *X. vesicatoria* i 4, które na podstawie analizy genu *AvrBs2* nie mogły zostać zakwalifikowane do żadnego z gatunków.

Na podstawie przeprowadzonego testu PCR 53 izolaty przypisano do gatunków: 27 *X. euvesicatoria*, 5 *X. gardneri*, 5 *X. perforans*, 12 *X. vesicatoria* i 4, które nie zostały sklasyfikowane.

2 izolaty zidentyfikowane przy użyciu sekwencjonowania jako *Xanthomonas perforans* i 1 jako *Xanthomonas gardneri* nie zostały zidentyfikowane przy użyciu testu PCR. Dwa izolaty zidentyfikowane przy pomocy testu PCR jako *Xanthomonas gardneri*, nie zostały zidentyfikowane przy użyciu sekwencjonowania. Wszystkie pozostałe izolaty zostały zidentyfikowane jako należące do tego samego gatunku zarówno za pośrednictwem sekwencjonowania jak i testu PCR. Dodatkowo, specyficzność metody testowano z użyciem 21 izolatów bakterii, które mogą występować na pomidorze lub papryce: *Clavibacter michiganensis* subsp. *michiganensis*, *Ralstonia*

*solanacearum*, *Pseudomonas syringae* pv. *tomato*, *Pseudomonas syringae* pv. *syringae*, *Agrobacterium tumefaciens*, *Pseudomonas corrugata*. Pięć z 21 izolatów (2 *Pseudomonas syringae* pv. *syringae* i 3 *Pseudomonas corrugata*) dały w teście duplex PCR słabe (niespecyficzne) amplikony dla *X. gardneri*/*X. perforans* (bliskie 154 i 197 pz), ale nie uzyskano produktu w teście duplex PCR dla *X. euvesicatoria*/*X. vesicatoria*. Podkreśla to ryzyko nieprawidłowej identyfikacji *X. gardneri* i *X. perforans*.

4.3. Powtarzalność:93%

4.4. Odtwarzalność:100%