

Diagnostyka¹

Xanthomonas axonopodis pv. *citri*

Wprowadzenie

Xanthomonas axonopodis pv. *citri* (wcześniej *Xanthomonas campestris* pv. *citri*) jest czynnikiem sprawczym raka bakteryjnego cytrusowych. Patogen powoduje powstawanie zmian martwiczych na liściach, łodygach i owocach. W ciężkim stadium spowodować może defoliację, powstawanie skaz na owocach, przedwczesne opadanie owoców, obumieranie gałązek i ogólne pogarszanie się stanu drzewa. Stwierdzono występowanie w rodzinie *Rutaceae*, przy czym gatunki z rodzaju *Citrus* mają największe znaczenie gospodarcze. Znany jest fakt występowania naturalnych infekcji w przypadku hybryd z rodzaju *Citrus* oraz w przypadku *Poncirus trifoliata*, *Fortunella japonica*, *Fortunella margarita*, *Severinia buxifolia* i *Swinglea glutinosa*. Choroba występuje w Azji, Afryce, Ameryce Północnej, Ameryce Południowej oraz Oceanii (EPPO/CABI, 1997). Kilka patotypów zostało rozpoznanych pośród *X. a. citri*. Występują różne, powodowane przez odmiany tego samego czynnika sprawczego, typy raka bakteryjnego, które poza ustalonymi charakterystykami genotypowymi rozróżniane są głównie na podstawie ich pochodzenia geograficznego i zasięgu występowania żywicieli. Patotyp A jest najbardziej rozpowszechniony i ma największy zasięg i powoduje azjatycką bakteriozę cytrusów (CBC-A). Patotyp B ograniczony jest do cytryn, jednakże lima meksykańska, pomarańcza gorzka i pomarańcza olbrzymia są również podatne (CBC-B). Patotyp C jest ograniczony do limy meksykańskiej (*C. aurantifolia*) (CBC-C). Te dwa typy bakteriozy zostały opisane w Ameryce Południowej i zostały stopniowo wyparte przez CBC-A. Dwie grupy szczepów o ograniczonym zasięgu zostały niedawno zidentyfikowane w obrębie patotypu A (Vernière *et al.*, 1998; Sun *et al.*, 2000) i oznaczone jako A* i A^W. Są one blisko spokrewnione ze szczepami typu A (Cubero & Graham, 2002, 2004) ale oddziałują tylko na limę meksykańską i Alemow. Pojawiła się propozycja ograniczenia nazwy *X. a. citri* do patotypu A i stosowania *Xanthomonas axonopodis* pv. *Aurantifolii* dla patotypów B i C (Vauterin *et al.*, 1995). Pomimo faktu, iż te odrębne nazwy były szeroko i powszechnie używane, propozycja nie została zatwierdzona przez Komitet Taksonomii Bakterii Patogenicznych dla Roślin. Wszystkie szczepy są więc wciąż postrzegane jako *X. a. citri*. Inna choroba, czarna plamistość bakteryjna cytrusowych, jest powodowana przez *Xanthomonas*, którego szczepy są określane jako *Xanthomonas axonopodis* pv. *citrumelo* (Rossetti, 1977; Gottwald *et al.*, 1991). Odnotowana tylko na Florydzie (USA), została w przeszłości mylnie określona jako patotyp E *X. c. citri*. Podobnie szczep oryginalnie nazwany patotypem D *X. c. citri* został odnotowany w Meksyku. Choroba, z którą był wiązany jest obecnie przypisywana grzybowi *Alternaria limicola* i status samych szczepów bakterii jest niejasny. Przytoczone powyżej patotypy określane jako D i E nie zostały ujęte w niniejszym protokole.

¹Dane liczbowe zawarte w niniejszym opracowaniu oznaczone jako 'Web Fig.' dostępne są na stronie EPPO www.eppo.org.

Tożsamość

Nazwa: *Xanthomonas axonopodis* pv. *citri* (Hasse) Vauterin et al. (1995)

Synonimy: *Pseudomonas citri* Hasse, *Xanthomonas citri* (Hasse) Dowson, *Xanthomonas citri* f.sp. *aurantifoliae* Namekata & Oliveira, *Xanthomonas campestris* pv. *citri* (Hasse) Dye 1978, *Xanthomonas campestris* pv. *aurantifolii* Gabriel et al., *Xanthomonas citri* (ex Hasse) nom. rev. Gabriel et al., *Xanthomonas axonopodis* pv. *aurantifolii* Vauterin et al.

Stanowisko taksonomiczne: *Bacteria: Gracilicutes*

Kod komputerowy EPPO: XANTCI

Kategoria fitosanitarna: EPPO A1 lista nr 1; EU Załącznik II/A1

Wykrywanie

Objawy choroby

X. a. citri zazwyczaj występuje na nadziemnych częściach żywiciela. W przypadku liści, z powodu nasiąkania tkanki wodą, zmiany w postaci oleistych plamek wielkości główki od szpilki, pojawiają się najpierw po spodniej stronie liścia. Później zmiany stają się widoczne na obu powierzchniach epidermy jako lekko wypukłe krosty lub wykwit z pęcherzykami. Kiedy zmiany postępują, zwiększa się ich rozmiar, epiderma pęka i zmiany stają się pękające, gąbczaste lub korkowate. Następnie krosty ciemnieją i stają się cieńsze, lekko ciemnobrązowe, korkowate i szorstkie w dotyku. Ostatecznie ich środek przybiera kształt podobny do krateru i może wypadać, pozostawiając dziurę. Objawy diagnostyczne to hiperplazja tkanek skutkująca zrakowaceniami z nasiąkniętymi wodą brzegami i żółte pierścienie otaczające zmiany. Na gałązkach objawy są podobne: wypukłe, korkowate zmiany o początkowo oleistym lub wodnistym obrzeżu. Zmiany mają zazwyczaj nieregularny kształt i mogą być zapadnięte. Krosty mogą się łączyć, ale chloroza zazwyczaj nie obejmuje zmian na gałązkach. Po usunięciu korkowatej warstwy, ciemnobrązowe zmiany są widoczne na zdrowej, zielonej tkance.

Zmiany na owocach mogą pojawić się kiedy są one wciąż małe i zielone i są podobne do tych na liściach, zwykle jednak mają bardziej podniesione brzegi i wklęsły środek. Powstałe kraterki nie sięgają daleko w głąb skórki. Żółte chlorotyczne pierścienie mogą, ale nie muszą być obecne.

Objawy raka bakteryjnego cytrusowych mogą zostać pomyłone z parchem cytrusów powodowanym przez *Elsinoe fawcettii* na owocach słodkiej pomarańczy, liściach, owocach i gałęziach cytryn oraz na liściach Rangpur. Występuje też pewne podobieństwo do antraknozy (*Glomerella ingulata*) w przypadku owoców i melanozy (*Diaporthe citri*) w przypadku liści.

Badania przesiewowe

Żeby potwierdzić obecność *X. a. citri*, konieczne jest wyizolowanie bakterii ze zmian i przeprowadzenie testów patogeniczności na cytrusowych. Jednakże, ze względu na trudność izolowania *X. a. citri*, szczególnie z roślin bez objawów lub części roślin, test przesiewowy

PCR ze specyficznymi starterami jest rekomendowany jako jedyna wiarygodna metoda szybkiej analizy podejrzanych próbek. Immunofluorescencja także może zostać zastosowana, ale żadne komercyjne przeciwciała nie zostały jeszcze poddane ocenie. Monoklonalne przeciwciała są dostępne dla testu ELISA, ale zaleca się ich stosowanie do identyfikacji czystych kultur, z powodu niskiej czułości.

Ekstrakcja DNA z zainfekowanej tkanki cytrusowych

Protokół ekstrakcji DNA powinien zostać użyty przed amplifikacją z materiału roślinnego. Oryginalna ekstrakcja DNA wg. Hartung *et al.* (1993) została wykonana wg zaleceń protokołu CTAB, ale istnieją także metody nie wymagające fenolu (Llop *et al.*, 1999). Zmiany lub inny podejrzany o infekcję materiał roślinny cięte są na małe kawałki, pokrywane buforem PBS i umieszczane na wytrząsarce na 20 minut w temperaturze pokojowej. Supernatant jest filtrowany i wirowany przez 20 minut z przyspieszeniem 10 000 g. Z osadu tworzy się zawiesinę w 1 ml PBS. 500 µl zachowuje się do późniejszej analizy lub bezpośredniej izolacji na podłożu agarowym. 500 µl próbki wiruje się przez 10 minut z przyspieszeniem 10 000 g. Z osadu i 500 µl buforu ekstrakcyjnego (200 mM Tris HCl pH 7,5, 250 mM NaCl, 25 mM EDTA, 0,5% SDS, 2% PVP) tworzy się zawiesinę i pozostawia na godzinę w temperaturze pokojowej z ciągłym wstrząsaniem. Zawiesina jest wirowana przez 5 minut z przyspieszeniem 5000 g, 450 µl supernatantu przenosi się i dodaje 450 µl izopropanolu. Zawiesinę miesza się delikatnie i pozostawia na 1 godzinę w temperaturze pokojowej. Strącanie może zostać wspomoczone poprzez zastosowanie zestawu Pellet Paint Coprecipitant (Novagen, Darmstadt, DE) (Cubero *et al.*, 2001). Zawiesina jest wirowana przez 10 minut z przyspieszeniem 13000 g, supernatant odrzuca się, a osad suszy. Z osadu i 100 µl wody tworzy się zawiesinę. 5 µl próbki jest używane w 50 µl reakcji PCR.

Startery używane w teście PCR

Do diagnozowania *X. a. citri* dostępnych jest kilka zestawów starterów. Na podstawie Hartung *et al.* (1993), startery 2 (5'-CAC GGG TGC AAA AAA TCT-3') i 3 (5'-TGG TGT CGT CGC TTGTAT-3') pozwalają na amplifikację odcinka DNA o długości 222 par zasad wyłącznie w szczepach A i są najczęściej używane w testach na materiale roślinnym. Startery J-pth1 (5'-CTTCAACTCAAAC- GCCGGAC-3') oraz J-pth2 (5'-CATCGCGCTGTTCGGGAG-3') oparte o sygnał lokalizacji jądrowej w genie wirulencyjnym *pthA* pozwalają na amplifikację odcinka o długości 197 par zasad w szczepach A, B i C (Cubero & Graham, 2002) ale pokazały niską czułość w przypadku materiału roślinnego. Startery J-Rxg (5'- GCGTTGAGGCTGAGACATG-3') i J-RXc2 (5'-CAAGTTGCCTCGGAGCTATC-3'), bazujące na wewnątrznie transkrybowanym regionie (ITS) pomiędzy genami 16S i 23S, także były stosowane do ogólnej identyfikacji na czystych kulturach szczepów typu A (Cubero & Graham, 2002).

Do amplifikacji ze starterami 2 i 3, mieszanina reakcyjna PCR przygotowywana jest w sterylnej fiołce (na 50 µl reakcji): bufor PCR (50 mM Tris HCl pH 9, 20 mM NaCl, 1% Triton ×100, 0.1% r-r żelatyny, 3 mM MgCl₂), 1 µm każdego startera, 200 µm d-NTP i 1,25

jednostki polimerazy DNA *Taq*.

Składniki miesza się i 45 µl mieszaniny przenosi do sterylnych fiolek PCR. Fiolki wraz z mieszaniną reakcyjną PCR przechowuje się w lodzie. 5 µl wyekstrahowanego DNA, kontrola wodna i kontrola pozytywna są dodawane w podanej kolejności do fiolek z mieszaniną reakcyjną PCR. Fiolki umieszcza się w bloku grzewczym termocyklera i uruchamia następujący program: 35 cykli po 70 s w temperaturze 95°C (denaturacja), 70 s w temperaturze 58°C (przyłączanie starterów), 60 s w temperaturze 72°C (elongacja). Produkt PCR jest analizowany i fiolki przechowywane są w temperaturze 4°C w przypadku użycia tego samego dnia, lub w temperaturze -20°C w przypadku dłuższego okresu. Odcinki PCR 222 par zasad powinny być wykryte w próbkach pozytywnych w 2% żelu agarozowym po elektroforezie i zabarwieniu bromkiem etydyny. Kontrola wodna powinna być negatywna w każdym przypadku. Jeśli jest pozytywna, test należy powtórzyć.

Para starterów 2/3 jest najpowszechniej używana. Para 4/7 [4-5'-TGT CGT CGT TTG TAT GGC-3'; 7-5'-GGG TGC GAC CGT TCA GGA-3'] udowodniła swoją skuteczność w identyfikacji szczepów typu A i pokazuje zmienne rezultaty dla szczepów B i C (Vernière *et al.*, 1998). Zagnieżdżony PCR, immunocapture i wykrywanie kolorymetryczne zagnieżdżonych produktów PCR dla bezpośredniej i wrażliwej detekcji *X. a. citri* w roślinach także zostały opracowane (Hartung *et al.*, 1996).

W celu identyfikacji lub detekcji w materiale roślinnym *X. a. citri* na podstawie genu *pth*, reakcje PCR są przeprowadzane w ilości 25 µl zawierającej 1× bufor *Taq*, 3 mM MgCl₂, 0,1 µM koncentratu starterów J-*pth*1 i J-*pth*2, 0,2 mM d-NTP mix, 1 U polimerazy *Taq* oraz 5 µl wyekstrahowanego DNA. Warunki reakcji amplifikacji składają się z 93°C przez 30 s, 58°C przez 30 s i 72°C przez 45 s dla 40 cykli plus etap inicjalny: 94°C przez 5 min i końcowy: 72°C przez 10 min. Dla identyfikacji szczepów typu A bazującej na starterach rybosomowych, reakcja PCR jest przeprowadzana w ilości 25 µl zawierających 1× bufor *Taq*, 1,5 mM MgCl₂, 0,04 µM koncentratu starterów J-RXg i J-RXc2, 0,2 mM d-NTP mix, 1 U polimerazy *Taq* i 5 µl wyekstrahowanego DNA z tym samym profilem PCR jakiego używały inne startery. Produkty PCR są wizualizowane i barwione jak powyżej.

PCR w czasie rzeczywistym także był stosowany dla ilościowego PCR i natychmiastowej, przeprowadzanej na miejscu identyfikacji tej bakterii w materiale roślinnym, ale nie był porównywany ze standardowym lub zagnieżdżonym PCR w rutynowej kontroli.

Izolacja

Izolacja w kulturze jest możliwa z owocu, liścia lub zmian łodygi. Małe fragmenty nasiąkniętej wodą tkanki z obrzeży zmian są wycinane za pomocą sterylnego skalpela lub żyłki. Tkanka jest cięta lub dzielona w kostkę w kropli sterylnej wody destylowanej. Otrzymana zawiesina jest przenoszona na standardowy nośnik kultur, jak pożywka agarowa z 0,1% w/v d-glukozą (NGA) lub YPGA (0,5% pepton, 0,5% wyciąg drożdżowy, 1% glukoza, 1,5% agar). Niektóre szczepy B i C są zgłaszane jako trudne do wyizolowania i mogą być wstępnie hodowane na 1% sacharozie, 0,5% pepton, 0,05% K₂HPO₄, 0,03% MgSO₄ i oczyszczonym agarze (Canteros *et al.*, 1985). Po wstępnym wyhodowaniu szczepy przystosowują się do innych pożywek. Semi-selektywna izolacja może być osiągnięta na podłożu KCB, zawierającym NGA uzupełnione

kasugamycyną ($16 \mu\text{g mL}^{-1}$), cefaleksyną ($16 \mu\text{g mL}^{-1}$) i Bravo lub Daconil ($12 \mu\text{g a.i. mL}^{-1}$). Dla próbek izolowanych ze środowiska należy zastosować niższe stężenie glukozy (0,01%). Kolonie na podłożach agarowych są koliste, wypukłe, śluzowe, błyszczące i żółte; nie da się ich odróżnić na podstawie charakterystyki morfologicznej od tych ze szczepów *Xanthomonas campestris* pv. *campestris* lub *X. a. citrumelo*.

Identyfikacja

Ogólna charakterystyka Xac

Ogólna charakterystyka szczepów bakteryjnych może zostać zastosowana po izolacji w celu ułatwienia identyfikacji na poziomie gatunków. Metody wykonywania fizjologicznych i biochemicznych testów są dostępne w instrukcjach laboratoryjnych (Lelliott & Stead, 1987; Schaad, 1988; Schaad *et al.*, 2001). *X. a. citri* jest mającą kształt pałeczki Gram-ujemną bakterią tlenową z pojedynczą polarną wicią, producentem xanthomonadin, oksydazo-ujemną, katalazo-dodatnią, ureazo-ujemną, kazeino i eskulino hydrolizo dodatnią; azotany nie zredukowane; kwas jest produkowany z arabinozy, glukozy, sacharozy, mannozy, galaktozy i trehalozy. Patotypy A, B i C oraz *X. a. citrumelo* nie są łatwo rozróżnialne ze względu na ich charakterystykę biochemiczną i fizjologiczną.

Testy patogeniczności

X. a. citri i jego patotypy powinny być identyfikowane przez patogeniczność na panelu wskaźników żywicieli takich jak grejpfrut Duncana, słodka pomarańcza Valencia lub lima meksykańska dla potwierdzenia diagnozy. Testy liści w podejrzanym uprawach żywicieli *Citrus* pozwalają na szybką i dokładną ocenę szczepów bakteryjnych. Zmiany rozwijają się 7-14 dni po inokulacji ninaruszonych lub oderwanych liści. Dzięki tym testom, płaskie zmiany cechujące *X. a. citrumelo* mogą łatwo zostać odróżnione od erupcyjnych, podobnych do zrogowaceń reakcji *X. a. citri*. Bakterie hodowane są w podłożu płynnym lub komórki zeszkrobane z pytek agarowych ze świeżym posiewem i zawieszane w sterylnej, destylowanej wodzie w celu inokulacji cytrusów. Koncentracja jest dostosowywana od 10^6 do 10^8 cfu mL^{-1} . Liście mogą także zostać zaszczepione wodnym ekstraktem zmian. Kontrola negatywna powinna zawsze zostać dołączona i kontrola pozytywna kiedy to możliwe. Rośliny zaszczepione szczepem kontroli pozytywnej powinny być trzymane oddzielnie od innych testowanych roślin.

Testy nienaruszonych liści

Za pomocą strzykawki bez igły do liści cytrusów podaje się zawiesinę bakteryjną poprzez delikatne naciskanie tępym końcem na odosiową stronę liścia dopóki około 2 cm^2 liścia nie zostaną nasączone wodą. Sześć różnych szczepów może zostać zaszczepionych w tym samym liściu, po trzy po każdej stronie żyły środkowej. Liście obserwuje się następnie pod kątem rozwoju przerostu tkanki. Objawy zwykle mogą zostać zauważone po 7-14 dniach od inkubacji w szklarni w temperaturze około 25°C , takie jak zmiany z podniesionym brzegiem

otaczające lekko chlorotyczny obszar. Podniesiony brzeg staje się następnie wyraźny, chropowaty i korkowaty, centralny obszar zmiany staje się martwiczy i zapadnięty; zmiany martwicze mogą się oddzielić i liście odpaść po kilku tygodniach.

Testy oddzielonych liści

Oddzielone, w pełni rozwinięte ale wciąż niedojrzałe listki grejpfruta lub innego podejrzanego cytrusa powinny być powierzchniowo sterylizowane w 70% etanolu przez 1 min. Są one dwukrotnie płukane w sterylnej wodzie i umieszczane aseptycznie na 1% wodnej pożywce agarowej z wyeksponowaną osiową powierzchnią liścia. Trójkąt jest wycinany po każdej stronie żyły środkowej za pomocą sterylnej skalpela i 20 μl zawiesiny bakteryjnej jest umieszczane na każdym nacięciu. Liście inkubuje się w komorze wzrostu w temperaturze 28°C i obserwuje pod kątem rozwoju przerostu tkanek po 7-14 dniach.

Szczepienie roślin rosnących in vitro

Użycie roślin *in vitro* do szczepienia zapewnia większe bezpieczeństwo. Podatne odmiany grejpfrutów takie jak „Marsh” lub słodkiej pomarańczy takiej jak „Parson Brown” mogą zostać wykorzystane. Sadzonki wzrastają w sterylnych warunkach w roztworze soli Murashige i Skoog poprzez umieszczenie kropli około 10^9 cfu mL^{-1} w zranionych liściach. Inkubacja w temperaturze 25 –28°C przez 7-14 dni jest konieczna dla pojawienia się symptomów (López & Navarro, 1981).

Pośredni test ELISA

Zestawy do testu ELISA zawierające wszystkie komponenty niezbędne do identyfikacji *X. a. citri* są komercyjnie dostępne od Agdia (US). Próbki kontroli pozytywnej są także dostępne na rynku od producentów. Używaną metodą jest pośredni test ELISA przez detekcję z monoklonalnymi przeciwciałami opisany przez Alvarez *et al.* (1991). W teorii wszystkie szczepy mogą zostać zidentyfikowane, zostało jednak zgłoszonym, że pewne fenotypowo odmienne szczepy typu A wyizolowane w południowo-zachodniej Azji nie reagują z monoklonalnymi przeciwciałami. Czulość wykrywania w symptomatycznym materiale roślinnym wynosi około 10^6 cfu mL^{-1} .

W celu identyfikacji czystych kultur, zawiesiny wiruje się przy około 10 000 obrotów min^{-1} przez 2 min i odrzuca supernatant. Dodaje się 1 ml buforu $1\times$ PBS i ponownie zawiesza komórki poprzez wirowanie. Operację powtarza się jeszcze dwa razy. Po trzecim płukaniu komórki ponownie zawiesza się w buforze powlekającym. Koncentracja bakterii jest dostosowywana spektrofotometrycznie do OD₆₀₀ 0,01 (około $2,5 \times 10^7$ cfu mL^{-1}). Po 100 μl każdej próbki umieszcza się na płytkach mikrotitracyjnych ELISA (dwie studzienki na próbkę). Studzienki próbki kontroli pozytywnej (z kultury referencyjnej lub dostarczona przez producenta) oraz kontroli buforu powinny zostać dołączone. Płytki inkubuje się przez noc w temperaturze 37°C do wyschnięcia. 200 μl roztworu blokującego jest dodawanych do każdej studzienki (5% beztłuszczowe mleko w proszku w buforze PBS, 0,05 komponentu

blokującego na ml buforu). Płytki inkubuje się przez 30 min. w temperaturze pokojowej i myje dwukrotnie z $1\times$ PBST. 100 μ l przygotowanych przeciwciał pierwotnych jest dozowanych (przygotowanych w odpowiednim rozcieńczeniu w roztworze 2,5% mleka w proszku w PBST). Płytki inkubuje się przez 1 h w temperaturze pokojowej i płucze się pięć razy w buforze $1\times$ PBST. 100 μ l przygotowanego koniugatu enzymu na studzienkę jest dozowanych (przygotowanych w odpowiednim rozcieńczeniu w roztworze 2,5% mleka w proszku w PBST).

Płytki inkubuje się przez 1 h w temperaturze pokojowej. Po pięciokrotnym wypłukaniu płytek w buforze $1\times$ PBST, do każdej studzienki dodaje się po 100 μ l świeżo przygotowanego roztworu substratu zawierającego 1 mg mL^{-1} p-nitrofenylofosforanu w buforze z dietanolaminą, o pH 9,8. Płytki inkubuje się przez 30-60 min. w temperaturze pokojowej. O.D. jest mierzone za pomocą czytnika płytek przy 405 nm. Kontrola pozytywna powinna być przynajmniej $2\times$ O.D. kontroli negatywnej na każdej płycie.

Identyfikacja molekularna

Inne niż opisane tutaj techniki zostały zgłoszone do identyfikacji i przypisania szczepów, takie jak analizy RFLP, „genomowy odcisk palca”, itd.. Ten sam zestaw starterów wskazany dla detekcji może zostać użyty do identyfikacji podejrzanych szczepów. Inne podejście do produkcji uniwersalnych starterów dla powodujących raka szczepów wykorzystuje specyficzne sekwencje w regionach ITS 16S i 23S rybosomalnych DNA. Zmiany w sekwencjach ITS pozwalają projektowi specyficznych starterów dla szczepów A identyfikować A^w jako szczep A i łatwo odróżniać szczep A^w od patotypów B i C, nawet pomimo faktu, iż szczepy te mają bardzo podobny zakres żywicieli Cubero & Graham, 2002). BOX- i ERIC-PCR (Louws *et al.*, 1994) mogą zostać użyte do identyfikacji i charakteryzacji szczepów pod pewnymi warunkami PCR (Cubero & Graham, 2002). Reakcje BOX PCR przeprowadza się w 25- μ l objętościach zawierających $1\times$ Taq bufor, 6 mM MgCl_2 , 2,4 μ M koncentratu startera BOX1R (5'-CTACG- GCAAGGCGACGCTGCAG-3'), 0,2 mM każdego trifosforanu dezoksynukleozydów i 2 U polimerazy Taq z profilem 94°C (30 s), 48°C (30 s) i 72°C (1 min) przez 40 cykli plus wstępny krok 94°C przez 5 min i końcowy 72°C przez 10 min. i używając 5 μ l DNA wyekstrahowanego ze szczepów xanthomonad. DNA ekstrahuje się z zawiesin bakteryjnych (absorbancja przy 600 nm od 0,2 do 0,5) stosując pojedynczy etap z mieszanką fenol-chloroform-alkohol izoamyłowy, strącanie w etanolu i ponownie zawieszanie w wodzie ultra czystej. DNA przechowuje się w temperaturze -20°C przed dalszym użyciem. Reakcje ERIC PCR przeprowadza się także w 25 objętościach zawierających $1\times$ Taq bufor, 3 mM MgCl_2 , 1,2 μ M koncentratu starterów ERIC1R (5'-ATGTAAGCTCCT-GGGGATTCAC-3') i ERIC2 (5'-AAGTAAGTGACT- GGGGTGAGCG-3') (Louws *et al.*, 1994), 0,2 mM każdego trifosforanu dezoksynukleozydów i 2 U polimerazy Taq z takim samym profilem jak dla reakcji BOX-PCR. Produkty PCR są analizowane w 3% żelu agarozowym w buforze 1X TAE przez 2 h przy 110 V i barwione bromkiem etydyny.

PCR w czasie rzeczywistym został również zastosowany do ilościowego PCR i szybkiej, dokonywanej na miejscu identyfikacji *X. a.* w materiale roślinnym. Podejścia wykorzystujące zielony barwnik SYBR i sondy Taqman zostały ocenione w połączeniu ze

starterami bazującymi na sekwencjach z genów rybosomalnych i pth (Cubero & Graham, 2002), a także na genie reagującego na leucynę białka regulacyjnego (Irp) (Cubero & Graham, 2004).

Techniki zautomatyzowane

Analizy kwasów tłuszczowych do identyfikacji czystych kultur są dostępne od MIDI (Newark, US) oraz od NCPPB (CSL, York, GB). Biolog GN jest zautomatyzowaną metodą do identyfikacji bakterii, bazującą na użyciu 95 substratów. Może ona zostać użyta do identyfikacji na poziomie gatunków i jest komercyjnie dostępna od Biolog (Hayward, US). Dla pozytywnej diagnozy, objawy choroby, morfologiczne i biochemiczne charakterystyki patogenu i właściwości patogenicznych powinny być w zgodzie z opisami protokołu i patotyp powinien być zidentyfikowany. Schemat jest przedstawiony na rys. 1.

Uwaga odnośnie X. a. citrumelo

X. a. citrumelo uważa się na Florydzie (US) za przyczynę bakteryjnej plamistości cytrusów „citrus bacterial spot”, choroby obserwowanej w podkładce Swingle citrumelo, powodującej płaskie, martwicze zmiany z nasiąkniętymi wodą brzegami. Izolacja z zaatakowanych roślin daje szczepy o kulturowej i fizjologicznej charakterystyce nierozróżnialnej od *X. a. citri*. Stosownie do tego, koniecznym jest przeprowadzenie testów patogeniczności i innych żeby otrzymać poprawną diagnozę. Monoklonalne przeciwciała i protokoły PCR używane dla *X. a. citri* nie rozpoznają *X. a. citrumelo*. W dodatku, profile BOX- i ERIC- PCR ze szczepów *X. a. citrumelo* są całkowicie odmienne od tych z *X. a. citri*. Jako że oportunistyczne szczepy *Xanthomonas* także zostały wyizolowane z *Citrus* spp., zawsze doradza się sprawdzenie szczepów pod kątem patogeniczności.

Szczepy odniesienia

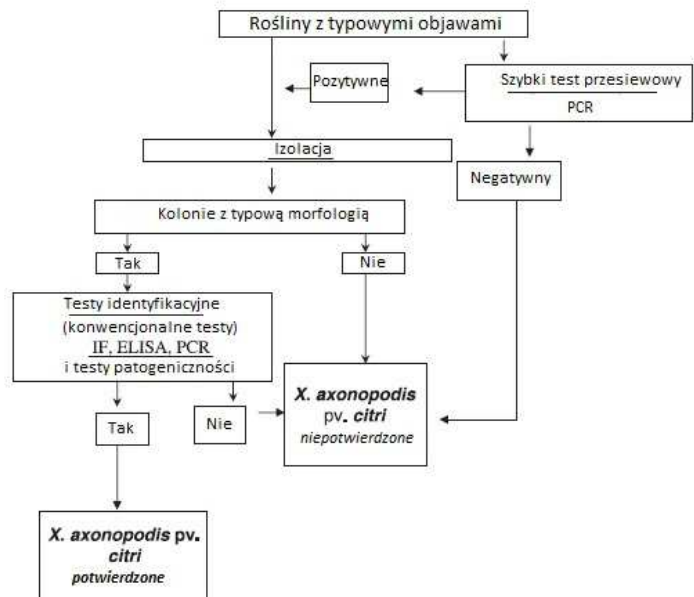
NCPPB 409 (Type strain); CFBP 2525.

NCPPB = National Collection of Plant Pathogenic Bacteria, CSL York, UK.

CFBP = Collection Française de Bactéries Phytopathogènes, INRA, Angers, FR.

Sprawozdawczość i dokumentacja

Wskazówki odnośnie zgłaszania i dokumentacji zawarte są w EPPO Standard PM7/ – (w przygotowaniu).



Rys. 1. Diagram wykrywania *Xanthomonas axonopodis* pv. *citri* w próbkach wykazujących objawy chorobowe.

Informacje dodatkowe

Dalsze informacje na temat tego organizmu można otrzymać od:

O. Pruvost, CIRAD Pôle de Protection des Plantes, Station de Ligne Paradis, 7 chemin de l'IRAT, 97410 St Pierre (Réunion)

J. Graham, University of Florida, Citrus Research and Education Center, Lake Alfred, FL 33850 (USA)

R.P. Leite Jr, Instituto Agronômico do Paraná, Londrina (Brazil).

Podziękowania

Ten protokół został pierwotnie sporządzony przez V. Catara, DISTEF, University of Catania (IT) i zmieniony przez J. Cubero, INIA, Madrid (ES) and M.M. López, IVIA, Moncada, Valencia (ES).

Materiały źródłowe

zachowana wersja oryginalna (przyp. tłum)

Alvarez AM, Benedict AA, Mizumoto CY, Pollard LW & Civerolo EL (1991) Analysis of *Xanthomonas campestris* pv. *citri* and *X. c. citrumelo* with monoclonal antibodies.

Phytopathology 81, 857– 865.

Canteros BJI, Zagory D & Stall RE (1985) A medium for cultivation of the B-strain of *Xanthomonas campestris* pv. *citri*, cause of canker B in Argentina and Uruguay. *Plant Disease* 69, 122–123.

Cubero J & Graham JH (2002) Genetic relationship among worldwide strains of *Xanthomonas* causing canker in citrus species and design of new primers for their identification by PCR. *Applied and Environmental Microbiology* 68, 1257 –1264.

Cubero J & Graham JH (2004) The leucine-responsive regulatory protein(lrp) gene for characterization of the relationship among *Xanthomonas* species. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology* 54, 429 – 437.

Cubero J, Graham JH & Gottwald TR (2001) Quantitative PCR method for diagnosis of citrus bacterial canker. *Applied and Environmental Microbiology* 67, 2849 – 2852.

EPPO/ CABI (1997) *Xanthomonas axonopodis* pv. *citri*. Quarantine Pests for Europe, 2nd edn, pp. 1101–1108. CAB International, Wallingford (GB). Gottwald TR, Alvarez AM, Hartung JS & Benedict AA (1991)

Diversity of *Xanthomonas campestris* pv. *citrumelo* strains associated with the epidemics of citrus bacterial spot in Florida citrus nursery: correlation of detached leaf, monoclonal antibody and restriction fragment polymorphism assay. *Phytopathology* 81, 749 –753.

Hartung JS, Daniel JF & Pruvost OP (1993) Detection of *Xanthomonas campestris* pv. *citri* by the polymerase chain reaction. *Applied and Environmental Microbiology* 59, 1143 –1148.

Hartung JS, Pruvost OP, Villemot I & Alvarez A (1996) Rapid and sensitive colorimetric detection of *Xanthomonas axonopodis* pv. *citri* by immuno- capture and a nested-polymerase chain reaction assay. *Phytopathology* 86, 95 –101.

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

Llop P, Caruso P, Cubero J, Morente C & López MM (1999) A simple extraction procedure for efficient routine detection of pathogenic bacteria in plant material by polymerase chain reaction. *Journal of Microbiology Methods* 37, 23 – 31.

López MM & Navarro L (1981) A new in vitro inoculation method for citrus canker diagnosis. *Proceedings of the International Society for Citriculture*, Vol. 1, pp. 399 – 402. Tokyo (JP).

Louws FJ, Fulbright DW, Taylor Stephens C & de Bruijn 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.

OEPP/ EPPO (1990) EPPO Standards PM 3/ 27 Quarantine procedure for *Xanthomonas campestris* pv. *citri*. *Bulletin OEPP/EPPO Bulletin* 20, 263 – 272.

Rossetti V (1977) Citrus canker in Latin America: a review. *Proceedings of the International Society for Citriculture*, Vol. 3, pp. 918–924. Florida (US). Schaad NW (1988) *Laboratory Guide for Identification of Plant Pathogenic Bacteria*. APS Press, St Paul (US).

Schaad NW, Jones JB & Chun W (2001) Laboratory Guide for Identification of Plant Pathogenic Bacteria, 2nd edn. APS Press, St Paul (US).

Sun X, Stall RE, Cubero J, Gottwald TR, Graham JH, Dixon WD, Schubert TS, Peacock ME, Dickestein ER & Chaloux PH (2000) Detection of a unique isolate of citrus canker bacterium from Key lime in Wellington and

Lake Worth, Florida. Proceedings of the International Citrus Canker Research Workshop. Fort Pierce (US). <http://doacs.state.fl.us/> canker Vauterin L, Hoste B, Kesters K & Swing J (1995) Reclassification of *Xanthomonas*. International Journal of Systematic Bacteriology 45, 472–489.

Vernière C, Hartung JS, Pruvost OP, Civerolo EL, Alvarez AM, Maestri P & Luisetti J (1998) Characterization of phenotypically distinct strains of *Xanthomonas axonopodis* pv. *citri* from Southwest Asia. European Journal of Plant Pathology 104, 477–487.

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