II

(Rättsakter vilkas publicering inte är obligatorisk)

KOMMISSIONEN

KOMMISSIONENS BESLUT

av den 9 september 1997

om bestämning av ett tillfälligt testprogram för diagnos, upptäckt och identifiering av Pseudomonas solanacearum (Smith) Smith hos potatis

(97/647/EG)

EUROPEISKA GEMENSKAPERNAS KOMMISSION HAR FATTAT DETTA BESLUT

med beaktande av Fördraget om upprättandet av Europeiska gemenskapen,

med beaktande av rådets direktiv 77/93/EEG av den 21 december 1976 om skyddsåtgärder mot att skadegörare på växter eller växtprodukter förs in till gemenskapen, och mot att de sprids inom gemenskapen[1], senast ändrat genom direktiv 97/14/EG[2], särskilt artikel 15.3 i detta, och

med beaktande av följande:

Enligt kommissionens beslut 95/506/EG av den 24 november 1995 om tillstånd för medlemsländerna att tillfälligt vidta tilläggsåtgärder för att förhindra spridning av Pseudomonas solanacearum (Smith) Smith från Nederländerna[3], senast ändrat genom beslut 96/599/EG[4], särskilt artikel 1.2 a bb i detta, måste en medlemsstat när den genomför officiella eller officiellt kontrollerade tester av potatis tillämpa karantänförfarande nr 26 i fråga om Pseudomonas solanacearum (Smith) Smith enligt vad som upprättats av Växtskyddsorganisationen för Europa och Medelhavsområdet (EPPO)[5] eller några andra förfaranden som godkänts i enlighet med förfarandet i artikel 16a i direktiv 77/93/EEG.

Den särskilda expertkommitté för bakteriologiska växtsjukdomar som inrättats av kommissionens tjänstegrenar och som står under Ständiga växtskyddskommitténs tillsyn har närmare fastställt ett tillfälligt testprogram som tar hänsyn till förbättrade upptäckts- och testmetoder som utvecklats efter offentliggörandet av EPPO:s karantänprocedur nr 26. Detta testprogram är tillfälligt eftersom ytterligare forskning förväntas, särskilt kring känsligheten och noggrannheten hos enskilda tester, med syfte att välja ut och standardisera de optimala tester som finns tillgängliga och inlemma dessa i en uppdaterad testmetod.

Det tillfälliga testprogram som anges i detta beslut är förenligt med yttrandet från Ständiga växtskyddskommittén.

[1] EGT L 26, 31.1.1977, s. 20.
[2] EGT L 87, 2.4.1997, s. 17.
[3] EGT L 291, 6.12.1995, s. 48.
[4] EGT L 265, 18.10.1996, s. 18.
[5] Bulletin EPPO/OEPP 20, 255–262 (1990).

HÄRIGENOM FÖRESKRIVS FÖLJANDE.

Artikel 1

För att genomföra bestämmelserna i artikel 1.2 a bb i beslut 95/506/EG, i sin senast ändrade lydelse, skall karantänförfarande nr 26 för Pseudomonas solanacearum (Smith) Smith som Växtskyddsorganisationen för Europa och Medelhavsområdet (EPPO) har fastställt ersättas med det tillfälliga testprogrammet för diagnos, spårning och identifiering av Pseudomonas solanacearum (Smith) Smith som fastställs i bilagan till detta beslut.

Artikel 2

Detta beslut riktar sig till medlemsstaterna.

Utfärdat i Bryssel den 9 september 1997

På kommissionens vägnar
Franz FISCHLER
Ledamot av kommissionen

BILAGA

TILLFÄLLIGT TESTPROGRAM FÖR DIAGNOS, DETEKTION OCH IDENTIFIERING AV *PSEUDOMONAS SOLANACEARUM* (SMITH) SMITH

TESTPROGRAMMETS RÄCKVIDD

Det presenterade programmet beskriver de olika förfarandena för

(i) diagnos av mörk ringröta i potatisplantor och knölar,

(ii) detektering av *Pseudomonas solanacearum* i prov av potatisknölar,

(iii) identifiering av *Pseudomonas solanacearum.*

Detaljerade anvisningar för preparering av testmaterial, dvs. odlingssubstrat, buffertar, lösningar och reagens ges i tilläggen.

INNEHÅLL

Sektion I. **Tillämpning av testprogrammet** 4

1. Diagnos av mörk ringröta i potatisplantor och knölar 4
2. Detektering och identifiering av *Pseudomonas solanacearum* i prover av potatisknölar 6

Sektion II. **Diagnos av mörk ringröta i potatisplantor och knölar** 8

1. Symtom på mörk ringröta 8
2. Snabbscreeningstest(er) 8
3. Isoleringsförfarande 9
4. Verifieringstest(er) 9

Sektion III. **Detektering och identifiering av *Pseudomonas solanacearum* i prover av potatisknölar** . 12

1. Preparering av prov för testning 12
2. Immunofluorescens-(IF-)test 13
3. Enzyme Linked Immuno-Sorbent Assay (ELISA) test 15
4. Polymerase Chain Reaction (PCR™) test 15
5. Odling på selektivt medium 17
6. Biotest 18
7. Anrikningstest 18
8. Patogenitetstest 18

Tillägg 1. Näringsmedier för isolering och odling av *Pseudomonas solanacearum* 19

Tillägg 2. Material för provpreparering 20

Tillägg 3. Material för IF-test 21

Tillägg 4. Bestämning av kontamineringsnivå i IF-testet 22

Tillägg 5. Material för ELISA-test 23

Tillägg 6. Material för PCR-test 24

Tillägg 7. Material för odling på selektivt medium 24

Referenser 25

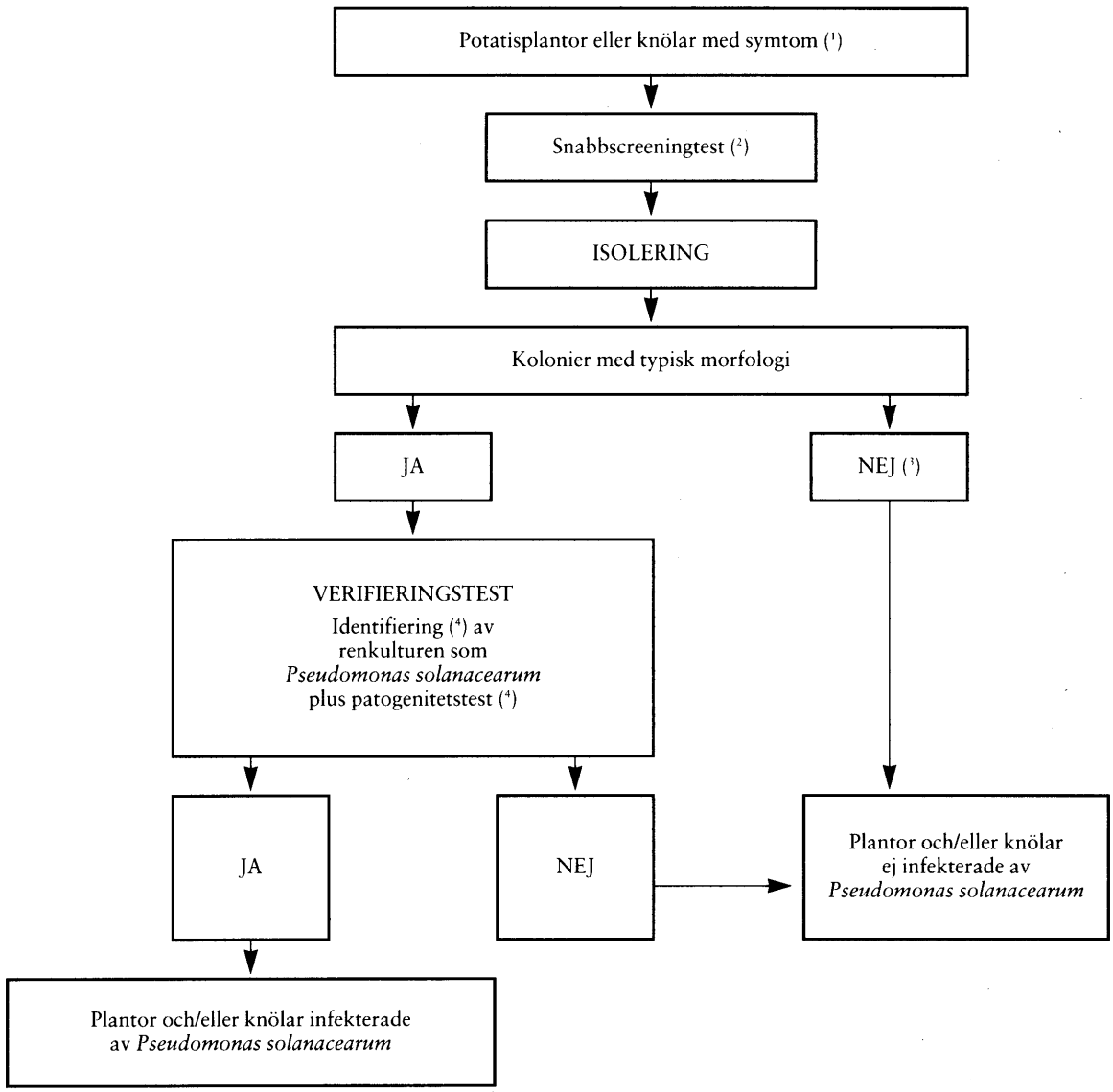
SEKTION I

TILLÄMPNING AV TESTPROGRAMMET

1. **Diagnos av mörk ringröta i potatisplantor och knölar**

Testmetoden är avsedd för plantor och knölar med symtom som är typiska för eller ger anledning misstänka mörk ringröta. Den omfattar ett snabbscreeningtest, isolering av patogenen från infekterad kärlvävnad på diagnostiskt medium och, vid positivt utslag, identifiering av kulturen som *Pseudomonas solanacearum*.

Flödesdiagram



Referenser till flödesdiagrammet

(1) Symtomen beskrivs i sektion II.1.

(2) Ett snabbscreeningtest underlättar presumtiv diagnos.

Lämpliga testmetoder är:
Strömningstest av kärlvävnad från stjälkar (sektion II.2).
Test för poly-ß-hydroxibutyratkorn (sektion II.2).
IF-test (sektion III.2).
ELISA-test (sektion III.3).
PCR-test (sektion III.4).

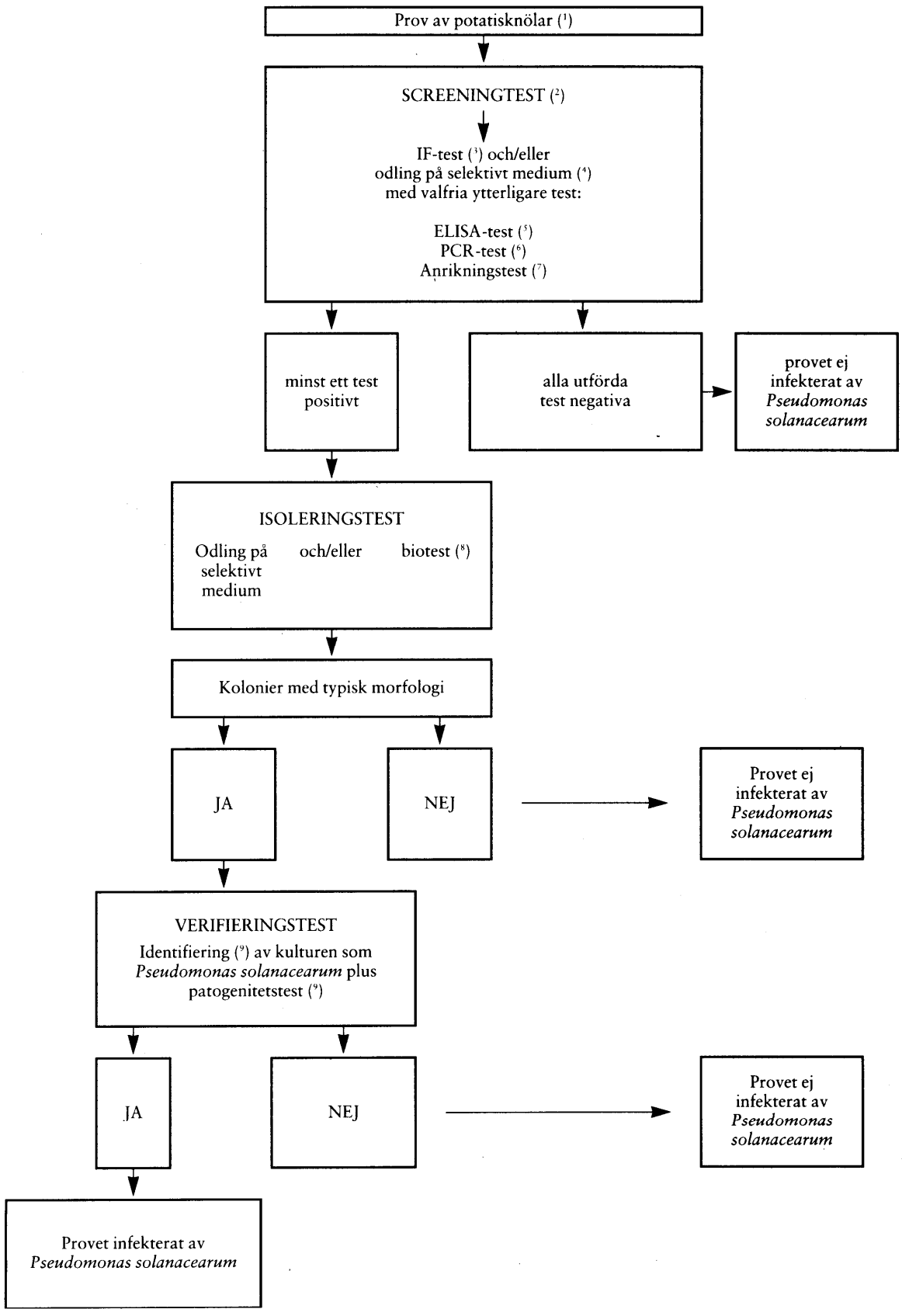
(3) Även om isolering av patogenen genom plattspridning av olika utspädningar från plantor med typiska symtom är enkel kan odling i kultur från långt framskridna infektionsstadier misslyckas. Saprofytiska bakterier som växer på sjuk vävnad kan växa fortare än eller hämma patogenen på isoleringsmediet. Om isoleringstestet är negativt men sjukdomssymtomen är typiska måste isoleringen upprepas, helst genom odling på selektivt medium.

(4) En renkultur av *Pseudomonas solanacearum* kan identifieras tillförlitligt genom minst ett av testen i sektion II.4.1 i kombination med ett patogenitetstest (sektion II.4.3). Karaktärisering av isolat är valfri men rekommenderas för varje nytt fall.

2. **Detektering och identifiering av *Pseudomonas solanacearum* i prover av potatisknölar**

Metoden används för detektering av latenta infektioner i potatisknölar genom ett eller helst flera screeningtest vilka, om de är positiva, verifieras genom isolering av patogenen, följd av, då det gäller isolering av typiska kolonier, identifiering av en renkultur som *Pseudomonas solanacearum*.

Flödesdiagram



Referenser till flödesdiagrammet

(1) Provmängd

Standardiserad provmängd är 200 knölar. Proceduren kan emellertid även lätt användas för prover med färre knölantal.

(2) Screeningtest

Det är möjligt att ett enda test inte är tillräckligt känsligt eller tillförlitligt för att detektera *Pseudomonas solanacearum* i ett prov. Därför rekommenderas mer än ett test. Om möjligt bör dessa test företrädesvis utföras enligt metoder baserade på olika biologiska principer.

(3) Immunofluorescens-(IF)-test

IF-testet (indirekt metod) är ett väl etablerat screeningtest. Detta är en fördel jämfört med andra test som ännu inte är fullt utvecklade eller godkända. Testet används för andra lagstadgade bakterier, t.ex *Clavibacter michiganensis* subsp. *sepedonicus*. Med de avläsningsparametrar som specificeras i denna metod är den ett känsligt test (tröskelvärde 10^3–10^4 celler per ml potatisextraktpellet).

Den kritiska faktorn för testresultatens tillförlitlighet är kvaliteten på antiserumet. Endast ett antiserum med hög titer (minimum 2000 för råserumet) kan godtas, och alla test måste utföras vid antiserumets titer eller en utspädning lägre än denna. Den indirekta metoden är att föredra. Den direkta metoden kan tillämpas om testet har en känslighetsnivå och specificitet som motsvarar den indirekta metodens.

IF-testet har fördelen av en subjektiv tolkning av cellmorfologin och fluorescensintensiteten som ger information om specificiteten. Korsreaktioner med serologiskt besläktade bakterier från jord eller potatisvävnad med likartad cellmorfologi som *Pseudomonas solanacearum* är vanliga. IF-testet kan användas som enda screeningtest, men i fall där korsreaktioner misstänks skall ett andra screeningtest, baserat på en annan biologisk princip, utföras. I så fall är odling på selektivt medium det lämpligaste testet.

(4) Odling på selektivt medium

Med det modifierade SMSA-mediet och den testmetod som specificeras i denna metod är detta ett känsligt och selektivt test för *Pseudomonas solanacearum*. Resultaten finns tillgängliga 3–6 dygn efter provprepareringen. Patogenen erhålls direkt i kultur och kan lätt identifieras. För fullt utnyttjande av dess potential kräver testet noggrann preparering av naveländar för att undvika sekundära bakterier som följer med potatisknölen, som konkurrerar med *Pseudomonas solanacearum* på mediet och som kan påverka patogenens utveckling. Vissa stammar kan växa svagt då mediets komponenter också kan påverka målorganismen. *Pseudomonas solanacearum* måste noga skiljas från andra bakterier som kan utvecklas på mediet. Odling på selektivt medium kan användas som enda screeningtest, men om ett negativt testresultat erhålls och hämning av *Pseudomonas solanacearum* genom andra bakterier på mediet misstänks bör ett andra screeningtest göras. I så fall är IF-testet lämpligast.

(5) ELISA-test

ELISA-testet är vanligen mindre känsligt än IF-testet (tröskelvärde 10^4–10^5 celler per ml potatisextraktpellet). Testet är billigt och snabbt men vanligen mera utsatt för felaktigt positiva resultat (korsreaktioner) och felaktigt negativa resultat (hämning genom fenolmolekyler i potatisextraktet). Kraven på antiserumspecificitet är utomordentligt höga varför ELISA-testet inte kan användas som enda screeningtest.

(6) PCR-test

PCR har potential för en mycket känslig detektion. Även om det är möjligt att upptäcka en enda DNA-molekyl i ett prov hämmas testet lätt av växt- eller knölextraktkomponenter vilket leder till felaktiga negativa resultat. Vissa potatissorter innehåller flera inhibitorer än andra. Det är därför nödvändigt att avlägsna dessa inhibitorer. Inhiberingen kan reduceras genom utspädning, men populationerna av *Pseudomonas solanacearum* späds också ut. Stor försiktighet måste iakttas i alla stadier av prov- och testpreparering för att förhindra kontaminering som skulle leda till felaktiga positiva test. Falska positiva test kan också uppträda genom sekvenshomologi från andra organismer. Av dessa skäl kan direkt PCR inte användas som enda screeningtest.

(7) Anrikningstest

Inkubation av potatisextraktprover på ett semi-selektivt substrat, t.ex. modifierat SMSA-substrat, möjliggör förökning av *Pseudomonas solanacearum*. Kanske mera betydelsefullt är att det även späder ut potentiella inhibitorer av ELISA- eller PCR-test. *Pseudomonas solanacearum* på anrikningssubstrat kan alltså upptäckas genom IF, ELISA och PCR. Vi rekommenderar inte direkt plattspridning från anrikat substrat. Dessa anrikningsmetoder är inte grundligt prövade och testade. De tas med här därför att de har en god potential. Eftersom det finns relativt lite erfarenhet av dem kan de emellertid inte användas som enda metoder för detektion.

(8) Biotest

Biotest används för isolering av *Pseudomonas solanacearum* i potatisextraktpellets genom selektiv anrikning i en värdväxt och kan göras på tomatplantor eller äggplantor. Testet kräver optimala inkubationsförhållanden enligt metodens specifikation. Bakterier som hämmar *Pseudomonas solanacearum* på SMSA-medium kommer sannolikt inte att interferera i detta test.

(9) Verifierande test(er)

En renkultur av *Pseudomonas solanacearum* kan identifieras tillförlitligt genom minst ett av testen i sektion II.4.1 i kombination med ett patogenitetstest (sektion II.4.3). Karaktärisering av isolat är valfri men rekommenderas för varje nytt fall.

SEKTION II

DIAGNOS AV MÖRK RINGRÖTA I POTATISPLANTOR OCH KNÖLAR

1. Symtom på mörk ringröta

Potatisplantan

I det tidiga skedet av infektionen vissnar bladen mot toppen av plantan vid höga dagstemperaturer, men återhämtar sig under natten. Vissningen blir snabbt irreversibel och leder till att plantan dör. Kärlvävnaden i stjälkar skurna på tvären från vissnade plantor kan bli brun och ett mjölkaktigt sekret avsöndras från den skurna ytan eller kan lätt pressas ut. När en skuren stjälk ställs i vatten strömmar trådar av slem ut från kärlknippena.

Potatisknölen

Potatisknölarna måste skäras på tvären nära navel-(= stolon-)änden. I det tidiga skedet av infektionen syns en glasaktig gul till ljusbrun missfärgning av kärlringen från vilken ett blekgult krämartat sekret spontant kommer fram efter några minuter eller när man trycker lätt med tummen på skalet nära den skurna ytan. Senare blir kärlmissfärgningen tydligare brun och nekrosen kan sprida sig till parenkymvävnaden. Vid ett långt framskridet skede bryter infektionen fram från naveländen och ögonen vilket ger rödbruna, lätt insjunkna lesioner i skalet från vilka bakterieslem utsöndras så att jordpartiklar häftar vid.

2. Snabbscreeningtest

Ett snabbscreeningtest underlättar presumtiv diagnos. Använd ett eller flera av följande test:

Kärlströmningstest

Närvaron av *Pseudomonas solanacearum* i vissnande potatisstjälkar kan bestämmas genom följande enkla presumtiva test:

Skär av stjälken strax ovan markytan. Ställ den avskurna stjälken i en bägare med vatten. Strax kommer trådar av bakterieslem att spontant strömma ut ur kärlknippena. Inga andra bakterier som orsakar infektion av potatisplantornas kärlvävnader visar detta fenomen.

Detektion av poly-β-hydroxybutyrate (PHB) korn

PHB-kornen i celler av *Pseudomonas solanacearum* kan göras synliga genom färgning med Nilblått A eller med Sudansvart B.

Bered antingen ett utstryk av bakterieslemmet eller den suspenderade vävnaden på ett objektglas, eller ett utstryk av en 48-timmars kultur på YPGA eller SPA (tillägg 1). Bered som kontroll positiva utstryk av en biovar 1/ras 3-stam och om det anses lämpligt en negativ kontroll från en heterolog stam.

Låt torka. För snabbt undersidan av glaset flera gånger genom lågan tills utstryket är fixerat.

Nilblått-test

1. Dränk in det fixerade utstryket med en 1 % vattenlösning av Nilblått A. Inkubera i 10 minuter vid 55 °C.
2. Dränera av färglösningen. Tvätta snabbt i långsamt rinnande kranvatten. Avlägsna överskottsvatten med läskpapper.
3. Dränk in utstryket med 8 % lösning av ättiksyra i vatten. Inkubera i 1 minut vid rumstemperatur.
4. Tvätta försiktigt i rinnande kranvatten. Läska torrt.
5. Återfukta med en droppe vatten. Sätt på ett täckglas.
6. Undersök det färgade utstryket i epifluorescensmikroskop vid 450 nm under oljeimmersion vid 1000x förstoring.

   Leta efter ljusorange fluorescens av PHB-korn. Undersök också provet i vanligt ljus för att säkerställa att kornen är intracellulära och att cellmorfologin är typisk för *Pseudomonas solanacearum*.

Sudansvarttest

1. Dränk in det fixerade utstryket med 0,3 % Sudansvart B-lösning i 70 % etanol. Inkubera i 10 minuter vid rumstemperatur.
2. Dränera av färglösningen. Tvätta snabbt i kranvatten. Avlägsna överskottsvatten med läskpapper.
3. Doppa utstryket en kort stund i xylol. Läska torrt.

   Varning! Xylol är en farlig produkt. Arbeta i dragskåp.
4. Dränk in utstryket med 0,5 % (w/v) safranin i vatten och lämna i 10 sekunder vid rumstemperatur.

   Varning! Safranin är en farlig produkt. Arbeta i dragskåp.
5. Tvätta i långsamt rinnande kranvatten. Läska torrt. Sätt på ett täckglas.
6. Undersök det färgade utstryket i ljusmikroskop (genomfallande ljus) under oljeimmersion vid 1000x förstoring.

   PHB-korn i celler av *Pseudomonas solanacearum* färgas blåsvarta. Cellväggarna färgas skära.

Andra tester

Andra lämpliga screeningtester är IF-testet (sektion III.2), ELISA-testet (sektion III.3) och PCR-testet (sektion III.4).

3. Isoleringsförfarande

3.1 Avlägsna bakterieslem eller partier med missfärgad vävnad från knölens kärlring eller från stjälkens kärlsträngar. Suspendera bakterieslem eller missfärgad vävnad i en liten volym sterilt destillerat vatten eller 50 mM fosfatbuffert. Låt stå på bänken 5–10 minuter.

3.2 Bered en decimal utspädningsserie, t ex 1/10 och 1/100, av suspensionen eller mer om detta bedöms lämpligt.

3.3 Överför en standardvolym av suspensionen på ett vanligt näringsmedium (NA, YPGA och SPA, tillägg 1) och/eller Kelmans tetrazolium medium (tillägg 1) och/eller SMSA selektivt medium (tillägg 7). Sprid en utspädningsserie med lämplig plattspridnings- eller strykteknik. Om det anses lämpligt förbereds separata plattor före varje medium med en cellsuspension av en virulent biovar 2/ras 3-stam av *Pseudomonas solanacearum* som positiv kontroll.

3.4 Inkubera plattorna i 3 dygn vid 28 °C. Inkubationen kan förlängas till 6 dygn om tillväxten är långsam, men kolonier på SMSA plattor blir ofta atypiska och dör.

På det allmänna näringsmediet utvecklar virulenta isolat av *Pseudomonas solanacearum* pärlvita, platta, oregelbundna, flödiga kolonier med karakteristiska virvlar.

På Kelmans tetrazolium medium utvecklar virulenta isolat av *Pseudomonas solanacearum* gräddvita, platta, oregelbundna och flödiga kolonier med blodrödfärgade virvlar i centrum. Icke virulenta former utvecklar smörlika, djupröda kolonier.

På SMSA mediet utvecklar virulenta isolat av *Pseudomonas solanacearum* mjölkvita, platta, oregelbundna, flödiga kolonier med tydliga röda till purpurfärgade centra.

Avirulenta former av *Pseudomonas solanacearum* utvecklar mindre flödiga kolonier som är helt skära till röda på SMSA-mediet.

3.5 Renodla kolonier med karakteristisk morfologi genom subkultur på ett vanligt näringsmedium. Undvik regelbunden subkulturodling som kan framkalla virulensförlust.

4. Verifieringstester

4.1 *Identifiering av Pseudomonas solanacearum*

Identifiera renkulturer av *Pseudomonas solanacearum* med minst en av följande metoder:

Närings- och enzymatiska test

Obs: Inkludera lämpliga kontrollisolat i varje test.

Följande fenotypiska egenskaper hos *Pseudomonas solanacearum* är alltid närvarande eller frånvarande:

Fluorescerande pigment	–
PHB-innehåll	+
Oxidation/Fermentation (O/F) test	O+/F–
Katalas	+
Kovacs' oxidas	+
Nitratreduktion	+
Citratutnyttjande	+
Växt vid + 40 °C	–
Tillväxt i 1 % NaCl	+
Tillväxt i 2 % NaCl	–
Arginindihydrolas	–
Gelatinsmältning	–
Stärkelsehydrolys	–
Aesculinhydrolys	–
Levanproduktion	–

(Lelliott and Stead, 1987)

IF-test

Bered en suspension av 10^6 celler per ml av kulturen och kontrollisolaten. Bered en serie av tvåfaldiga utspädningar av antiserumet. Tillämpa IF-metoden (sektion III.2). Kulturen måste ha samma IF-titer som den positiva kontrollen.

ELISA-test

Bered en suspension av $> 10^6$ celler per ml av kulturen och ett positivt kontrollisolat. Tillämpa ELISA-metoden (sektion III.3). Kulturen måste ha samma ELISA-värde som den positiva kontrollen.

PCR-test

Bered en suspension av 10^6 celler per ml av kulturen och ett positivt kontrollisolat. Tillämpa PCR-metoden (sektion III.4). PCR-produkten av kulturen måste ha samma storlek och restriction enzyme analysis (REA)-mönster som den positiva kontrollen.

Fluorescent in-situ-hybridisering (FISH)

Bered en suspension av 10^6 celler per ml från kulturen och ett positivt kontrollisolat. Tillämpa FISH-metoden (van Beuningen et al, 1995) med OLI-1 PCR-primern (Seal et al, 1993). Kulturen måste visa samma reaktion som den positiva kontrollen.

Proteinprofilering

Denaturerade hela cellproteiner separeras genom polyakrylamidgelelektrofores -PAGE (Stead, 1992a).

Fettsyraprofilering (FAP)

Odla kulturen och ett positivt kontrollisolat i 48 timmar vid 28 °C på trypticase-soja-agar och tillämpa FAP-metoden (Janse, 1991; Stead, 1992a; Stead, 1992b). Kulturen måste visa samma profil som den positiva kontrollen. Under de specificerade villkoren är 14:0 3OH, 16:0 2OH, 16:1 2OH och 18:1 2OH karakteristiska fettsyror.

4.2 *Isolatkarakterisering*

Karakterisering av isolat är valfri men rekommenderas för varje nytt fall med minst en av följande metoder:

Biovarbestämning

Pseudomonas solanacearum separeras i biovarer på grundval av förmågan att producera syra från tre hexosalkoholer och tre sockerarter (Hayward, 1964 och 1994):

	Biovar				
	1	2	3	4	5
Utnyttjande av:					
— maltos	–	+	+	–	+
— laktos	–	+	+	–	+
— cellobios	–	+	+	–	+
— mannitol	–	–	+	+	+
— sorbitol	–	–	+	+	–
— dulcitol	–	–	+	+	–

Ytterligare test differentierar biovar 2 i subfenotyper (Hayward, 1994):

	Biovar 2	Biovar 2-A	Biovar 2-T
Utnyttjande av trehalos	–	+	+
Utnyttjande av inositol	+	–	+
Utnyttjande av D-ribos	–	–	+
Pectolytisk aktivitet	låg	låg	hög

Rasbestämning

Rasen (Buddenhagen et al., 1962) bestäms på grundval av ett patogenitetstest på tomatplantor eller äggplantor och tobaksplantor och genom ett hypersensitetsreaktionstest (HR) på tobaksblad (Lozano och Sequeira, 1970):

	Ras(*)		
	1	2	3
Reaktion på:			
— tomatplanta/äggplanta	vissning	ingen reaktion	vissning
— tobaksplanta	vissning	ingen reaktion	ingen reaktion
— tobaksblad	nekros (48 tim) och vissning (7–8 dagar)	HR (12–24 tim)	kloros (2–8 dagar)

(*) Ras 4 (patogen på ingefära och några andra värdväxter) och ras 5 (endast patogen på mullbär) är inte inkluderade.

Rasbestämning genom patogenitetstest eller hypersensitivitetstest på tobak är inte helt tillförlitligt och kan istället bedömas utifrån biovartillhörighet och den naturliga värdväxten.

Kulturen kan dessutom karakteriseras genom:

Genomiskt fingeravtryck

Molekylär differentiering av stammar av *Pseudomonas solanacearum*-komplexet kan göras genom:

RFLP-analyse (Cook et al., 1989)

Repetitiv sekvens-PCR [REP-, ERIC- & BOX-PCR (Louws et al., 1995; Smith et al., 1995)].

4.3 *Patogenitetstest*

Detta test används för verifering av diagnosen av *Pseudomonas solanacearum* och för bedömning av virulens hos kulturer identifierade som *Pseudomonas solanacearum*.

Bered ett inokulum av 10^6 celler per ml av kulturen och ett positivt kontrollisolat. Inokulera 5–10 tomatplantor eller äggplantor på trebladsstadiet eller äldre (sektion III.6). Inkubera i upp till 2 veckor vid 22–28 °C och hög relativ fuktighet med daglig vattning. Observera vissningssymtom och/eller epinasti, kloros, dvärgväxt.

Isolera från plantor med symtom:

— Avlägsna en bit växtvävnad från stjälken, 2 cm ovanför inokuleringspunkten.

— Finfördela och suspendera i en liten volym sterilt destillerat vatten eller 50 mM forsfatbuffert. Sprid ut på agar, inkubera och kontrollera om plattorna har typiska kolonier av *Pseudomonas solanacearum*.

SEKTION III

DETEKTERING OCH IDENTIFIERING AV *PSEUDOMONAS SOLANACEARUM* I PROVER AV POTATISKNÖLAR

Obs: Standardiserad provmängd är 200 knölar. Proceduren kan emellertid även lätt användas för prover med färre knölantal.

1. **Beredning av provet för testning**

Obs! Den potatisextraktpellet som erhålls i detta förfarande kan även användas för detektion av *Clavibacter michiganensis* subsp. *sepedonicus*.

Åtgärder före test, om de anses lämpliga:

i) Inkubera provet vid 25–30 °C i upp till 2 veckor för att stimulera förökning av låga populationer av *Pseudomonas solanacearum*.

ii) Tvätta knölarna under rinnande vatten med lämpliga desinfektionsmedel och tvättmedel. Lufttorka knölarna.

1.1 Avlägsna med en ren, desinficerad skalpell eller grönsakskniv epidermis från varje knöls navelände så att kärlvävnaderna just blir synliga. Skär försiktigt ut en liten konisk kärna (3–5 mm i diameter) av kärlvävnad i naveländen av varje knöl. Mängden icke-kärlvävnad skall vara minsta möjliga. Naveländar skärs från varje knöl.

Obs! Okulärbesiktning av knölarna (sektion II.1) kan göras på detta stadium. Lägg undan alla knölar med symtom eller kraftig röta och testa separat (sektion II).

1.2 Samla naveländarna i en sluten behållare. Naveländarna bör helst behandlas omedelbart. Är detta inte möjligt bör de inte lagras längre än 24 timmar – eller vid 4 °C inte längre än 72 timmar.

1.3 Behandla naveländarna enligt något av följande förfaranden:

i) Överför naveländarna till en lämplig behållare.

Sätt till en så stor volym malningsbuffert (tillägg 2) att kärnorna täcks. Finfördela naveländarna i en mixer eller med Ultra Thurrax tills de precis nått fullständig homogenisering. Undvik överdriven homogenisering. Låt det upplösta materialet dra i 15–30 minuter.

ii) Överför naveländarna till en lämplig behållare.

Sätt till så mycket malningsbuffert att naveländarna täcks.

Placera behållaren på en rotationsskak.

Inkubera vid 50–100 rpm i 4 timmar vid 20 °C–22 °C eller i 16–24 timmar vid 4 °C.

iii) Överför naveländarna till en kraftig engångspåse för finfördelning (t.ex. Stomacherpåse med dimensionerna 105 x 150 mm, steriliserad genom strålning).

Krossa naveländarna försiktigt med ett lämpligt verktyg, t.ex. en hammare, tills de precis nått fullständig homogenisering.

Sätt till en malningsbuffert så att de krossade naveländarna täcks.

Låt det upplösta materialet sätta sig i 15–30 minuter.

1.4 Extrahera bakterierna från de behandlade naveländarna med någon av följande metoder:

i) Dekantera försiktigt det upplösta materialet i ett centrifugrör så att avfallet stannar kvar i behållaren eller påsen. Om det dekanterade upplösta materialet är grumligt: centrifugera vid högst 180 g i 10 minuter vid en temperatur understigande 10 °C.

Centrifugera det dekanterade upplösta materialet eller vätskefasen från det första centrifugeringssteget vid 7 000 g i 15 minuter eller vid 10 000 g i 10 minuter vid en temperatur understigande 10 °C.

Kasta bort vätskefasen utan att störa pelleten.

ii) Filtrera det dekanterade upplösta materialet genom ett filtreringssystem vid en porstorlek av 40–100 μm. Påskynda filtreringen med hjälp av en vakuumpump.

Samla upp filtratet i ett centrifugrör.

Tvätta filtret med malningsbuffert.

Centrifugera filtratet vid 7 000 g i 15 minuter eller vid 10 000 g i 10 minuter vid en temperatur understigande 10 °C.

Kasta bort vätskefasen utan att störa pelleten.

1.5 Återsuspendera pelleten i 1 ml pelletbuffert (tillägg 2).

Dela i två lika delar och överför varje del till ett mikrorör.

Använd ett mikrorör för testning. Bevara resten av detta extrakt vid 4 °C under testningen.

Tillsätt 10–25 % (v/v) steril glycerol till det andra mikroröret. Skaka. Lagra vid – 18 °C (veckor) eller vid – 70 °C (månader).

2. **Immunofluorescens-(IF)-test**

Använd antiserum för *Pseudomonas solanacearum*, helst ras 3/biovar 2. Bestäm titern på en suspension av 10^6 celler per ml från den homologa stammen av *Pseudomonas solanacearum* med en lämplig utspädning av fluoresceinisothiocyanat-(FITC-)konjugat enligt tillverkarens rekommendationer. Råserum bör ha en IF-titer av minst 1:2 000.

Använd multispot-objektglas med helst 10 fönster av minst 6 mm diameter.

Tillsätt en FITC-konjugatkontroll på varje testglas. Testet bör upprepas med en PBS-kontroll om någon positiv cell observeras i FITC-kontrollen.

Bered separata positiva kontrollglas med en suspension av 10^6 celler per ml från ett lämpligt ras/biovarisolat av *Pseudomonas solanacearum*. Ta med ett glas i varje testserie.

2.1 Preparera testglas enligt någon av följande metoder:

i) För pelletar med relativt lite stärkelse:

Pipettera en uppmätt standardvolym (15 µl är lämpligt för 6 mm fönsterdiameter – öka volymen för större fönster) av den återsuspenderade pelleten på en fönsterrad. Den återstående raden kan användas som duplikat eller för ett andra prov enligt figur 1.

ii) För andra pelletar:

Bered decimala utspädningar, d.v.s. 1/10, 1/100 och 1/1 000 av den återsuspenderade pelleten i pelletbuffert. Pipettera en uppmätt standardvolym (15 µl är lämpligt för 6 mm fönsterdiameter – öka volymen för större fönster) av den återsuspenderade pelleten och varje utspädning på en fönsterrad. Den återstående raden kan användas som duplikat eller för ett andra prov enligt figur 2.

2.2 Låt dropparna torka. Fixera bakteriecellerna på glaset antingen genom upphettning, flambering med 95 % etanol.

2.3 IF-förfarande

i) Enligt testglaspreparering i 2.1 (i):

Bered en serie dubbla utspädningar av antiserumet i IF-buffert (Tillägg 3):

1/4 av titern (T/4), 1/2 av titern (T/2), titern (T) och dubbla titern (2T).

ii) Enligt testglaspreparering i 2.1 (ii):

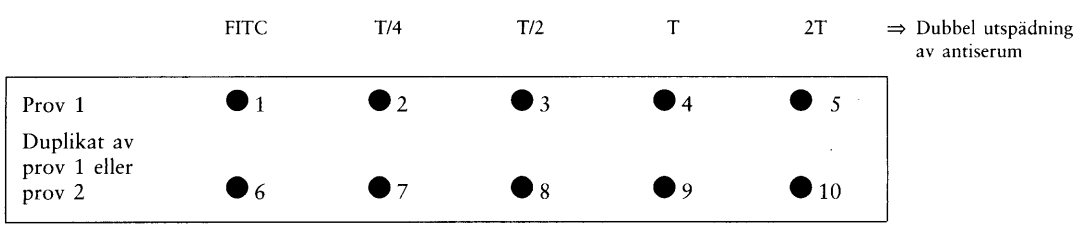
Bered arbetsutspädningen (WD) av antiserumet i IF-buffert. Arbetsutspädningen är den utspädning av antiserum som har optimal specificitet och är vanligen halva titern.

Figur 1

Preparering av testglas enligt 2.1i och 2.3i

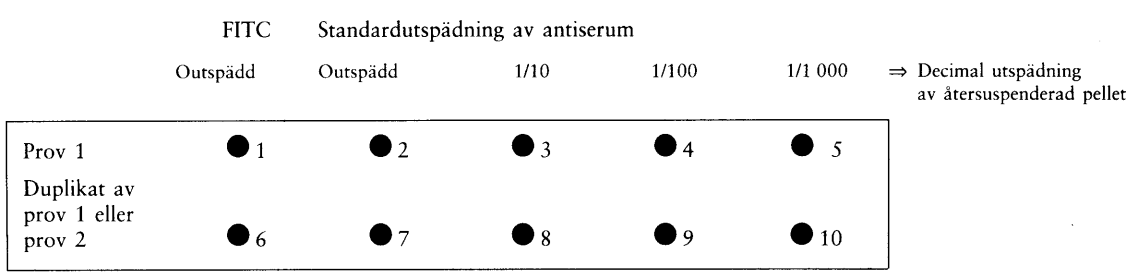
En standardutspädning av återsuspenderad pellet

T = titer



Figur 2

Preparering av testglas enligt 2.1ii och 2.3ii



2.3.1 Ordna glasen på fuktigt hushållspapper/pappershandduk.

Täck fönstren med antiserumutspädning(ar). Tillsätt PBS på FITC-fönstren. Den volym antiserum som tillsätts på fönstren måste vara lika med volymen tillsatt extrakt.

2.3.2 Inkubera under lock i 30 minuter vid rumstemperatur.

2.3.3 Skaka av antiserumdropparna från glaset och skölj glasen noga med IF-buffert. Tvätta 5 minuter i IF-buffert-Tween och sedan 5 minuter i IF-buffert (tillägg 3).

Avlägsna noga överskottsfukt med papper.

2.3.4 Ordna glasen på fuktigt papper.

Täck testfönstren och FITC-fönstret med den utspädning av FITC-konjugat som används för att bestämma titern. Den volym konjugat som tillsätts på fönstren måste vara lika med volymen tillsatt antiserum.

2.3.5 Inkubera under lock i 30 minuter vid rumstemperatur.

2.3.6 Skaka av konjugatdropparna från glaset. Skölj och tvätta som ovan (2.3.3).

Avlägsna noga överskottsfukt.

2.3.7 Pipettera 5–10 µl 0,1 M fosfatbuffrad glycerol (tillägg 3) eller motsvarande på varje fönster och lägg på ett täckglas.

2.4 Avläsning av IF-testet

Undersök testglasen i ett epifluorescensmikroskop med filter lämpliga för FITC under oljeimmersion vid 500–1 000 gångers förstoring. Scanna fönstren utefter två diametrar i rät vinkel och runt perimetern.

Kontrollera glaset med positiv kontroll först. Cellerna måste vara klart fluorescerande och helt färgade. *Obs! Testet måste återupprepas om färgningen är avvikande.*

Avläs testglasen. Sök efter frånvaro av fluorescerande celler i FITC-kontrollfönstret. Fluorescerande celler i FITC-kontrollen indikerar icke-specifik bindning av konjugatet, autofluorescens eller kontaminering. *Obs! Upprepa testet om sådana observeras.*

Sök efter ljusa fluorescerande celler med karakteristisk morfologi av *Pseudomonas solanacearum* i testfönstren. Fluorescensintensiteten måste motsvara det positiva kontrollisolatets vid samma antiserumutspädning. Celler med ojämn eller ofullständig färgning eller med svag fluorescens beaktas inte om det inte finns många sådana celler (se tolkning av IF testresultat).

Tolkning av IF-testresultatet

i) För varje prov som saknar ljusa fluorescerande celler med karakteristisk morfologi är IF-testet negativt.

ii) För varje prov med ljusa fluorescerande celler med karakteristisk morfologi, bestäm medeltalet celler per mikroskopfält och beräkna antal celler (N) per ml återsuspenderad pellet (tillägg 4).

En population på ca 10^3 celler per ml återsuspenderat pellet anses vara detektionsgränsen för IF-testet:

— för prov med $N > 10^3$ celler per ml är IF-testet positivt.

— för prov med $N < 10^3$ celler per ml kan IF-testet anses vara positivt.

iii) Om ett högt antal (> 10^5 celler per ml) ofullständigt eller svagt fluorescerande celler förekommer vid antiserumets titer, skall ett andra test utföras:

— antingen ett test baserat på en annan biologisk princip

eller

— ett nytt IF-test med antingen ett andra antiserum eller en tiospädning av pelleten.

3. **ELISA-test**

Baserat på Robinson-Smith *et al.*, 1995.

Använd antiserum för *Pseudomonas solanacearum*, helst mot ras 3/biovar 2-stam. Bestäm titern i en suspension av 10^6 celler per ml från den homologa stammen av *Pseudomonas solanacearum*.

Användning av *NUNC Polysorp*-mikrotiterplattor rekommenderas.

Lägg till en negativ potatisextraktkontroll och en fosfatbuffrad salt-(PBS-)kontroll.

Använd en suspension av > 10^6 celler per ml från en lämplig ras/biovar av *Pseudomonas solanacearum* som positiv kontroll. Testa exakt som provet/proven men väl avskilt från dessa på mikrotiterplattan.

3.1 Pipettera 100–200 µl av den återsuspenderade pelleten i ett mikrorör.

Upphetta 4 minuter vid 100°C. Ställ mikroröret på kylning.

3.2 Tillsätt en motsvarande volym coatingbuffert av dubbel styrka (tillägg 5). Skaka.

3.3 Tillsätt 100 µl prov till minst 2 brunnar på mikrotiterplatten. Inkubera i en timme vid 37°C eller över natt vid 4°C.

3.4 Häll ut extrakten från brunnarna. Tvätta brunnarna tre gånger med PBS-Tween (tillägg 5), varvid den sista tvättlösningen får vara kvar i brunnarna minst 5 minuter.

3.5 Bered den tillämpliga utspädningen av *Pseudomonas solanacearum*-antiserum i blockeringsbuffert (tillägg 5). Tillsätt 100 µl utspätt antiserum till varje brunn. Inkubera 1 timme vid 37°C.

3.6 Häll ut extrakten från brunnarna. Tvätta brunnarna som ovan (3.4).

3.7 Bered den tillämpliga utspädningen av alkaliskt fosfataskonjugat i blockeringsbuffert. Tillsätt 100 µl utspätt konjugat till brunnarna. Inkubera 1 timme vid 37°C.

3.8 Häll ut extrakten från brunnarna. Tvätta brunnarna som ovan (3.4 och 3.6).

3.9 Bered den alkaliska fosfatassubstratlösningen (tillägg 5). Tillsätt 100 µl till brunnarna. Inkubera i 30 minuter till 1 timme i mörker vid laboratorietemperatur.

3.10 Läs av absorptionen vid 409 nm.

Tolkning av ELISA-testet

ELISA-testet är negativt om provets optiska densitet (O.D.) är < 2× den negativa kontrollens O.D.

ELISA-testet är positivt om provets optiska densitet (O.D.) är > 2× den negativa kontrollens O.D.

4. **PCR-test**

Baseras på Seal *et al.*, 1993.

Obs! Pipettspetsar med filterpropp måste användas på alla stadier av provpreparering och annan behandlung där PCR ingår.

Bered en suspension av 10^6 celler per ml från en ras 3/biovar 2-stam av *Pseudomonas solanacearum* som positiv kontroll. Testa exakt som provet/proven.

4.1 Pipettera 100 µl av den återsuspenderade pelleten i ett mikrorör.

Alternativt, för över 90 µl av den återsuspenderade pelleten i ett mikrorör med 10 µl 0,5 M NaOH. Blanda genom att vända upp och ner på mikroröret upprepade gånger.

4.2 Upphetta 4 minuter vid 100°C. Ställ mikroröret på kylning omedelbart.

4.3 Bered minst två decimala utspädningar, t.ex. 1/10 och 1/100 eller fler, i sterilt destillerat eller ultrarent vatten (UPW).

4.4. Bered PCR-reaktionsblandningen (tillägg 6) i ett sterilt rör genom tillsats av följande komponenter i nämnd ordning:

För 50 µl reaktionsvolym

Komponent	Kvantitet	Slutkoncentration
Sterilt destillerat eller UPW	30,8 µl–33,8 µl	
10×PCR-buffert	5,0 µl	1×
d-ATP	1,0 µl	0,2 mM
d-CTP	1,0 µl	0,2 mM
d-GTP	1,0 µl	0,2 mM
d-TTP	1,0 µl	0,2 mM
Primer OLI-1 (20 µM)	2,5 µl	1 µM
Primer Y-2 (20 µM)	2,5 µl	1 µM
Taq-polymeras (5U/µl)	0,2 µl	1,0 U
Totalvolym	45 µl–48 µl	

För flera reaktioner

Beräkna kvantiteten av varje komponent för erforderligt antal reaktioner. Blanda komponenterna och överför 45 µl–48 µl av blandningen till sterila PCR-rör. Förvara rören med PCR-reaktionsblandningen kylda.

För 25 µl reaktionsvolym:

Minska komponenterna i motsvarande grad.

4.5 PCR-amplifiering

4.5.1 Alternativ! Pulscentrifugera rören med det kokta provet och en positiv kontroll.

Tillsätt i nämnd ordning 2–5 µl av provet/proven, vattenkontroll och positiv kontroll till rören med PCR-reaktionsblandningen. Placera rören i värmeblocket i en DNA-thermocykelapparat.

4.5.2 Kör följande program:

1 cykel under:
i) 2 minuter vid 96 °C: denaturering av förlaga/mall

50 cykler under:
ii) 20 sekunder vid 94 °C: denaturering
iii) 20 sekunder vid 68 °C: påkoppling av primers
iv) 30 sekunder vid 72 °C: förlängning av kopia

1 cykel under:
v) 10 minuter vid 72 °C: fullföljd kopiering

1 cykel:
vi) stillastående vid 4 °C

Obs! Dessa parametrar gäller för en Perkin Elmer 9600. Andra termocykelapparater kan kräva mineraloljetäckning i PCR-reaktionsrören och/eller modifikation av varaktigheten av steg ii, iii och iv i amplifieringsprofilen.

4.5.3 Avlägsna rören från apparaten. Analysera PCR-produkten. Om detta inte görs omedelbart, förvara rören vid 4 °C om de skall användas samma dag, vid –18 °C för längre tids förvaring.

4.6 Analys av PCR-produkten

PCR-fragmenten upptäcks genom agarosgelelektrofores och färgning med ethidiumbromid.

4.6.1 Bered en lämplig agarosgel genom att försiktigt hetta upp agaros i tris-acetat-elektrofores-(TAE)-buffert till kokning.

4.6.2 Kyl den smälta agarosen till 50–60 °C, häll den i elektroforesenhetens form och sätt in kammen. Låt gelen stelna.

4.6.3 Avlägsna kammen. Sänk ner gelen i TAE så att det precis täcks (2–3 mm) av bufferten.

4.6.4 Placera 3 µl droppar av buffert på parafilm. Sätt till 12 µl av PCR-produkten, antingen från proven, den positiva kontrollen eller vattenkontrollen, och blanda genom försiktig uppsugning i pipettspetsen före fyllning. De nämnda volymerna kan anpassas så att de överensstämmer med volymen på brunnarna i agarosgelen.

4.6.5 Fyll försiktigt brunnarna i gelen. Ta med som referens en lämplig DNA-markör i minst en brunn.

4.6.6 Anslut trådarna på kraftkällan och elektroforesutrustningen. Kör gelen vid 5–8 V/cm tills spårindikatorns främre ände är inom 1 cm från änden av gelen.

4.6.7 Stäng av strömmen. Ta bort trådarna från elektroforesenheten. Ta försiktigt bort gelen. Sänk ner i ethidiumbromidlösning i 30–45 minuter.

Obs! Använd alltid engångshandskar vid arbete med ethidiumbromid som är en kraftig mutagen!

4.6.8 Avfärga i destillerat vatten i 10–15 minuter.

4.6.9 Betrakta de amplifierade DNA-fragmenten med UV-genomlysning. PCR-produkten av *Pseudomonas solanacearum* med primerserien OLI-1 och Y-2 är 288 bp lång. Kontrollera mot DNA-markören och mot den positiva kontrollen.

Obs! Vattenkontrollen måste under alla förhållanden vara negativ. Är den positiv måste testet upprepas.

4.6.10 Fotografera gelen om varaktig dokumentation krävs.

4.6.11 Verifiera det amplifierade fragmentets äkthet med restiktionsenzymanalys (REA).

4.7 Restriktionsenzymanalys (REA)

4.7.1 Överför 8,5 µl av PCR-produkten (4.5.3) till ett nytt mikrorör. Sätt till 1 µl 10× enzymbuffert och 0,5 µl restriktionsenzym *Ava* II.

4.7.2 Blanda genom försiktig uppsugning i pipettspetsen. Om droppar stannar kvar på rörets väggar, pulscentrifugera i mikrocentrifug. Inkubera en timme vid 37 °C.

4.7.3 Analysera de uppdelade PCR-fragmenten med agarosgelelektrofores enligt ovan (4.6).

Tolkning av PCR-resultaten

PCR-testet är negativt om det karakteristiska 288 bp-fragmentet inte upptäcks och fragmentet upptäcks i det positiva kontrollisolatet av *Pseudomonas solanacearum*.

PCR-testet är positivt om 288 bp-fragmentet upptäcks och REA-analys av det förstärkta fragmentet är identisk med det positiva kontrollisolatet av *Pseudomonas solanacearum*.

5. Odling på selektivt medium

Baseras på Elphinstone *et al.*, 1996.

5.1 Utför testet genom en lämplig utspädningsplatt-teknik, t.ex:

i) Bered minst två decimala utspädningar, d.v.s. 1/10 och 1/100 eller fler om så önskas, av den återsuspenderade pelleten i pelletbuffert. Pipettera en uppmätt standardvolym (50–100 µl) av den återsuspenderade pelleten och varje utspädning till ett modifierat SMSA selektivt medium (tillägg 7) och sprid med en glasstav över hela mediets yta.

Om det anses lämpligt utförs även ett utspädningsutstryk av en 10 µl ögla med den återsuspenderade pelleten. Flambera öglan mellan utstryken.

ii) För över en uppmätt standardvolym (50–100 µl) av den återsuspenderade pelleten till ett modifierat SMSA selektivt medium och sprid med en glasstav över hela mediets yta. Gör utstryk med staven utan flambering på ytterligare två modifierade SMSA-plattor.

5.2 Tillsätt med samma utspädningnsplatt-teknik en suspension av 10^6 celler per ml från en ras 3/biovar 2-stam av *Pseudomonas solanacearum* som positiv kontroll på en serie separata modifierade SMSA-plattor.

5.3 Inkubera plattorna vid 28 °C. Börja läsa av plattorna efter 3 dagar. Om de är negativa, inkubera vidare upp till 6 dagar. Virulenta isolat av *Pseudomonas solanacearum* utvecklar mjölkvita, platta, oregelbundna, flödiga kolonier med tydliga röda till purpurfärgade centra som visar inre strimmor eller virvlar.

5.4 Renodla kolonier med karakteristisk morfologie genom subkultur på ett vanligt näringsmedium (tillägg 1).

5.5 Identifiera rena kulturer (sektion II.4.1) och verifiera *Pseudomonas solanacearum* med ett isolat med patogenitetstest (sektion II.4.3).

Tolkning av resultatet på selektivt medium

Testet på selektivt medium är negativt om inga kolonier isoleras inom sex dagar eller om inga karakteristiska kolonier av *Pseudomonas solanacearum* isoleras, förutsatt att ingen inhibition från kolonier av andra bakterier misstänks och att *Pseudomonas solanacearum* karakteristiska isolat återfinns på de positiva kontrollerna.

Test på selektivt medium är positivt om karakteristiska kolonier av *Pseudomonas solanacearum* isoleras.

6. **Biotest**

Baseras på Janse, 1988.

6.1 Använd 10 testplantor (mottagliga tomat- eller äggplantor) på trebladsstadiet för varje prov. Vattna inte testplantorna inom 24 timmar före inokuleringen.

6.2 Fördela 100 µl återsuspenderad pellet mellan testplantorna. Inokulera i stjälken mellan hjärtbladen och på ett eller flera andra ställen.

6.3 Inokulera med samma teknik 10 småplantor med en suspension av 10^6 celler per ml av en virulent ras 3/biovar 2-stam av *Pseudomonas solanacearum* som positiv kontroll och med pelletbuffert som negativ kontroll. Separera de positiva kontrollplantorna från de andra plantorna för att undvika korskontaminering.

6.4 Odla plantorna vidare upp till 4 veckor, vid 22 °C–28 °C, med hög relativ fuktighet och med daglig vattning. Notera utveckling av vissningssymtom, epinasti, kloros och/eller försvagad tillväxt.

6.5 Isolera från infekterade plantor (sektion II). Identifiera rena kulturer med karakteristisk morfologi (sektion II.4.1) och verifiera *Pseudomonas solanacearum*-kulturer med ett patogenitetstest (sektion II.4.3)

6.6 Om det anses lämpligt, kontrollera frånvaro av infektion i serier av testplantor som inte visar tecken på infektion. Avlägsna från varje testplanta en 1 cm sektion av stjälken från 2 cm ovanför inokuleringsstället. Homogenisera vävnaderna i upplösningsbuffert. Gör utspädningsplatt-test (sektion III.5.1). Om det är positivt, identifiera rena kulturer med karakteristisk morfologi (sektion II.4.1) och verifiera *Pseudomonas solanacearum*-kulturer med ett patogenitetstest (sektion II.4.3).

Tolkning av resultatet av biotest

Biotestet är negativt om testplantorna inte är infekterade av *Pseudomonas solanacearum* och under förutsättning att *Pseudomonas solanacearum* detekterats i den positiva kontrollen.

Biotestet är positivt om testplantorna är infekterade av *Pseudomonas solanacearum.*

7. **Anrikningstest**

Baseras på Elphinstone *et al.*, 1996

7.1 För över 100 µl av den suspenderade pelleten i 3 ml modifierat SMSA-substrat (tillägg 7).

7.2 Inkubera 48 timmar och i varje fall inte längre än 72 timmar, vid 28 °C med locket på röret löst påsatt för luftning.

7.3 Sätt fast locket och skaka. Prov för IF-testet (denna sektion 2), ELISA-testet (denna sektion 3) och/eller PCR-testet (denna sektion 4).

8. **Patogenitetstest**

Se sektion II.4.3.

Tillägg 1

Näringsmedier för isolering och odling av *Pseudomonas solanacearum*

Näringsagar (Nutrient Agar, NA)

Nutrient Agar (Difco)	23 g
Destillerat vatten	1 liter

Bered $^1/_2$-litersvolymer av mediet i 1-litersflaskor.

Lös ingredienserna.

Sterilisera genom autoklavering vid 121 °C i 15 minuter.

Kyl till 50 °C. Häll ut på plattorna.

Jäst-pepton-glukosagar (Yeast Peptone Glucose Agar, YPGA)

Jästextrakt (Difco)	5 g
Bacto pepton (Difco)	5 g
D(+)glukos (monohydrat)	10 g
Bacto agar (Difco)	15 g
Destillerat vatten	1 liter

Bered $^1/_2$-litersvolymer av mediet i 1-litersflaskor.

Lös ingredienserna.

Sterilisera genom autoklavering vid 121 °C i 15 minuter.

Kyl till 50 °C. Häll ut på plattorna.

Sucrospeptonagar (Sucrose Peptone Agar, SPA)

Sucros	20 g
Pepton	5 g
K_2HPO_4	0,5 g
$MgSO_4 \cdot 7H_2O$	0,25 g
Bacto agar (Difco)	15 g
Destillerat vatten	1 liter

Bered $^1/_2$-litersvolymer av mediet i 1-litersflaskor.

Lös ingredienserna. Justera till ph 7,2–7,4 om så erfordras.

Sterilisera genom autoklavering vid 121°C i 15 minuter.

Kyll till 50°C. Häll ut på plattor.

Kelmans tetrazoliummedium

Casamino acids (Difco)	1 g
Bacto pepton (Difco)	10 g
Dextros	5 g
Bacto agar (Difco)	15 g
Destillerat vatten	1 liter

Bered $^1/_2$-litersvolymer av mediet i 1-litersflaskor.

Lös ingredienserna.

Sterilisera genom autoklavering vid 121 °C i 15 minuter.

Kyl till 50°C.

Tillsätt en filtersteriliserad vattenlösning av trifenyl-tetrazoliumklorid (Sigma) så att en slutkoncentration av 50 mg per 1 uppnås.

Häll ut på plattorna.

Tillägg 2

Material för provpreparering

Malningsbuffert: 50 mM fosfatbuffert, pH 7,0

Denna buffert används för malning av vävnad.

Na_2HPO_4	4,26 g
KH_2PO_4	2,72 g
Destillerat vatten	1 liter

Lös ingredienserna och kontrollera pH. Dela upp på lämpligt sätt. Sterilisera genom autoklavering vid 121 °C i 15 minuter.

Tillsats av 5 % Polyvinylpyrrolidon – 40 000 MWT(PVP-40) rekommenderas när direkt PCR-test görs för att minska förekomsten av amplifieringshämning genom aromatiska molekyler i extraktet.

Tillsats av en deflockulant, ett antiskummedel eller en anti-oxidant rekommenderas med användande av Waring mixer eller Ultra Turrax homogeniseringsförfarande för malning av potatisvävnadskärnorna.

Lubrolflingor	0,5 g per l
DC silikon-antiskum	1,0 ml per l
Tetra-natriumpyrofosfat	1,0 g per l

Autoklavera separat. Tillsätt till önskad koncentration.

Pelletbuffert: 10 mM fosfatbuffert pH 7,2

Denna buffert används för återsuspension och utspädning av pellettarna av potatisens naveländar.

$Na_2HPO_4 \cdot 12H_2O$	2,7 g
$NaH_2PO_4 \cdot 2H_2O$	0,4 g
Destillerat vatten	1 liter

Lös ingredienserna och kontrollera pH. Dela upp på lämpligt sätt. Sterilisera genom autoklavering vid 121 °C i 15 minuter.

Tillägg 3

Material för IF-test

IF-buffert: 10 mM fosfatbuffrad saltlösning (PBS), pH 7,2

Denna buffert används för utspädning av antiserum.

$Na_2HPO_4 \cdot 12\ H_2O$	2,7 g
$NaH_2PO_4 \cdot 2\ H_2O$	0,4 g
NaCl	8,0 g
Destillerat vatten	1 liter

Lös ingredienserna och kontrollera pH. Dela upp på lämpligt sätt.

Sterilisera genom autoklavering vid 121 °C i 15 minuter.

IF-buffert — Tween

Denna buffert används för att tvätta objektglasen. Tillsätt 0,1 % Tween 20 till IF-bufferten.

0,1 M fosfatbuffrad glycerol, pH 7,6

Denna buffert används som monteringsvätska på fönstren av IF-glasen för att förbättra fluorescensen.

$Na_2HPO_4 \cdot 12\ H_2O$	3,2 g
$NaH_2PO_4 \cdot 2\ H_2O$	0,15 g
Glycerol	50 ml
Destillerat vatten	100 ml

Tillägg 4

Bestämning av kontamineringsnivå i IF-testet

Multispotglasets fönsteryta (S)

$$= \frac{\pi D^2}{4}$$

där D = fönstrets diameter (1)

Objektivfältets yta (ytor)

$$= \frac{\pi d^2}{4}$$

där d = fältets diameter. (2)

Beräkna d antingen genom direkt mätning eller ur följande formel:

$$s = \frac{\pi i^2}{G^2 K^2 \times 4} \quad (3)$$

där i = fältkoefficienten (beror av okulartyp och varierar från 8 till 24),

K = apperturkoefficienten (1 eller 1,25),

G = objektivets förstoring (100×, 40× etc.),

från (2)

$$d = \sqrt{\frac{4s}{\pi}} \quad (4)$$

från (3)

$$d = \sqrt{\frac{4 \times \frac{\pi i^2}{G^2 K^2 \times 4}}{\pi}} = \frac{i}{GK}$$

Räkna antalet typiska fluorescerande celler per fält (c).

Beräkna antalet typiska fluorescerande celler per fönster (C).

$$C = c \frac{S}{s}$$

Beräkna antalet typiska fluorescerande celler per ml pellet (N).

$$N = C \times \frac{1\,000}{y} \times F$$

där y = pelletvolymen på fönstret,

där F = pelletens utspädningsfaktor.

Tillägg 5

Material för ELISA-test

Coatingbuffert av dubbel styrka, pH 9,6

Na_2CO_3	6,36 g
$NaHCO_3$	11,72 g
Destillerat vatten	1 liter

Lös ingredienserna och kontrollera pH. Dela upp på lämpligt sätt.

Sterilisera genom autoklavering vid 121 °C i 15 minuter.

Natriumsulfit med en slutkoncentration av 0,2 % kan tillsättas som antioxidant om extraktet innehåller en hög andel aromatiska molekyler.

10 × fosfatbuffrad saltlösning (PBS), pH 7,4

NaCl	80 g
KH_2PO_4	2 g
$Na_2HPO_4 . 12H_2O$	29 g
KCl	2 g
Destillerat vatten	1 liter

Lös ingredienserna och kontrollera pH. Dela upp på lämpligt sätt.

Sterilisera genom autoklavering vid 121 °C i 15 minuter.

Fosfatbuffrad saltlösning — Tween (PBS-T)

10 × PBS	100 ml
10 % Tween 20	5 ml
Destillerat vatten	895 ml

Blockerings- (antikropps-)buffert (måste vara nyberedd)

10 × PBS	10 ml
Polyvinylpyrrolidon-44 000 MWT (PVP-44)	2 g
10 % Tween 20	0,5 g
Mjölkpulver	0,5 g
Destillerat vatten	till 100 ml

Alkalisk fosfatas-substratlösning pH 9,8

Dietanolamin	97 ml
Destillerat vatten	800 ml

Blanda och justera till pH 9,8 med koncentrerad HCl.

Fyll upp till 1 liter med destillerat vatten.

Tillsätt 0,2 g $Mg Cl_2$.

Lös 2 fosfatas-substrat tabletter 5 mg (Sigma) per 15 ml lösning.

Tillägg 6

Material för PCR-test

Oligonukleotidprimersekvens

Primer OLI-1	5'-GGGGGTAGCTTGCTACCTGCC-3'
Primer Y-2	5'-CCCACTGCTGCCTCCCGTAGGAGT-3'

För material: Se Seal *et al* (1993).

Tillägg 7

Material för odling på selektivt medium och anrikningstest

SMSA selektivt medium (Engelbrecht, 1994, modifierat av Elphinstone *et al.*, 1996).

Basismedium	
Casamino acid (Difco)	1 g
Bacto pepton (Difco)	10 g
Glycerol	5 ml
Agar (Difco)	15 g
Destillerat vatten	1 liter

Bered 1/2-litersvolymer av mediet i 1-litersflaskor.

Lös ingredienserna och kontrollera pH. Justera pH, om så erfordras, till 6,5 före autoklavering. *Pseudomonas solanacearum* växer inte bra på mediet vid pH > 7,0.

Sterilisera genom autoklavering vid 121 °C i 15 minuter.

Kyl till 50 °C.

Tillsätt följande ingredienser (alla från Sigma) för att nå angivna slutkoncentrationer:

Kristallviolett	5 mg per l		
Polymixin B sulfat	100 mg per l	(c:a 600 000 enheter)	Sigma P-1004
Bacitracin(*)	25 mg per l	(c:a 1 250 enheter)	Sigma P-0125
Kloramphenicol	5 mg per l		Sigma C-3175
Penicillin-G	0,5 mg per l	(c:a 825 enheter)	Sigma P-3032
Tetrazoliumsalter	50 mg per l		

Lös ingredienserna i 70 % etanol till de koncentrationer som anges för de volymer av medium som bereds. Vissa ingredienser, nämligen polymixin B och kloramphenicol, kräver lätt värmning och skakning.

SMSA-substrat (Elphinstone *et al.*, 1996)

Bered som SMSA selektivt medium men uteslut agarn.

Fördela i 3 ml-portioner i 30 ml engångs Universalrör.

(*) Om det anses nödvändigt kan en ökning av bacitracin-koncentrationen till 300 ppm minska mängden kontaminerande saprofytiska bakterier utan att återvinningen av *Pseudomonas solanacearum* minskar.

Referenser

Buddenhagen, I.W.; Sequeira, L. and Kelman, A. 1962. Description of races in *Pseudomonas solanacearum*. *Phytopathology* 52, 726.

Cook, D.; Elizabeth B. and Sequeira L., 1989. Genetic diversity of *Pseudomonas solanacearum*: detection of restriction fragment length polymorphism with DNA probes that specify virulence and hypersensitive respons. Molecular Plant-Microbe Interactions 2, 113–121.

Dinesen I.G. and DeBoer, S.H., 1995. Extraction of *Clavibacter michiganensis* subsp. *sepedonicus* from composite samples of potato tubers. *American Potato Journal* 72, 133–142.

Elphinstone, J.G.; Hennessy, J.; Wilson, J. and Stead, D.E. 1996. Sensitivity of different methods for the detection of *Pseudomonas solanacearum* (Smith)Smith in potato tuber extracts. *EPPO Bulletin* 26.

Engelbrecht, M.C. 1994. Modification of a semi-selective medium for the isolation and quantification of *Pseudomonas solanacearum*. *ACIAR Bacterial Wilt Newsletter* 10, 3–5.

Hayward, A.C. 1964. Characteristics of *Pseudomonas solanacearum*. *Journal of Applied Bacteriology* 27, 265–277.

Hayward, A.C. 1994. Systematic and phylogeny of *Pseudomonas solanacearum* and related bacteria. In: *Bacterial Wilt: the disease and its causative agent, Pseudomonas solanacearum* (eds. A.C. Hayward and G.L. Hartman) CAB International Oxford, 127–135.

Janse, J.D. 1988. A detection method for *Pseudomonas solanacearum* in symptomless potato tubers and some data on its sensitivity and specificity. *EPPO Bulletin* 18, 343–351.

Janse, J.D. 1991. Infra- and intraspecific classification of *Pseudomonas solanacearum* strains using whole cell fatty acid analysis. *Systematic and Applied Microbiology* 14, 335–345.

Kelman, A. 1954. The relationship of pathogenicity in *Pseudomonas solanacearum* to colony appearance on a tetrazolium medium. *Phytopathology* 64, 293–695.

Lelliot, R.A. and Stead, D.E., 1987. Methods for the diagnosis of bacterial diseases of plants. (T.F. Preece ed.) *Blackwell Scientific Publications*, Oxford. 216 pp.

Louws, F.J.; Fulbright, D.W.; Stephens, C.T. and De Bruijn, F.J. 1995. Differentiation of genomic structure by rep-PCR fingerprinting to rapidly classify *Xanthomonas campestris* pv. *vesicatoria*. *Phytopathology* 85, 528–536.

Lozano, J.C. and Sequeira, L. 1970. Differentiation of races of *Pseudomonas solanacearum* by a leaf infiltration technique. *Phytopathology* 60, 838.

Mirza, M.S.; Rademaker, J.W.L.; Janse, J.D. and Akkermans, A.D.L. 1993, Specific 16S ribosomal RNA targeted oligonucleotide probe against *Clavibacter michiganensis* subsp. *sepedonicus*. *Canadian Journal of Microbiology* 39, 1029–1034.

Robinson-Smith, A.; Jones, P.; Elphinstone, J.G. and Forde, S.M.D. 1995. Production of antibodies to *Pseudomonas solanacearum*, the causative agent of bacterial wilt. *Food and Agricultural Immunology* 7, 67–79.

Seal, S.E.; Jackson, L.A.; Young, J.P.W. and Daniels, M.J. 1993. Differentiation of *Pseudomonas solanacearum, P. syzygii, P. picketti* and the blood disease bacterium by partial 16S rRNA sequencing: construction of oligonucleotide primers for sensitive detection by polymerase chain reaction. *Journal of General Microbiology* 139, 1587–1594.

Smith, J.J.; Offord, L.C.; Holderness, M. and Saddler, G.S., 1995. Genetic diversity of *Burkholderia solanacearum* (synonym *Pseudomonas solanacearum*) race 3 in Kenya. Applied and Environmental Microbiology 61, 4262–4268.

Stead, D.E. 1992a. Techniques for detecting and identifying plant pathogenic bacteria. In: *Techniques for rapid detection of plant pathogens* (eds. J.M. Duncan and L. Torrance). Blackwell Scientific Publications, Oxford, 76–111.

Stead, D.E. 1992b. Grouping of plant pathogenic and some other *Pseudomonas* spp. using cellular fatty acid profiles. *International Journal of Systematic Bacteriology* 42, 281–295.

Van Beuningen, A.; Derks, H. and Janse J.D. 1995. Detection and identification of *Clavibacter michiganensis* subsp. *sepedonicus* with special attention to fluorescent *in-situ* hybridisation (FISH) using a 16S rRNA targeted oligonucleotide probe. *Züchtungsforschung* 2, 266–269.