

## Diagnostyka Diagnostics

### *Xylophilus ampelinus*

#### Zakres

Standard ten opisuje protokół diagnostyczny dla bakterii *Xylophilus ampelinus*<sup>1</sup>

#### Zatwierdzenie i nowelizacja

Zatwierdzono jako Standard EPPO 2009-09.

#### Wprowadzenie

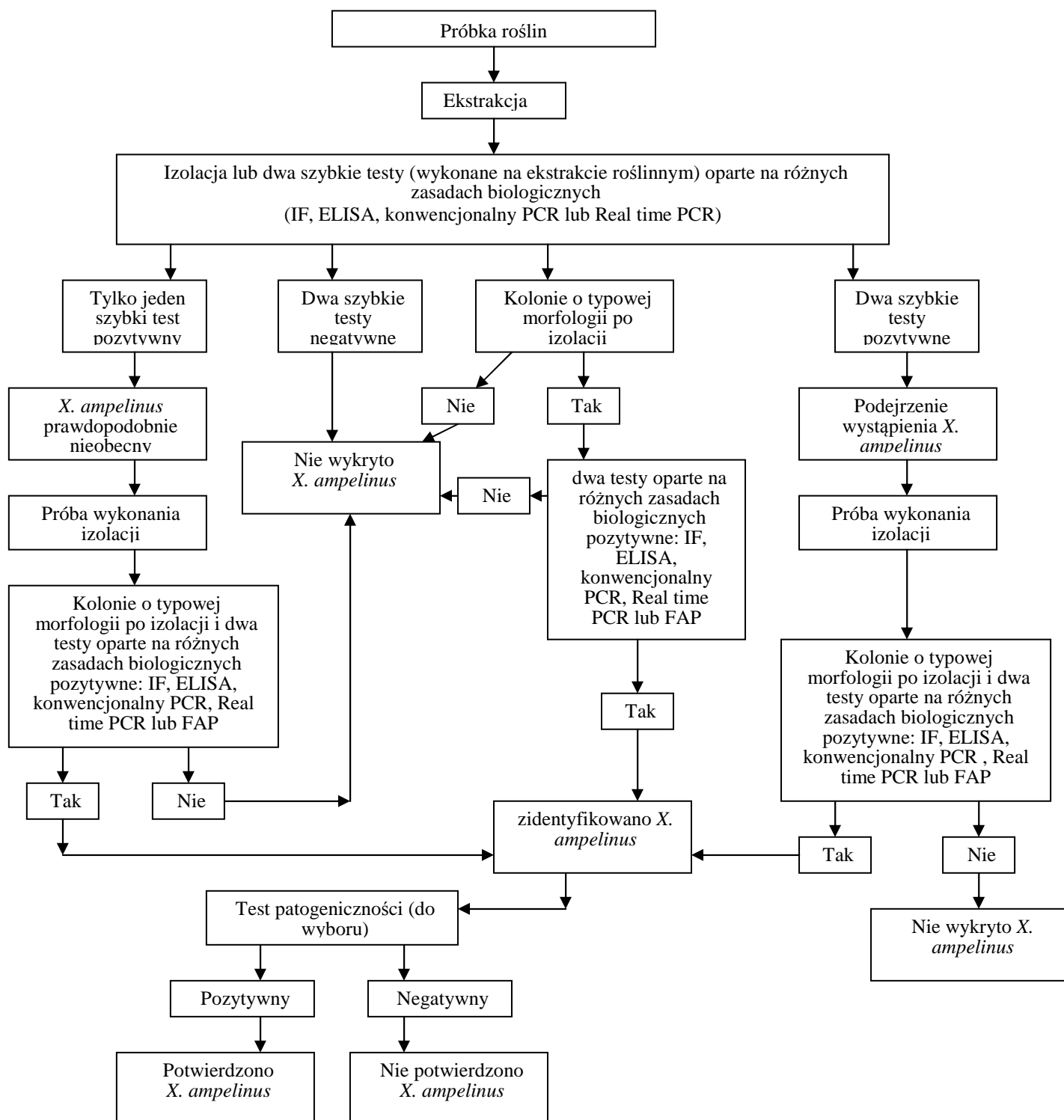
*Xylophilus ampelinus* jest bakterią patogeniczną dla roślin powodującą „zarazę bakteryjną” winorośli. Choroba została po raz pierwszy opisana w Grecji (Kreta) i określona nazwą *Xanthomonas ampelina* (Panagopoulos, 1969). Na podstawie zbadania DNA i RNA bakteria ta została przeniesiona do nowego rodzaju *Xylophilus* (Willems *et al.*, 1987). Bakteria ta wywołuje infekcję tylko w przypadku winorośli (*Vitis vinifera* *Vitis* spp. używanych jako materiał rozmnożeniowy). Jest to patogen systemiczny, powodujący infekcję tkanek ksylemu. Zimuje w tkance roślinnej. Pierwotne źródło zakażenia i główną drogę rozprzestrzeniania się bakterii na dużą odległość stanowią sadzonki używane jako materiał rozmnożeniowy lub materiał przeznaczony do szczepienia. W przypadku silnego porażenia winnic nawet do 50% głównych pędów może wykazywać porażenie utajone. Istnieje ryzyko rozprzestrzenienia się bakterii na duże odległości w przypadku użycia pędów jako materiału rozmnożeniowego. Rozprzestrzenienie bakterii na małe odległości może nastąpić poprzez skontaminowane narzędzia i maszyny oraz bezpośredni kontakt roślin porażonych z roślinami zdrowymi. Choroba ta występuje sporadycznie a jej wystąpienie jest ściśle powiązane z klimatem i warunkami w jakich prowadzona jest uprawa. Objawy chorobowe mogą zaniknąć na wiele lat i powrócić po latach jeśli zaistnieją bardziej sprzyjające warunki dla rozwoju choroby. Objawy mogą zostać łatwo pomyłone z innymi uszkodzeniami (patrz część: objawy choroby). Chorobę tą odnotowano w Grecji, Francji, we Włoszech, Mołdawii, Słowenii, Hiszpanii i RPA pod następującymi nazwami: tsilik marasi’ w Grecji, ‘maladie d’Oléron’ we Francji, ‘mal nero’ we Włoszech, ‘necrosis bacteriana’ w Hiszpanii, oraz ‘vlamsiekte’ w RPA.

Dodatkowe informacje dotyczące zakresu roślin żywicielskich, rozprzestrzenienia geograficznego oraz biologii można znaleźć w bazie danych EPPO, dotyczących *Xylophilus ampelinus* (EPPO/CABI, 1997 i <http://www.eppo.org>).

Schemat diagnostyczny opisujący procedurę diagnostyczną dla *Xylophilus ampelinus* został przedstawiony na Rys. 1

---

<sup>1</sup> Użycie w tym standardzie EPPO nazw firm produkujących odczynniki lub wyposażenie nie sugeruje wyłączności ich zastosowania, gdyż inne odczynniki również mogą zostać zastosowane



**Rys. 1** Schemat wykrywania i identyfikacji *Xylophilus ampelinus*

### Tożsamość

**Nazwa:** *Xylophilus ampelinus* (Panagopoulos) Willems *et al.*, 1987.

**Synonim:** *Xanthomonas ampelina* Panagopoulos, 1969.

**Pozycja taksonomiczna:** Bacteria, Eubacteria, Proteobacteria, *Betaproteobacteria*, *Burkholderiales*.

**Kod EPPO:** XANTAM

**Kategoria fitosanitarna:** EPPO A2 lista nr 133, EU Załącznik II/A2

### **Wykrywanie**

Rozmieszczenie bakterii w roślinie jest nieregularne, różne w zależności od pór roku oraz różne w różnych latach. Oznacza to, że wykrywanie bakterii w roślinach wyglądających na zdrowe jest wątpliwe. Formalne potwierdzenie wstępnych, pozytywnych wyników w następujących testach może stwarzać trudności.

### **Objawy**

Na polu uprawnym objawy mogą wystąpić na wszystkich częściach nadziemnych rośliny. Pączki w zainfekowanych gałązkach na wiosnę albo nie kiełkują albo wykazują ograniczony wzrost. Spękania pojawiają się wzdłuż zainfekowanych gałązek, z powodu nacisku przez hiperplazję tkanek kambium powodując powstawanie zrakowacenia. Spękania te pojawiają się głównie w najniższych partiach gałązek. Infekcja rozprzestrzenia się wzdłuż gałęzi, co objawia się w postaci brązowych przebarwień tkanek lub może nastąpić zamieranie gałązek. Młode gałązki zainfekowanych odnóg na niższych międzywęźlach stają się blade, żółto-zielone. Odnogi można łatwo złamać w miejscach zrakowaceń. Przebarwienia rozciągają się ku wierzchołkowi, następnie stają się ciemniejsze, spękane aż w końcu przekształcają się w zrakowacenia. W przypadku gdy zrakowacenia ulegną pęknięciu widoczna stanie się tkanka ksylemu. Późnym latem zrakowacenia często są widoczne po jednej stronie ogonków liściowych powodując charakterystyczne jednostronne nekrozy liści. Mogą się one również pojawić na pierwotnych i wtórnych kwiatach oraz łodyżkach owoców. W zależności od wieku porażonych gałązek bakteria może przeżyć i rozwijać się w pędzie głównym. Główne pędy mogą albo wykazywać zrakowacenia (zwykle w najniższej części międzywęźli) albo mogą nie wykazywać objawów w przypadku porażenia utajonego. Prawie wszystkie części rośliny z objawami choroby wykazują w przekroju podłużnym brązowe przebarwienia tkanek ksylemu. W przypadku niektórych upraw można obserwować późne i nieregularne uszkodzenia pędów głównych porażonych roślin. Zmianom może ulec ogólny wygląd zainfekowanych winorośli. Zainfekowane rośliny są mniej wyprostowane niż rośliny zdrowe.

W przypadku, kiedy dojdzie do porażenia poprzez krople zakażonego soku spadającego na młody liść lub w inny sposób zewnętrzny, można zaobserwować na liściach nekrotyczne plamy otoczone przebarwioną obwódką. Czasami centralna część suchych fragmentów powstałych plam ulega wypadnięciu i wówczas powstają objawy przypominające „przestrzelone” dziurki. W przypadku porażenia liści poprzez ogonki liściowe nekrozy są otoczone obwódką.

Typowe ale nie specyficzne objawy choroby zostały opisane szczególnie w przypadku młodych upraw oraz liści (Rys.2 oraz <http://www.eppo.org>). „Zaraza bakteryjna” może porażać zarówno uprawy jak i materiał rozmnożeniowy.

Objawy można pomylić z innymi objawami lub chorobami. Podobne zrakowacenia na gałązkach oraz plamistości na liściach do tych jakie powodowane są przez *Xylophilus ampelinus* mogą być wywołane w przypadku silnej infekcji powodowanej przez grzyby *Sphaceloma ampelinum* (bez brązowych przebarwień naczyń ksylemu) oraz *Phomopsis viticola*. Uszkodzenia odnóg, kiełków oraz zamieranie gałązek może być także spowodowane przez grzyby porażające drewno, takie jak: *Togninia minima* (anamorfa: *Phaeoacremonium aleophilum*), *Phaeomoniella clamydospora*, *Fomitiporia mediterranea*, *Eutypa lata*, *Botryosphaeria* spp. lub *Verticillium* spp. W tym przypadku nie są widoczne zrakowacenia lub są one inne niż w przypadku porażenia przez *Xylophilus ampelinus*, ale

można obserwować brązowe przebarwienia tkanki ksylemu. Objawy podobne do zrakowaceń mogą być także spowodowane przez gradobicie.



**Rys.2** Objawy na gałązkach winorośli powodowane przez *Xylophilus ampelinus*

## **Ekstrakcja**

Procedura ekstrakcji dla różnego materiału roślinnego została przedstawiona w Załączniku 1.

Bufory ekstrakcyjne mogą być różne w zależności od testów, które zostaną później przeprowadzone. W przypadku gdy zostaną przeprowadzone różne testy na tym samym ekstrakcie, ekstrakcję należy przeprowadzić w sterylnej wodzie laboratoryjnej o wysokim stopniu czystości, a otrzymany roztwór należy uzupełnić odpowiednimi skoncentrowanymi buforami (tak aby otrzymać końcowe stężenie próbki roślinnej 1x, unikając zbyt dużego rozcieńczenia) zgodnie z wymaganiami testów, które zostaną wykonane.

## **Testy przesiewowe**

Jako testy przesiewowe można wykonać: bezpośrednią izolację, test immunofluorescencji, test ELISA, test PCR i real-time PCR. Testy te zostały opisane poniżej oraz w Załącznikach 2-4. Podczas wykonywania tych testów może dojść do reakcji krzyżowych przede wszystkim z powodu reakcji fałszywie pozytywnych, które mogą pojawić się z powodu obecności bakterii saprofitycznych.

## **Posiew na podłoża nie selektywne**

### *Izolacja z materiału roślinnego wykazującego objawy chorobowe*

Optymalny czas do pobierania próbek może być zróżnicowany w zależności od regionu uprawy. Należy przygotować i odpowiednio oznakować świeże podłoże YPGA i/lub NA (patrz Załącznik 5) w szalkach Petriego, a następnie wykonać w sterylnych warunkach posiew pełnego oczka ezy ekstraktu nie rozcieńczonego oraz jego rozcieńczeń 1:10 i 1:100 przeznaczając co najmniej po dwie szalki na każde rozcieńczenie. Po wykonaniu posiewu szalki należy inkubować w temp. 25°C. Ponieważ *X. ampelinus* jest bakterią wykazującą powolny wzrost może być ona łatwo hamowana przez bakterie saprofityczne. Szalki należy sprawdzać codziennie począwszy od trzeciego dnia od posiewu, w ten sposób kolonie przypominające *X. ampelinus* mogą zostać odszczepione przed zahamowaniem wzrostu

przez bakterie saprofityczne. Kolonie *Xylophilus ampelinus* po inkubacji przez 7-12 dni w temperaturze 25°C na podłożu YPGA mogą osiągnąć średnicę 2 mm. Mają kolor jasnożółty, są całobrzegie, z połyskiem, lekko wypukłe i lekko przezroczyste. Kolonie *Xylophilus ampelinus* są zwykle dużo mniejsze na podłożu NA niż na innych podłożach hodowlanych. Brązowy pigment może przenikać do podłoża YPGA. Produkcja tego pigmentu jest bardzo typowa dla szczepów *Xylophilus* i różna w zależności od rodzaju podłoża i warunków inkubacji, choć nie wszystkie szczepy mogą go produkować. Kolonie o morfologii podobnej do uzyskanych w kontroli pozytywnej należy przeszczerpić i oczyścić na nowym podłożu YPGA lub NA oraz inkubować w podobnych warunkach jak poprzednio. Oczyszczone izolaty są gotowe do dalszych testów. Należy zwrócić uwagę, że w przypadku obecności dużej ilości szybko rosnących bakterii saprofitycznych prawdopodobieństwo pomyślniej izolacji bakterii *Xylophilus ampelinus* może zostać drastycznie zredukowane z powodu przerośnięcia lub efektów zahamowania wzrostu.

#### *Izolacja z materiału roślinnego nie wykazującego objawów chorobowych*

Bezpośrednia izolacja *Xylophilus ampelinus* na sztucznych podłożach wzrostowych z powodu słabych możliwości wzrostu bakterii jest możliwa i wskazana tylko z materiału roślinnego wykazującego objawy chorobowe. W przypadku materiału roślinnego nie wykazującego objawów chorobowych przewiduje się niski poziom obecności poszukiwanego organizmu oraz możliwość wystąpienia innych bakterii w badanych próbkach. Izolacja z innego materiału roślinnego może nigdy się nie udać przy użyciu procedury opisanej poniżej. Aby zwiększyć możliwości izolacji poszukiwanego organizmu należy wykonać posiew rozcieńczonego oraz nie rozcieńczonego ekstraktu na większą ilość płytek z podłożem hodowlanym. Jakkolwiek niepomyślna izolacja bakterii nie musi oznaczać, że bakteria *Xylophilus ampelinus* jest nieobecna.

### **Identyfikacja**

*Xylophilus ampelinus* jest jedynym gatunkiem należącym do rodzaju *Xylophilus*. *Xylophilus ampelinus* jest bakterią wykazującą powolny wzrost na sztucznych podłożach hodowlanych. Kolonie są rzadko widoczne przed upływem 5 dni od rozpoczęcia inkubacji i osiągają po inkubacji przez 7-12 dni w temperaturze 25°C maksymalnie 2 mm średnicy. W przypadku uzyskania izolatu jest mało prawdopodobne, aby pomylić wyizolowane bakterie z koloniami innych bakterii (patrz: sekcja „Izolacja z materiału roślinnego wykazującego objawy chorobowe”).

### **Testy biochemiczne**

Testy należy przeprowadzić zgodnie z Lelliott i Stead (1987). Cechy biochemiczne szczepów *Xylophilus ampelinus* przedstawiono w Tabeli 1.

**Tabela 1** Cechy biochemiczne dla *Xylophilus ampelinus*

Właściwości	Wynik testu
Reakcja Grama	-
Test na obecność katalazy	+
Test na obecność oksydazy	-

Produkcja ureazy	+
Produkcja H <sub>2</sub> S z cysteiny	-
Wykorzystywanie źródeł węgla:	
Cytrynian	+
Fumaran	+
Malonian	+
DL – winian	+
Produkcja kwasu z:	
L-arabinozy	+
D-galaktozy	+
Głukozy	-
Sacharozy	-
Laktozy	-
Wykorzystywanie asparaginy jako wyłączone źródło węgla i azotu	+

- wynik ujemny

+ wynik dodatni

### Testy serologiczne

#### *Immunofluorescencja*

W celu identyfikacji bakterii test należy przeprowadzić na czystej kulturze (około 10<sup>6</sup> komórek na mililitr, nie jest potrzebne inne rozcieńczenie) zawieszanej w buforze fosforanowym, jak to opisano w standardzie PM 7/97 (Biuletyn EPPO 39, 413-416). Test można uznać za pozytywny dla podejrzanej kultury bakterii jeśli rozmiar i wygląd wybarwionych komórek użytej do testu kultury jest porównywalny ze szczepem użytym w kontroli pozytywnej.

#### *ELISA*

W celu identyfikacji test należy przeprowadzić jak to opisano w Załączniku 2 używając czystej kultury (około 10<sup>6</sup> komórek na mililitr) zawieszanej w buforze ekstrakcyjnym specyficznym dla testu ELISA. Wynik testu wykonanego w celu identyfikacji podejrzanej kultury bakterii można uznać za pozytywny jeśli wartość OD mieści się w zakresie uzyskanym dla kontroli pozytywnych.

### Testy molekularne

#### *PCR i Real-time PCR*

W celu identyfikacji czystej kultury (około 10<sup>6</sup> komórek na mililitr) zawieszanej w sterylnej wodzie destylowanej można użyć jeden z proponowanych zestawów starterów (Manceau *et al.* 2005), jak to opisano w Załączniku 3. W przypadku użycia czystej kultury bakterii nie jest wymagana ekstrakcja DNA. Wynik testu można uznać za pozytywny dla podejrzanej kultury bakterii w przypadku gdy powielony fragment DNA jest podobny do fragmentu DNA uzyskanego dla kontroli pozytywnej.

W celu identyfikacji czystej kultury można użyć testu Real-time PCR (Dreo *et al.* 2007) , jak to opisano w Załączniku 4.

### Analiza Kwasów Tłuszczowych

Opiera się na wykorzystaniu systemu MIDI (Stead, 1991; Janse, 1991; Stead, 1992 Stead *et al.*, 1992; Dickstein *et al.*, 2001). W celu otrzymania większej ilości szczegółów patrz także strona internetowa: [http://www.midi-inc.Com/PDF/MIS\\_Technote\\_101.pdf](http://www.midi-inc.Com/PDF/MIS_Technote_101.pdf). Analizę kwasów tłuszczowych można wykorzystać do identyfikacji czystych kultur bakterii (Załącznik 6).

Analiza kwasów tłuszczowych *Xylophilus ampelinus* jest dość łatwa. Kwasy tłuszczowe występujące w największej ilości to: 8:0 3 OH (2%), 14:0 (3%), 16:0 (24%), 16:1 w7c (41%) oraz 18:1 w7c (28%) (Dreo *et al.*, 2005). Najważniejsze z punktu widzenia taksonomii są hydroksykwasy 8:03 OH, które są rzadko spotykane w przypadku bakterii. Spośród bakterii patogenicznych dla roślin kwasy te są znane tylko i wyłącznie dla rodzaju *Xylophilus* (Stead, 1992; Dickstein *et al.* 2001).

### **Test patogeniczności**

Test ten wykonywany jest w celu potwierdzenia wykrycia bakterii *Xylophilus ampelinus* (jeśli to konieczne) tylko dla kultur świeżo wyizolowanych. Zostały opisane dwie metody inokulacji roślin testowych. Inne dostępne metody nie zostały tu przedstawione i są przeznaczone do oceny wirulencji szczepów (Ride *et al.*, 1983; Lopez *et al.*, 1985). Nie poleca się stosowania inokulacji poprzez rozpylanie, za wyjątkiem przypadków gdy warunki laboratoryjne są dostosowane do kontaminacji powietrznej z użyciem organizmów kwarantannowych.

Metody inokulacji zostały przedstawione w Załączniku 7.

### **Szczepy referencyjne**

NCPPB 2217<sup>T</sup> (= CFBP 1192 = CFBP 3674 = LMG 5949 = ATCC 33914).

### **Sprawozdawczość i dokumentacja**

Wskazówki dotyczące sprawozdawczości i dokumentacji są dostępne w Standardzie EPPO PM7/77 (EPPO, 2006)

### **Informacje dodatkowe**

Informacje dodatkowe dotyczące tego organizmu można uzyskać pod adresem: M.M. López, Instituto Valenciano de Investigaciones Agrarias (IVIA), Carretera de Moncada-Náquera km 5, 46113 Moncada (ES). E-mail; [mlopez@ivia.es](mailto:mlopez@ivia.es); JJ Serfontein, Plant Protection R ESEARCH Institute, Agricultural Research Council, Private Bag X134, Pretoria 0001 (ZA); C Manceau, Institut national de la recherche agronomique (INRA), UMR PaVE, 42 rue Georges Morel, F -49071 Beaucouzé Cedex (FR); e-mail: [manceau@angers.inra.fr](mailto:manceau@angers.inra.fr); B Legendre or D Caffier, French National Laboratory for Plant Health (LNPV), 7 rue Jean Dixméras, F-49044 ANGERS Cedex 01 (FR); e-mail: [lnpv.sdqpv.dgal@agriculture.gouv.fr](mailto:lnpv.sdqpv.dgal@agriculture.gouv.fr);

### **Podziękowania**

Protokół ten został pierwotnie opracowany przez PG Psallidas, Benaki Phytopathological Institute, Grecja, oraz przez M Scortichini, Istituto Sperimentale per la Frutticoltura, Włochy. Protokół ten został następnie rozwinięty przez MM Lopez, IVIA (SP), T Dreo, NIB (SI), D Caffier oraz B Legendre, LNPV Angers (FR) i Manceau C, INRA (FR).

## Materialy źródłowe

zachowana wersja oryginalna (przyp. tłum)

- Arregui JM, López MM, Juárez J & Durán-Vila N (1988). *Etude des relations hôte parasite chez la vigne par l'intermédiaire de la culture in vitro*. *Compte rendu 68ème assemblée générale OIV, Paris (FR)*, pp. 1–16. (in French)
- Botha WJ, Serfontein S, Greyling MM & Berger DK (2001) *Detection of Xylophilus ampelinus in grapevine cuttings using a nested polymerase chain reaction*. *Plant Pathology* 50, 515–526.
- Dickstein ER, Jones JB & Stead DE (2001) *Automated techniques*. In: *Laboratory Guide for Identification of Plant Pathogenic Bacteria* (Eds SchaadNW, JonesJB & ChunW), Third edn. American Phytopathological Society, St. Paul (US).
- Dreo T, Gruden K, Manceau C, Janse JD & Ravnikar M (2007) *Development of a real-time PCR-based method for detection of Xylophilus ampelinus*. *Plant Pathology* 56, 9–16.
- Dreo T, Seljak G, Janse JD, Van Der Beld I, Tjou-Tam-Sin L, Gorkink-Smits P & Ravnikar M (2005) *First laboratory confirmation of Xylophilus ampelinus in Slovenia*. *Bulletin OEPP/EPP0 Bulletin* 35, 149–155.
- Edwards K, Johnstone C & Thompson C (1991) *A simple and rapid method for the preparation of plant genomic DNA for PCR analysis*. *Nucleic Acids Research* 6, 1349.
- EPPO/CABI (1997) *Xylophilus ampelinus*. In: *Quarantine Pests for Europe* (Eds SmithIM, McNamaraDG, ScottPR & HoldernessM), 2<sup>nd</sup> edn. pp. 1162–1165. CAB International, Wallingford (GB).
- Janse JD (1991) *Infra- and intraspecific classification of Pseudomonas solanacearum strains, using whole cell fatty acid analysis*. *Systematic and Applied Microbiology* 14, 335–345.
- Lelliott RA & Stead DE (1987) *Methods for the Diagnosis of Bacterial Diseases of Plants*. Blackwell Scientific Publications, Oxford (GB).
- López MM, Arregui JM & Navarro L (1985). *Nueva técnica de inoculación con Xanthomonas ampelina de plantas de viña cultivadas in vitro para el estudio de las relaciones huésped-parásito*. In: *Proceedings 2º Congreso Nacional de Fitopatología, Sociedad Española de Fitopatología*, pp. 45–50. Vitoria.
- Manceau C, Coutaud MG & Guyon R (2000) *Assessment of subtractive hybridization to select species and subspecies specific DNA fragments for the identification of Xylophilus ampelinus by polymerase chain reaction (PCR)*. *European Journal of Plant Pathology* 106, 243–253.
- Manceau C, Grall S, Brin C & Guillaumès J (2005) *Bacterial extraction from grapevine and detection of Xylophilus ampelinus by a PCR and microwell plate detection system*. *Bulletin OEPP/EPP0 Bulletin* 35, 55–60.
- Panagopoulos CG (1969) *The disease “Tsilik marasi” of grapevine: its description and identification of the causal agent (Xanthomonas ampelina sp. nov.)*. *Annales Institute Phytopathologique Benaki (N.S.)* 9, 59–81.
- Peros J-P, Berger G & Ridé M (1995) *Effect of grapevine cultivar, strain of Xylophilus ampelinus and culture medium on in vitro development of bacterial necrosis*. *Vitis* 34, 189–190.
- Ridé M, Ridé S & Novoa D (1983) *Connaissances actuelles sur la nécrose bactérienne de la vigne*. *Bulletin Technique des Pyrénées Orientales* 106, 10–45 (in French).
- Serfontein S, Serfontein JJ, Botha WJ & Staphorst JL (1997) *The isolation and characterization of Xylophilus ampelinus*. *Vitis* 36, 209–210.



- Stead DE (1991) *Techniques for detecting and identifying plant pathogenic bacteria*. In: *Techniques for Rapid Diagnosis of Plant Pathogens* (Eds Duncan J & Torrance L), pp. 76–111. Blackwell Scientific Publications, Oxford (GB).
- Stead DE (1992) *Grouping of plant pathogenic and some other Pseudomonas spp. using cellular fatty acid profiles*. *International Journal of Systematic Bacteriology* 42, 281–295.
- Stead DE, Sellwood JE, Wilson J & Viney I (1992) *Evaluation of a commercial microbial identification system based on fatty acid profiles for rapid, accurate identification of plant pathogenic bacteria*. *Journal of Applied Bacteriology* 72, 315–321.
- 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.
- Willems AM, Gillis K, Kersters L, Van den Broeke L & De Ley J (1987) *Transfer of Xanthomonas ampelina, Panagopoulos 1969 to a new genus, Xylophilus gen. nov. as Xylophilus ampelinus (Panagopoulos 1969) comb. nov.* *International Journal of Systematic Bacteriology* 37, 422–430.

## **Załącznik 1 – Procedury ekstrakcji**

### **1. Ekstrakcja bakterii z materiału roślinnego wykazującego objawy chorobowe (gałązki, liście)**

W przypadku gdy próbka składa się z więcej niż jednego liścia lub gałązki laboratorium musi wybrać materiał najbardziej odpowiedni do badania. Każdy liść lub gałązka musi być przebadana osobno.

#### **1.1 Ekstrakcja z gałązek**

W celu ominięcia problemu wynikającego z nierównomiernego rozmieszczenia bakterii w tkankach roślinnych zaleca się zastosowanie następującej metody, która daje bardzo dobre wyniki w uzyskiwaniu czystej kultury bakterii na płytkach z agarem. Metoda ta wykorzystywana jest do badania gałązek o długości około 5 cm.

Gałązki należy umyć w wodzie wodociągowej i szybko zdezynfekować powierzchnię kory za pomocą 70% etanolu. Za pomocą zdezynfekowanych narzędzi usunąć końcówki pędów. Używając zdezynfekowanego skalpela pobrać ostrożnie nekrotyczną tkankę. W przypadku izolacji należy zanurzyć gałązkę w 70% etanolu i natychmiast opalić w płomieniu palnika. Całą gałązkę umieścić w sterylnej plastikowej torebce i zmiażdżyć za pomocą młotka. W celu spowodowania dyfuzji bakterii należy dodać około 6 ml sterylnej demineralizowanej wody na każdy gram tkanki, a następnie przez 40 do 60 minut wytrząsać w temperaturze pokojowej lub przez 16 godzin w temperaturze 5°C (w przypadku gdy będzie wykonywany test PCR zaleca się aby dodać zawiesinę poliwinylpolipyrrolidonu (PVPP) w ilości 0,1 g PVPP na mililitr sterylnej wody demineralizowanej. Należy dodać 200 µl zawiesiny PVPP do 1800 µl płynu do moczenia. Następnie inkubować próbkę wstrząsając ją delikatnie przez około 30 minut w temperaturze pokojowej. Uzyskany roztwór przefiltrować przez bibułę (Whatman nr 3) lub odwirować przez 5 minut z przyspieszeniem 100g. Usunąć osad.

#### **Metoda alternatywna**

Usunąć korę i tkankę nekrotyczną w sposób wskazany powyżej. Za pomocą sterylnego

ostrza skalpela pobrać kawałki nekroz lub zrakowaceń składające się głównie z naczyń ksylemu. Małe fragmenty porażonej tkanki przewodzącej (0,5-1 cm długości) przenieść do szalki Petriego zawierającej 3-5 ml sterylnej wody destylowanej lub sterylne buforu fosforanowego zawierającego dodatek soli 0,01 M (patrz Załącznik 5), a następnie po upływie 10 do 15 minut rozdrobnić je w celu ułatwienia dyfuzji bakterii do roztworu.

### 1.2 Ekstrakcja z liści

W przypadku gdy liście są brudne należy je ostrożnie umyć w wodzie wodociągowej, a następnie szybko powierzchniowo zdezynfekować za pomocą 70% etanolu i natychmiast wypłukać w sterylnej wodzie destylowanej. Za pomocą zdezynfekowanego ostrza skalpela pobrać fragmenty tkanki między żyłkami blaszki liściowej lub ogonków liściowych, z pogranicza plamistości lub nekroz i przenieść je do niewielkiej ilości sterylnej wody destylowanej lub sterylne buforu fosforanowego zawierającego dodatek soli (0,01 M). Pobrane fragmenty pociąć w sposób aseptyczny na małe fragmenty i pozostawić je na 10 do 15 minut w celu ułatwienia dyfuzji bakterii do roztworu.

Ekstrakty uzyskane z liści i gałązek należy poddać analizie niezwłocznie, a pozostałości ekstraktów należy przechowywać w lodówce w sterylnych jednorazowych odpowiednio oznakowanych próbkach w celu wykonania dalszych badań jeśli zaistnieje taka konieczność. W przypadku średnio długiego i długiego przechowywania (dłużej niż 24 godziny) należy dodać do pozostałego ekstraktu sterylne podwójnie destylowany glicerol (20 – 30 obj./obj.) i przechowywać w temperaturze poniżej –18°C.

## 2. Ekstrakcja bakterii z gałązek i pędów głównych nie wykazujących objawów chorobowych.

### 2.1 Uwagi ogólne

Ponieważ w materiale roślinnym, nie wykazującym objawów chorobowych populacja bakterii jest bardzo mała, a dostępne testy wykazują stosunkowo niską czułość, każda próbka testowa nie powinna składać się z więcej niż trzech gałązek. Przed ekstrakcją można przeprowadzić biologiczne wzbogacenie bakterii zgodnie z Serfontein *et al.* (1997), ale problem może stanowić obecność grzybów.

### 2.2 Ekstrakcja bakterii z gałązek lub zdrewniałych pędów głównych

Z próbkami należy postępować w sposób opisany w sekcji 1.1 pobierając w sposób losowy gałązki powierzchniowo zdezynfekowane o długości ok. 5 cm.

## Metoda alternatywna

W celu przeprowadzenia analiz pędów głównych, ekstrakt jest pozyskiwany z naczyń tkanki roślinnej poprzez wysssanie próżniowe.

Końcówki pędów głównych (odciąć 1-2 cm) należy pociąć w celu uzyskania świeżych zranień. Podstawę pędu głównego należy umieścić w 10-15 ml sterylne buforu fosforanowego, a pompkę ciśnieniową założyć na przeciwnym końcu i pobrać 2 ml ekstraktu. Alternatywnie można pobrać ekstrakt za pomocą 50 ml strzykawki z pędów głównych umieszczonych w 10-15 mm buforu. Ekstrakt ten należy użyć bezpośrednio do dalszych testów.

Ekstrakt należy użyć niezwłocznie, a jeśli jest to konieczne pozostałość ekstraktu

przechowywać w sterylnych, jednorazowych probówkach, odpowiednio oznakowanych w celu dalszego wykorzystania.

W przypadku średnio długiego i długiego przechowywania (dłużej niż 24 godziny) należy dodać do pozostałego ekstraktu sterylny podwójnie destylowany glicerol (20 – 30 obj./obj.) i przechowywać w temperaturze poniżej  $-18^{\circ}\text{C}$ .

### 2.3 Ekstrakcja z wycieków soku

Ekstrakt uzyskany z wycieku soku, nie wymaga dalszej obróbki przed wykonaniem analizy. Ekstrakt należy użyć niezwłocznie lub jeśli jest to konieczne próbki należy przetrzymać po pobraniu w lodówce, przez okres do 24 godzin, lub w przypadku dłuższego przechowywania (dłużej niż 24 godziny) należy dodać do pozostałego ekstraktu sterylny podwójnie destylowany glicerol (20 – 30 obj./obj.) i przechowywać w temperaturze poniżej  $-18^{\circ}\text{C}$ .

## Załącznik 2- ELISA

W celu wykonania ekstrakcji bakterii z próbki roślinnej lub wykorzystania kolonii bakterii do testu ELISA należy użyć buforu polecanego, przez dostawcę zestawu.

Zestaw do DAS-ELISA wykorzystujący specyficzne przeciwciała, monoklonalne (mAb) i surowicę poliklonalną, jest dostępny w handlu i pochodzi od różnych dostawców. Test należy wykonać zgodnie z opisem dostawcy, a w przypadku braku instrukcji należy postępować zgodnie z poniższymi wskazówkami:

W celu opłaszczenia płytek należy przygotować rozcieńczenie poliklonalnych immunoglobulin króliczych w stosunku 1:100 w buforze węglanowym o pH równym 9,6 (patrz załącznik 5). Dodać po 200  $\mu\text{l}$  do każdej studzienki, inkubować w temperaturze  $37^{\circ}\text{C}$  przez 4 godziny ( $\pm$  15 minut), wypłukać 3 razy przez 5 min ( $\pm$  1 minuta) w buforze PBS 0,05% Tween 20 (patrz załącznik 5).

Dodać do studzienki 200  $\mu\text{l}$  ekstraktu roślinnego lub kontrolę wewnętrzną (włączając jako roślinną kontrolę negatywną materiał pochodzący ze zdrowych roślin winorośli) lub zawiesiny bakterii.

Płytkę inkubować przez 16 godzin ( $\pm$  1 godzina) w temperaturze  $5^{\circ}\text{C}$  lub przez 4 godziny ( $\pm$  15 minut) w temperaturze  $37^{\circ}\text{C}$ .

Przygotować rozcieńczenie 1:1000 mAb i dodać po 200  $\mu\text{l}$  do każdej studzienki.

Inkubować płytkę przez 2 godziny ( $\pm$  15 minut) w temp.  $37^{\circ}\text{C}$ .

Płytki płukać w sposób opisany powyżej, a następnie przygotować rozcieńczenie w stosunku 1:1000 immunoglobulin przeciw-mysich połączonych z fosfatazą alkaliczną w buforze do koniugatu (patrz Załącznik 5).

Dodać 200  $\mu\text{l}$  do każdej studzienki.

Inkubować w temperaturze  $37^{\circ}\text{C}$  przez dwie godziny ( $\pm$  15 minut).

Wypłukać w sposób przedstawiony powyżej i przygotować roztwór substratu alkalicznej fosfatazy w buforze substratowym w ilości 1 mg/ml (paranitrofenylofosfat) (patrz załącznik 5).

Dodać po 200  $\mu\text{l}$  do każdej studzienki, inkubować w temperaturze pokojowej, a następnie odczytać przy długości fali 405 nm, najlepiej kiedy kontrola pozytywna lub próbki pozytywne dają OD o wartości pomiędzy 1,2 i 1,6 (patrz zalecenia producenta).

Należy zwrócić uwagę na to, że test można również wykonać wykorzystując 100  $\mu\text{l}$  w przypadku każdego etapu badania, ale wiąże się to z obniżeniem czułości testu.

Próbki można uznać za pozytywne w przypadku, kiedy ich wartość OD jest co najmniej dwukrotnie wyższa, niż wartość uzyskana w próbce z roślinną kontrolą

negatywną.

### Załącznik 3- konwencjonalny PCR

#### 1. Informacje ogólne

- 1.1 Protokół opracowany przez Manceau *et al.* (2005) oparty na konwencjonalnym PCR z ekstrakcją DNA i dodatkowo wykrywanie kolorymetryczne produktów PCR.
- 1.2 Lokalizacja amplikonu: sekwencje ITS bez operonu *rrn*.
- 1.3 Wielkość amplikonu 129 par zasad
- 1.4 Oligonukleotydy:
  - Xa TS1 5'-TGC GTA GTT CAA CAC CAA AGT-3'
  - Xa TS2 5'-TAT GAC CCT CTT TCC ACC AGC-3' lub
  - Xa TS2 BIO 5'Biotine-TAT GAC CCT CTT TCC ACC AGC-3'.
- 1.5 Polimeraza Taq DNA RedGoldStar<sup>®</sup> DNA polimeraza, 5 U/ µl, Eurogentec (Ougree, BE).
- 1.6 Stężony 10x bufor do amplifikacji Eurogentec (w zestawie z DNA polimerazą RedGoldStar<sup>®</sup>).
- 1.7 25 mM roztwór MgCl<sub>2</sub> (w zestawie z DNA polimerazą RedGoldStar<sup>®</sup> dostarczany przez firmę Eurogentec).
- 1.8 20 mM dNTP.
- 1.9 Woda molekularna do PCR.

#### 2. Metody

- 2.1 Ekstrakcja i oczyszczenie kwasów nukleinowych.
  - 2.1.1. Pierwszy krok w ekstrakcji został opisany w Załączniku 1.

Zawiesina bakterii jest wykorzystywana bezpośrednio do testu PCR, nie jest wymagane dodatkowe oczyszczanie DNA.
  - 2.1.2. Procedura oczyszczania kwasów nukleinowych:

Odwirować 1 ml przesącza lub zawiesiny przy 13000g przez 10 minut w temperaturze 4°C. Odrzucić supernatant.

Opcja 1: zawiesić osad w 120 µl buforu do lizy (Edwards *et.al.*,1991) (patrz Załącznik 5). Probówki inkubować w temperaturze pokojowej przez 10 minut. Mieszanie odwirować przez 10 minut z przyśpieszeniem 13000g w temperaturze 4°C. Dodać 100 µl supernatantu do 300 µl 6M roztworu jodku sodu (SALT) (patrz Załącznik 5) i 5 µl zawiesiny krzemionki (BIND).

Opcja 2: zawiesić osad w 300 µl buforu do lizy (patrz Załącznik 5). Probówki inkubować w temperaturze pokojowej przez 10 minut. Dodać 900 µl roztworu SALT (patrz Załącznik 5) oraz 10 µl roztworu BIND (patrz Załącznik 5).

Probówki odwracać od czasu do czasu w ciągu pięciu minut inkubacji. Odwirować z przyśpieszeniem 13000 g przez 20 s w celu uzyskania osadu krzemionki. Odrzucić supernatant. Osad ponownie odwirować z przyśpieszeniem 13000 g przez 20 s, a krople buforu SALT odrzucić. Następnie zawiesić osad w 1 ml roztworu WASH (patrz Załącznik 5). W celu uzyskania osadu krzemionki odwirować z przyśpieszeniem 13000 g przez 20 s a supernatant odrzucić. Uzyskany osad ponownie odwirować z przyśpieszeniem 13000 g przez 20 s, a

krople roztworu WASH odrzucić.

Osad krzemionki zawiesić w 50 µl wody molekularnej do PCR a następnie inkubować do 5 minut w temperaturze pokojowej. Na koniec próbówki odwirować z przyspieszeniem 13000 g przez 2 min. Supernatant usunąć natychmiast przenosząc go do nowej próbówki (roztwory: SALT, BIND oraz WASH są w odpowiednich ilościach dołączone do zestawu UltraClean™ 15 DNA Purification Kit wyprodukowanego przez firmę: MO BIO Laboratories, Inc, Carlsbad, CA, US).

W przypadku zastosowania testu PCR do zdrewniałego materiału roślinnego można napotkać trudności z powodu zahamowania reakcji, dlatego w celu zwiększenia czułości poleca się zastosowanie GeneReleaser™ (BioVentures, Murfreesboro, TN, US). W takim przypadku należy dodać do próbówki PCR przed amplifikacją 5 µl GeneReleaser™, a następnie 2,5 µl próbki bez mieszania. Zastosować następujący program w termocyklerze: 65°C przez 30 s, 8°C przez 30 s, 65°C przez 90 s, 97°C przez 180 s, 8°C przez 60 s. Mieszaninę PCR dodać do próbówki bez mieszania.

## 2.2 Łańcuchowa reakcja polimerazy

2.2.1 Całkowita objętość pojedynczej reakcji PCR wynosi 25 µl na próbówkę.

2.2.2 12,15 µl wody molekularnej do PCR.

2.2.3 2,5 µl 10x bufor.

2.2.4 5,0 µl MgCl<sub>2</sub> (5 mM).

2.2.5 1,125 µl dNTP (0,90 nM).

2.2.6 0,125 µl Taq polimerazy DNA RedGoldStar® (0,625 U).

2.2.7 0,80 µl Xa TS1 (0,64 µM).

2.2.8 0,80 µl Xa TS2 lub Xa TS2 BIO (0,64 µM).

2.2.9 2,5 µl zawiesiny DNA.

2.2.10 Parametry cyklu dla PCR.

Przygotowaną mieszaninę PCR należy poddać wstępnej denaturacji w temp. 94 °C przez 2 minuty, po której następuje 40 cykli (94°C przez 60 s, 60°C przez 45 s, 72°C przez 60 s) oraz etap końcowy 2 minuty w temperaturze 72°C a następnie ochłodzenie w temperaturze 4°C.

2.2.11 Produkty amplifikacji można wykryć albo przy wykorzystaniu żelu agarozowego i barwienia za pomocą bromku etydyny albo można zastosować procedurę dla kolorymetrycznego testu ELISA. Może to wpłynąć na łatwiejszą interpretację jak również czułość tego testu jest dziesięciokrotnie wyższa.

Dodać do produktów PCR 10 µl wewnętrznej sondy Xa TS-Dig (2 µM) (5'digoxigenin-AAT CGG CTG TTC TTT A-3') (nie istnieją żadne punkty krytyczne w przypadku zastosowania kolorymetrycznego testu ELISA do wykrywania, nawet w przypadku 10 krotnie mniejszego limitu wykrycia produktów PCR), a następnie poddać denaturacji w termocyklerze w temperaturze 95°C przez 3 minuty w celu wiązania sondy. Mieszaninę ochłodzić w temperaturze pokojowej przez 20 minut. Dodać po 50 µl produktu amplifikacji oraz sondy do wcześniej opłaszczonych płytek ze streptawidyną (Roche) zawierających w każdej studziencie po 200 µl buforu 1 zawierającego 0,1% BSA (patrz Załącznik 5) (w tym przypadku całkowitą objętość dla reakcji PCR i dla GeneReleaser™ należy podwoić, tak aby otrzymać 50 µl w stosunku do punktu 2.2.1.). Płytki inkubować

przez 30 minut w temperaturze pokojowej. Płynną zawartość płytki usunąć za pomocą pipety wielokanałowej, a następnie wypłukać płytkę trzykrotnie za pomocą buforu do płukania (patrz Załącznik 5). Dodać za pomocą pipety wielokanałowej 240 µl przeciwciał antydigoksygenicznych (Roche; przygotować roztwór przeciwciał w buforze 1 w stosunku 1:5000) połączonych z fosfatazą alkaliczną (150 U/ml). Płytkę inkubować przez 30 minut w temperaturze pokojowej, zawartość płytki usunąć a następnie wypłukać w sposób przedstawiony powyżej.

Przygotować substrat fosfatazy alkalicznej w ilość 1mg/ml, a następnie dodać po 200 µl do każdej studzienki. Płytkę inkubować w co najmniej 37°C przez 20 minut. Wartość OD odczytać przy długości fali 405 nm. Próbki można uznać za pozytywne, kiedy ich wartość OD jest równa w przybliżeniu wartości uzyskanej dla kontroli negatywnej, po dodaniu wartości podwójnego odchylenia standardowego.

- 2.2.12 Zaleca się, aby przygotować 10- krotne rozcieńczenia oczyszczonej zawiesiny DNA, przed amplifikacją w celu rozcieńczenia składników powodujących zahamowanie reakcji. Amplifikację przeprowadzić na roztworze wyjściowym i jego rozcieńczeniach.

### 3. Informacje proceduralne.

3.1 Kontrole: w przypadku każdego testu PCR szczególnie istotne jest zastosowanie następujących kontroli:

- Kontrola kontaminacji (negatywna) zawierająca kwasy nukleinowe organizmu innego niż poszukiwany (NA),
- Kontrola testu (pozytywna), zawierająca kwasy nukleinowe, które zostaną zamplifikowane w procesie badania może ona zawierać genomowe kwasy nukleinowe wyekstrahowane z poszukiwanego organizmu; wszystkie kwasy nukleinowe wyekstrahowane z rośliny żywicielskiej, która zawiera genomowe kwasy nukleinowe poszukiwanego organizmu, lub kontrola syntetyczna (np. sklonowany produkt PCR).

#### *Zalecenia*

- Kontrola hamowania ekstrakcji, wykorzystywana do monitorowania współekstrakcji inhibitorów. Może ona zawierać wyekstrahowane kwasy nukleinowe zawarte w mieszaninie do PCR, w której nastąpiła reakcja amplifikacji specyficznej sekwencji organizmu innego niż poszukiwany (np. gen rośliny żywicielskiej lub „uniwersalny” ITS gen). Alternatywnie, jeśli istnieje taka konieczność, można użyć syntetycznej Wewnętrznej Kontroli Amplifikacji.
- Kontrola kontaminacji ekstrakcji wykonywana dla wszystkich partii badanych próbek. Składa się ona z wyekstrahowanych kwasów nukleinowych z tzw. próbki „ślepej”, która nie zawiera kwasów nukleinowych poszukiwanego organizmu (np. nie zainfekowany materiał roślinny lub czysty bufor do ekstrakcji) (niezbędna).

3.2 Interpretacja wyników: w celu określenia wyników testu PCR należy spełnić

następujące kryteria:

- Test można uznać za pozytywny jeśli otrzymany amplikon będzie posiadał wielkość 129 par zasad pod warunkiem że, kontrole kontaminacji są negatywne.
- W przypadku uzyskania wyniku kontrowersyjnego lub niejasnego należy test powtórzyć.

## Załącznik 4- Real time PCR

### 1. Informacja ogólne

- 1.1 Test ten (Dreo *et,al.*, 2007) został sprawdzony z wykorzystaniem czystej kultury bakterii *Xylophilus ampelinus* (22 szczepy pochodzące z Francji, jeden szczep ze Słowenii, szczep referencyjny z Grecji, jeden szczep z Hiszpanii oraz 3 szczepy z Południowej Afryki), zainokulowanego materiału roślinnego oraz określonej ilości próbek pochodzących z upraw (pozytywnych i negatywnych). Sygnał otrzymano w przypadku wszystkich szczepów *Xylophilus ampelinus* wykorzystanych do testu. Nie otrzymano sygnału w przypadku wykonania testu na trzech innych patogenach występujących na winorośli (*X. fastidiosa*, *Agrobacterium vitis*, *Candidatus Phytoplasma solani*). Sygnału również nie otrzymano w przypadku *Candidatus Phytoplasma ulmi* oraz bakterii patogenicznych powodujących infekcję innych roślin żywicielskich. Nie zaobserwowano reakcji krzyżowych z tkanką winorośli różnych odmian winorośli lub z ich mikroflorą. Badanie obejmowało ekstrakcję DNA z rośliny winorośli różnych odmian nie wykazujących objawów chorobowych oraz wyizolowano bakterie z takich próbek.
- 1.2 Źródłem kwasów nukleinowych jest czysta kultura lub materiał roślinny.
- 1.3 Poszukiwanym genem jest Xamp 1.27A, 16S rDNA (Manceau *et,al.*, 2000)
- 1.4 Wielkość amplikonu podstawowych par wynosi 91 par zasad (włączając sekwencję starterów).
- 1.5 Oligonukleotydy:  
Xamp 14F (5'-CCCGATGATAAAATACCGAAAACCTC-3')  
Xamp 104R (5'-TGTCTTCTGGTTGTTTTGGTTTTAAT-3')  
Oraz sonda z mniejszym rowkiem Xamp 14F/104 MGB (5'-FAM-AGCGCCTGACGCAT-MGB)  
Jako kontrolę ekstrakcji DNA można użyć amplifikację COX (Weller *et al.*, 2000)
- 1.6 Enzym: 2× TaqMan Universal Master Mix (Zastosowano: Biosystems, Foster City, CA, US).
- 1.7 Wszystkie składniki buforu w 2× TaqMan Universal Master Mix (Zastosowano: Biosystems).
- 1.8 Źródło/jakość wody: system Milli QUF lub woda do biologii molekularnej.
- 1.9 Aparat do Real-time PCR np. ABI PRISM 7900 HT Sequence Detection.  
Aparat służący do uzyskania uniwersalnych warunków cyklicznych dla wszystkich amplikonów (2 min w 50°C, 10 min w 95°C, 40 cykli po 15 s w 95°C i 1 min w 60°C) (Zastosowano: Biosystems).

### 2. Metody

- 2.1 Ekstrakcja i oczyszczanie kwasów nukleinowych.

DNA jest ekstrahowane przy użyciu zestawu DNeasy plant mini kit (Qiagen, Les Ullis,

FR) zgodnie z instrukcją zalecaną przez producenta wraz z następującymi modyfikacjami :

- (i) DNA jest ekstrahowane z 250 µl ekstraktu roślinnego
- (ii) Nie stosuje się oddziaływania na RNase, oraz
- (iii) DNA jest wypłukane w 2x 50 µl buforu TE

Zmodyfikowana procedura Chelex (Botha *et al.*, 2001) została przetestowana jako alternatywna metoda ekstrakcji DNA dla liści i gałązek omijając pierwszy etap płukania (Dreo *et al.*, 2007). Ekstrakty należy przygotować poprzez pokrojenie wybranej tanki: uszkodzeń na liściach, zrakowaceń łodyg lub zrakowaceń pędów głównych (około 0,5 g świeżej masy) oraz umieszczenie tego materiału w sterylnym buforze 10M PBS (Załącznik 5), zworteksowanie i inkubację w temperaturze pokojowej przez kilka minut. Następnie należy oddzielić supernatant od tkanki roślinnej poprzez pipetowanie i wymieszanie z 10% obj./obj. glicerolem a następnie przechowywać w temperaturze  $-80^{\circ}\text{C}$  do czasu wykonania dalszego badania. Temperatura przechowywania DNA/RNA:  $<-15^{\circ}\text{C}$

## 2.2 Łańcuchowa reakcja polimerazy - PCR

2.2.1 Całkowita objętość pojedynczej reakcji PCR wynosi 10 µl.

2.2.2 3 µl wody molekularnej do PCR.

2.2.3 5 µl buforu do PCR.

Nie należy dodawać żadnych dodatków ani enzymów. Składniki:  $\text{MgCl}_2$ , dNTPs oraz polimeraza jak w 2x TaqMan Universal Master Mix (Dostawca: Biosystems).

2.2.4 0,9 µM przedni starter

2.2.5 0,9 µM tylny starter

2.2.6 0,25 µM sonda

2.2.7 2 µl DNA.

2.2.8 Parametry cyklu dla PCR: 2 min w  $50^{\circ}\text{C}$ , 10 min w  $95^{\circ}\text{C}$ , 40 cykli po 15 s w  $95^{\circ}\text{C}$  i 1 min w  $60^{\circ}\text{C}$

Zaleca się, aby przygotować 10- krotne rozcieńczenia oczyszczonej zawiesiny DNA w wodzie lub buforze TE, przed amplifikacją w celu rozcieńczenia składników powodujących zahamowanie reakcji. Amplifikacje przeprowadzić na roztworze wyjściowym i jego rozcieńczeniach.

## 3. Istotne informacje proceduralne

3.1 Kontrole: zawsze kiedy wykonywany jest podstawowy test PCR należy włączyć następujące kontrole:

Niezbędne:

- Kontrola kontaminacji („negatywna”) zawierająca kwasy nukleinowe innego organizmu niż organizm poszukiwany
- Kontrola analizy („pozytywna”) zawierająca kwasy nukleinowe, które zostaną poddane docelowej amplifikacji . Kontrola ta może zawierać gemonowe kwasy nukleinowe wyekstrahowane z poszukiwanego organizmu, wszystkie kwasy nukleinowe wyekstrahowane z rośliny żywicielskiej, która zawiera genomowi kwasy nukleinowe poszukiwanego organizmu lub sztuczna kontrola pozytywna (np. sklonowany produkt PCR).

Zaleca się:



- Kontrola kontaminacji ekstrakcji dla każdej partii testowanych próbek. Składa się ona z wyekstrahowanych kwasów nukleinowych przy użyciu znanej próbki „ślepej”, która nie zawiera poszukiwanych kwasów nukleinowych (np. nie zainfekowany materiał roślinny lub czysty bufor do ekstrakcji).
  - Kontrola hamowania ekstrakcji użyta w celu monitorowania współekstrakcji inhibitorów reakcji. Może ona zawierać badane wyekstrahowane kwasy nukleinowe w podstawowym PCR, o których wiadomo, że nie zawiera poszukiwanej sekwencji specyficznej. (np. przechowywane geny roślin żywicielskich lub „uniwersalny” ITS gen). Alternatywnie można użyć, jeśli jest dostępna, Wewnętrzna Kontrolę Amplifikacji.
- 3.2 Interpretacja wyników: w celu ustalenia wyników otrzymanych z podstawowego testu PCR następujące kryteria muszą zostać spełnione:
- Próbkę można uznać za pozytywną, jeśli uzyskane produkty osiągnęły wartość Ct poniżej 40 (próbki nie rozcieńczone) ale pod warunkiem, że kontrole kontaminacji ekstrakcji są negatywne.
  - Próbkę można uznać za negatywną, jeśli uzyskane produkty nie osiągnęły wartości Ct poniżej 40 ale pod warunkiem, że kontrola dla próbek oraz kontrole hamowania ekstrakcji są pozytywne.

## **Załącznik 5 – Przygotowanie podłoży oraz buforów**

### **Bufor 1 (do wykrywania kolorymetrycznego)**

100 mM kwas maleinowy

150 mM NaCl

Ustalić pH 7,5 za pomocą NaOH

### **Bufor węglanowy o pH= 9,6**

Na<sub>2</sub>CO<sub>3</sub> 1,59 g

NaHCO<sub>3</sub> 2,93 g

Uzupełnić wodą destylowaną do objętości 1,0 l.

Ustalić pH 9,6 za pomocą HCl.

Sterylizować przez autoklawowanie.

### **Bufor do koniugatu**

Albumina wołowa 0,02 g

PBS-T 10 ml

Ustalić pH 7,4

Buforu nie należy autoklawować. Przygotować bezpośrednio przed użyciem.

### **Bufor do lizy ( Bufor Edwards'a)**

Tris-HCl 200 mM

NaCl 250 mM

EDTA 25 mM

SDS 0,5%

PVP360 2%

Sterylizować przez autoklawowanie.

**Bufor fosforanowy z dodatkiem soli (0,01M) (PBS 0,01M)**

NaCl 8,0 g

Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>·12 H<sub>2</sub>O 2,7 g

NaH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>·2 H<sub>2</sub>O 0,4 g

Uzupełnić wodą destylowaną do objętości 1,0 l.

Jeśli istnieje konieczność ustalić pH o wartości 7,2.

Sterylizować przez autoklawowanie.

**Bufor fosforanowy z dodatkiem soli -Tween (PBS -T)**

Tween 20 0,5 ml

PBS (0,01M) 1l

Jeśli istnieje konieczność ustalić pH o wartości 7,2.

Sterylizować przez autoklawowanie.

**Zawiesina krzemionki (BIND)**

W cylindrze wyskalowanym na 100ml zawiesić 15 g krzemionki (Sigma, S5631) w 100 ml ultra czystej wody. Zawiesinę dobrze wymieszać, a następnie pozostawić w celu zapewnienia sedymentacji, która pojawi się w ciągu 24 godzin w temperaturze pokojowej. Pobrać 85 ml supernatantu i dodać 100 ml ultra czystej wody. Po rozpuszczeniu pozostawić krzemionkę w celu sedymentacji, która nastąpi w ciągu 5 godzin. Usunąć 90 ml supernatantu. Ustalić pH o wartości 2,0 za pomocą HCl. Zawiesinę podzielić na małe objętości i wysterylizować za pomocą autoklawu. Przechowywać zawiesinę w temperaturze 5°C.

**6M roztwór (SALT) jodku sodu (NaI)**

0,75 g Na<sub>2</sub>SO<sub>3</sub> (Sigma, S4672) rozpuścić w 40 ml wody destylowanej.

Dodać 45 g NaI (Sigma, 383112) i mieszać aż do rozpuszczenia.

Roztwór przefiltrować przez bibułę i przechowywać w ciemności w temperaturze 5°C. W przypadku zaobserwowania osadu należy roztwór wyrzucić.

**Bufor substratowy (do alkalicznej fosfatazy)**

Dietanolamina 97,0 ml

Uzupełnić wodą destylowaną do objętości 1,0 l.

Za pomocą roztworu stężonego HCl ustalić pH o wartości 9,8 (objętość roztworu HCl zależy od objętości wody destylowanej).

Sterylizować za pomocą autoklawu.

Bezpośrednio przed użyciem dodać fosforan paranitrofenylu (pNPP) w celu uzyskania końcowego stężenia 1mg/ml.

**Bufor do płukania (dla protokołu dla nested PCR)**

Tris-HCl 100 mM

NaCl 20 mM

Ustalić pH o wartości 8,8.

**Bufor do płukania (dla wykrywania kolorymetrycznego)**

Bufor 1

Tween 20 0,3%

**Roztwór płuczący (WASH)**

Tris-HCl pH 7.4 20 mM

NaCl 100 mM  
EDTA 1 mM

Dodać taką samą objętość absolutnego etanolu.

Przechowywać roztwór w temperaturze 5°C (±4 °C).

### **Agar drożdżowo peptonowo glukozowy (YPGA)**

Wyciąg drożdżowy 5,0 g  
Oxoid proteose peptone 5,0 g  
D(+) glukoza 10,0 g  
Oxoid agar N°3 12,0 g

Uzupełnić wodą demineralizowaną do 1l. Ustalić pH o wartości 6,5 – 7,0. Sterylizować przez autoklawowanie.

### **Załącznik 6- analiza kwasów tłuszczowych**

Przeprowadzić hodowlę podejrzanych izolatów oraz kultury referencyjnej *Xylophilus ampelinus* przez 48 godzin w temperaturze 28°C na podłożu TSBA. Pobrać do probówki testowej z zakrętką ok. 50 mg kultury. Dodać do każdej probówki 1 ml roztworu metanolu i wodorotlenku sodowego ( 45 g NaOH, 150 ml metanolu, 150 ml wody destylowanej).

Probówki zakręcić i wymieszać przed umieszczeniem ich w łaźni wodnej z wrzącą wodą na 5 minut. Ponownie wymieszać i ponownie umieścić probówki w łaźni wodnej na następne 25 minut. Przeprowadzić metylację kwasów tłuszczowych poprzez dodanie 2 ml roztworu metanolu i HCl (325 ml 6,0 M HCl, 275 ml metanolu). Wymieszać i umieścić probówki w łaźni wodnej nagrzanej do 80°C na 10 minut. Natychmiast schłodzić. Wykonać ekstrakcję kwasów tłuszczowych poprzez dodanie 1,25 ml roztworu metyltetrahydrofuru i heksanu (1:1 objętość/objętość). Obracać probówki na wytrząsarce obrotowej przez 10 minut. Usunąć dolną wodną warstwę za pomocą pipety Pasteura. Dodać 3 ml roztworu płuczającego (10,8 g NaOH, 900 ml wody destylowanej) i wytrząsać na wytrząsarce obrotowej przed pobraniem 2/3 górnej warstwy organicznej do probówek GC. Zamknąć probówki za pomocą teflonowych zakrętek i przeprowadzić analizę za pomocą chromatografu gazowego np. z wykorzystaniem systemu MIDI.

### **Załącznik 7- testy patogeniczności**

Inokulację *in vivo* można przeprowadzić zgodnie z Panagopoulos, (1969) na młodych zielonych gałązkach z roślin wyhodowanych w doniczkach (np. można użyć wrażliwej odmiany Sultana). Po inokulacji przetrzymywać rośliny w warunkach kwarantanny. Dla każdego szczepu podejrzanych bakterii należy zainokulować od 5-10 roślin testowych. Bezpośrednio przed inokulacją przygotować w sterylnej wodzie destylowanej zawiesinę podejrzanych bakterii *Xylophilus ampelinus*, pochodzących ze świeżej kultury uzyskanej na podłożu YPGA, o gęstości 10<sup>8</sup> kom/ml. Nanieść 1 lub 2 krople tej zawiesiny bakteryjnej na zranienia podłużne o długości 2-4 cm, wykonane za pomocą skalpela. Na taką głębokość, aby osiągnąć naczynia ksylemu, lub na świeżo zranionych liściach. Natychmiast przykryć zranienia wilgotną watą i owinąć folią aluminiową. Tą samą czynność wykonać ze znanym szczepem patogenicznym *Xylophilus ampelinus* oraz ze sterylną wodą destylowaną na dwóch zestawach roślin lub co najmniej na dwóch roślinach. Zainokulowane rośliny przetrzymywać w odpowiednich warunkach (osiągając temperaturę w ciągu dnia 27°C i 20°C w nocy, długość światła dziennego 14-18 godzin, zapewniając odpowiednią wilgotność i odpowiednie podlewanie, nawożenie i oświetlenie, tak aby winorośl mogła

normalnie rosnać). Objawy mogą pojawić się na zainokulowanych roślinach po 3-4 tygodniach a także na kontroli pozytywnej, ale nigdy nie powinny pojawić się na roślinach zainokulowanych sterylną wodą destylowaną. Kiedy typowe objawy pojawią się na roślinach zainokulowanych podejrzanym izolatem *Xylophilus ampelinus* nie jest konieczne przeprowadzenie izolacji bakterii z roślin wykazujących objawy, jeśli istnieją dowody na kontaminację próbki.

Ponieważ inokulacja *in vivo* nie zawsze kończy się sukcesem istnieje alternatywna metoda inokulacji roślin *in vitro*. Według Arregui *et al.*, 1988 oraz Peros *et al.*, 1995 do inokulacji można użyć ukorzenionych sadzonek wrażliwej odmiany winorośli (odmiana Sarah o niskiej wrażliwości; Grenache noir, Alicante Bouschet lub Tinto de Madrid o średniej wrażliwości; Juan Ibanez, Rebula o wysokiej wrażliwości). Dla każdego szczepu podejrzanych bakterii należy zainokulować od 5-10 roślin testowych. Bezpośrednio przed inokulacją przygotować w sterylnej wodzie destylowanej zawiesinę podejrzanych bakterii *Xylophilus ampelinus*, pochodzących ze świeżej kultury uzyskanej na podłożu YPGA, o gęstości  $10^9$  kom/ml. Na rośliny świeżo pozbawione wierzchołków nanieść kroplę zawiesiny bakterii. Naciąć rośliny na górze aby pozwolić kropli wnikać, a następnie utrzymywać rośliny w odpowiednich warunkach (zaleca się temp. 27°C w ciągu dnia oraz temp. 20°C w ciągu nocy). Tak samo postępować z zawiesiną znanego szczepu patogenicznego *X. ampelinus* oraz ze sterylną wodą destylowaną. Po upływie 3 tygodni na roślinach poddanych inokulacji oraz na roślinach zainokulowanych jako kontrola pozytywna powinny pojawić się objawy polegające na nienormalnej proliferacji tkanki, nekrozach lub zrakowaceniach ale nie powinny pojawić się objawy na roślinach zainokulowanych wodą. W wielu przypadkach sadzonki zainokulowane bakterią *X. ampelinus* zamierają. Reizolację bakterii z roślin wykazujących objawy chorobowe należy wykonać tylko wówczas gdy są wymagane formalne dowody na kontaminację próbki.

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