II

(Nicht veröffentlichungsbedürftige Rechtsakte)

KOMMISSION

ENTSCHEIDUNG DER KOMMISSION

vom 9. September 1997

über ein vorläufiges Versuchsprogramm für Diagnose, Nachweis und Identifizierung von Pseudomonas solanacearum (Smith) Smith in Kartoffeln

(97/647/EG)

DIE KOMMISSION DER EUROPÄISCHEN GEMEINSCHAFTEN —

gestützt auf den Vertrag zur Gründung der Europäischen Gemeinschaft,

gestützt auf die Richtlinie 77/93/EWG des Rates vom 21. Dezember 1976 über Maßnahmen zum Schutz der Gemeinschaft gegen die Einschleppung und Ausbreitung von Schadorganismen der Pflanzen und Pflanzenerzeugnisse([1]), zuletzt geändert durch die Richtlinie 97/14/EG([2]), insbesondere auf Artikel 15 Absatz 3,

in Erwägung nachstehender Gründe:

Gemäß der Entscheidung 95/506/EG der Kommission vom 24. November 1995 zur Ermächtigung bestimmter Mitgliedstaaten, vorübergehend zusätzliche Maßnahmen gegen die Verbreitung von Pseudomonas solanacearum (Smith) Smith gegenüber dem Königreich der Niederlande zu treffen([3]), geändert durch die Entscheidung 96/599/EG([4]), insbesondere gemäß Artikel 1 Absatz 2 Buchstabe a) Buchstabe bb), müssen die Mitgliedstaaten bei der Durchführung amtlicher oder amtlich überwachter Tests an Kartoffeln das von der Pflanzenschutz-Organisation für Europa und den Mittelmeerraum (EPPO)([5]) festgelegte Quarantäneverfahren Nr. 26 für Pseudomonas solanacearum (Smith) Smith oder ein anderes nach dem Verfahren des Artikels 16a der Richtlinie 77/93/EWG genehmigtes Verfahren anwenden.

Der Ad-hoc-Ausschuß der Sachverständigen für bakterielle Pflanzenkrankheiten, den die zuständigen Stellen der Europäischen Kommission unter der Schirmherrschaft des Ständigen Ausschusses für Pflanzenschutz eingesetzt haben, hat ein vorläufiges Versuchsprogramm ausgearbeitet, das den seit der Veröffentlichung des EPPO-Quarantäneverfahrens verbesserten Nachweis- und Versuchsverfahren Rechnung trägt. Dieses Versuchsprogramm ist insofern vorläufig, als insbesondere zur Sensitivität und Spezifität einzelner Tests weitere Forschungsarbeiten zu erwarten sind, um für die Aufnahme in eine aktualisierte Testmethode die optimalen verfügbaren Tests auswählen und standardisieren zu können.

Das in dieser Entscheidung vorgesehene vorläufige Versuchsprogramm entspricht der Stellungnahme des Ständigen Ausschusses für Pflanzenschutz —

([1]) ABl. L 26 vom 31. 1. 1977, S. 20.
([2]) ABl. L 87 vom 2. 4. 1997, S. 17.
([3]) ABl. L 291 vom 6. 12. 1995, S. 48.
([4]) ABl. L 265 vom 18. 10. 1996, S. 18.

([5]) EPPO/OEPP-Bulletin 20, S. 255—262 (1990).

HAT FOLGENDE ENTSCHEIDUNG ERLASSEN:

Artikel 1

Das von der Pflanzenschutz-Organisation für Europa und den Mittelmeerraum (EPPO) festgelegte Quarantäneverfahren Nr. 26 für Pseudomonas solanacearum (Smith) Smith wird zur Umsetzung von Artikel 1 Absatz 2 Buchstabe a) Buchstabe bb) der Entscheidung 95/506/EG, letztgültige Fassung, durch das im Anhang dieser Entscheidung beschriebene vorläufige Versuchsprogramm für Diagnose, Nachweis und Identifizierung von Pseudomonas solanacearum (Smith) Smith ersetzt.

Artikel 2

Diese Entscheidung ist an die Mitgliedstaaten gerichtet.

Brüssel, den 9. September 1997

Für die Kommission
Franz FISCHLER
Mitglied der Kommission

ANHANG

VORLÄUFIGES TESTVERFAHREN ZUR DIAGNOSE, ZUM NACHWEIS UND ZUR IDENTIFIZIERUNG VON PSEUDOMONAS SOLANACEARUM (SMITH) SMITH

ZWECK DES VERFAHRENS

In der vorliegenden Beschreibung werden verschiedene Vorgangsweisen erläutert für

i) die Diagnose der Schleimkrankheit an Kartoffelpflanzen und -knollen;

ii) den Nachweis von Pseudomonas solanacearum an Proben von Kartoffelknollen;

iii) die Identifizierung von Pseudomonas solanacearum.

In den Anlagen werden die Aufbereitung des Versuchsmaterials, d. h. Nährmedien, Puffer, Lösungen, Reagenzien und Testpflanzen, sowie die Identifizierung und Charakterisierung von Pseudomonas solanacearum ausführlich erläutert.

INHALT

Abschnitt I. **Anwendung des Verfahrens** 4

1. Diagnose der Schleimkrankheit an Kartoffelpflanzen und -knollen 4
2. Nachweis und Identifizierung von Pseudomonas solanacearum in Proben von Kartoffelknollen 6

Abschnitt II. **Diagnose der Schleimkrankheit bei Kartoffelpflanzen und -knollen** 8

1. Symptome der Schleimkrankheit 8
2. Schnell-Screeningtests 8
3. Isolierungsverfahren 9
4. Bestätigungstest(s) 9

Abschnitt III. **Nachweis und Identifizierung von Pseudomonas solanacearum in Proben von Kartoffelknollen** 12

1. Vorbereitung der Probe für den Test 12
2. Immunfluoreszenztest (IF-Test) 13
3. Enzyme Linked Immuno-Sorbent Assay (ELISA)-Test 15
4. Polymerase-Ketten-Reaktion (PCR™)-Test 15
5. Selektivausstrichtest 17
6. Bioassay-Test 18
7. Anreicherungstests 18
8. Pathogenitätstest 18

Anlage 1. Nährmedien für die Isolierung und Kultur von Pseudomonas solanacearum 19

Anlage 2. Material für die Vorbereitung der Probe 20

Anlage 3. Material für den IF-Test 21

Anlage 4. Bestimmung des Kontaminationsgrades im IF-Test 22

Anlage 5. Material für den ELISA-Test 23

Anlage 6. Material für den PCR-Test 24

Anlage 7. Material für den Selektivausstrichtest 24

Bibliographie 25

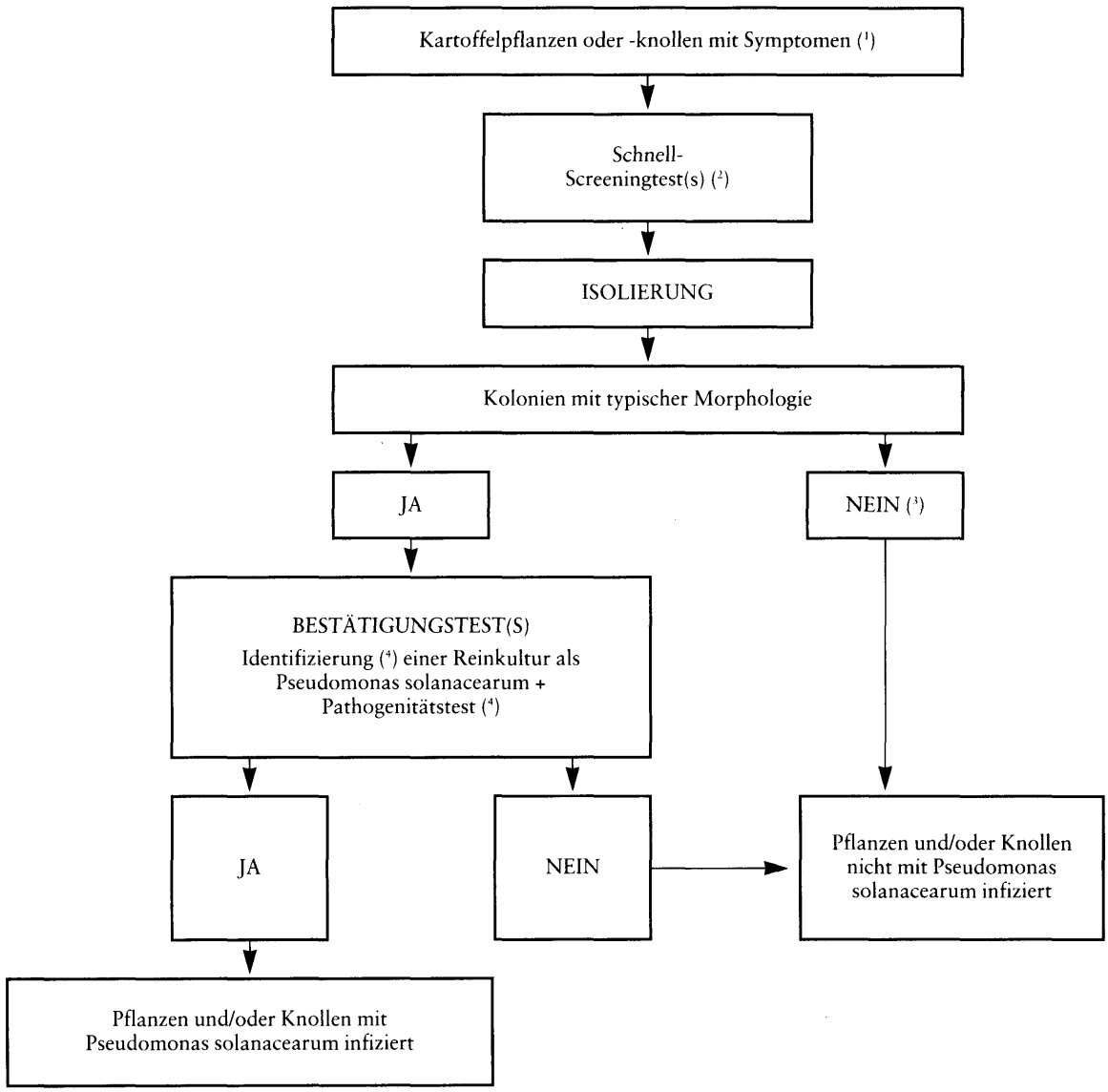
ABSCHNITT I

ANWENDUNG DES TESTVERFAHRENS

1. **Diagnose der Schleimkrankheit an Kartoffelpflanzen und -knollen**

Das Verfahren ist für Pflanzen und Knollen, die typische Symptome von Schleimkrankheit aufweisen oder bei denen aufgrund der Symptomatik der Verdacht einer Infektion mit Schleimkrankheit besteht, geeignet. Es umfaßt Schnell-Screeningtest(s), die Isolierung des Erregers aus infiziertem vaskulärem Gewebe auf Diagnosemedien und, bei positivem Befund, die Identifizierung der Kultur als Pseudomonas solanacearum.

Fließdiagramm



Anmerkungen zum Fließdiagramm

(1) Beschreibung der Symptome in Abschnitt II.1.

(2) Schnell-Screeningtest(s) erleichtern die vorläufige Diagnose.

Geeignete Tests sind:
Gefäßbündeltest (Abschnitt II.2),
Prüfung auf Poly-ß-hydroxybutyratgranula (Abschnitt II.2),
IF-Test (Abschnitt III.2),
ELISA-Test (Abschnitt III.3),
PCR-Test (Abschnitt III.4).

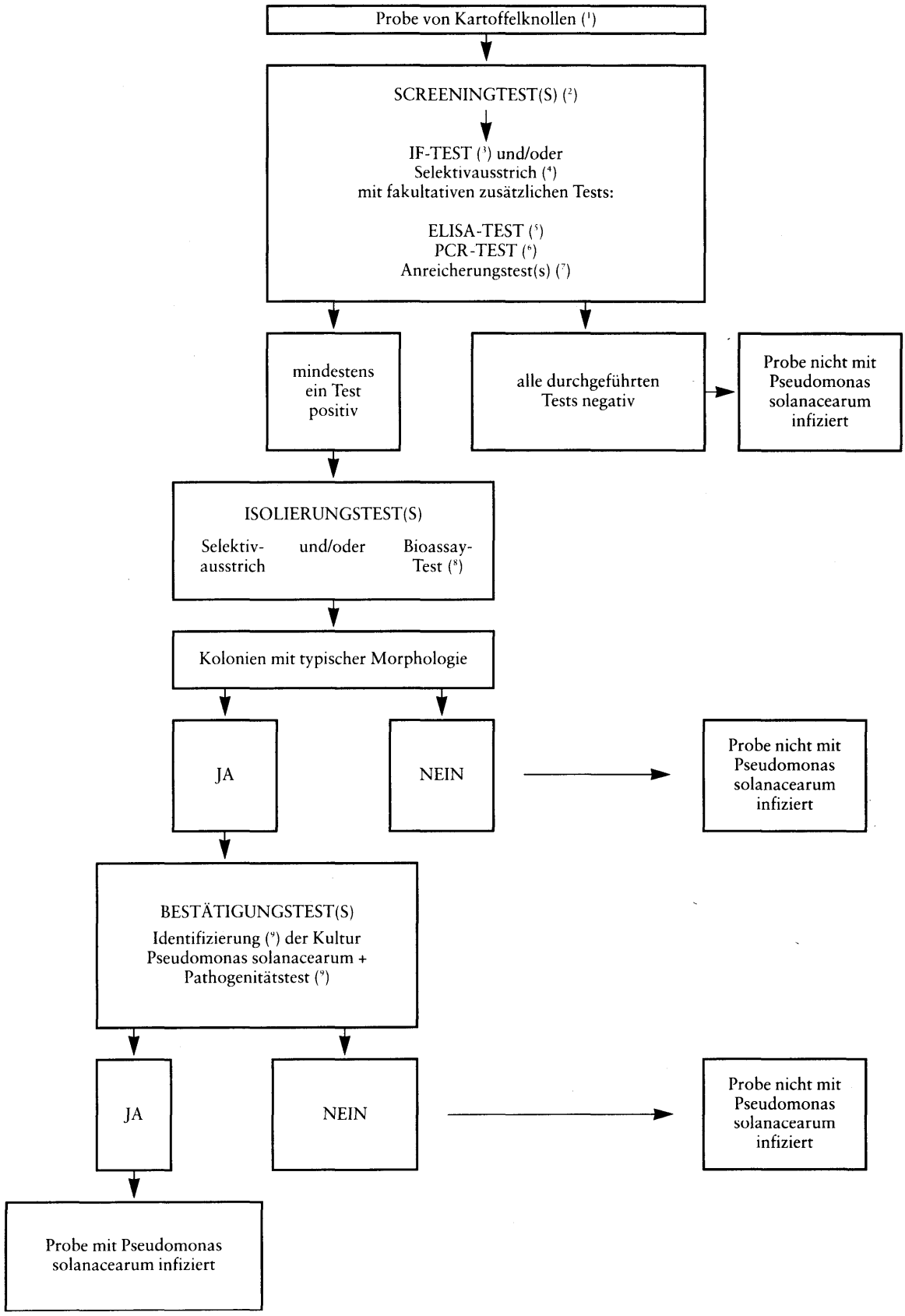
(3) Obwohl die Isolierung des Erregers aus Pflanzenmaterial mit typischen Symptomen durch das Verdünnungsausstrichverfahren relativ einfach ist, kann das Anlegen von Kulturen in fortgeschrittenen Infektionsstadien scheitern. Saprophytische Bakterien, die auf erkranktem Gewebe wachsen, können den Erreger auf dem Isoliermedium überwachsen oder hemmen. Wenn der Isolierungstest negativ ausfällt, aber typische Krankheitssymptome vorliegen, ist die Isolierung zu wiederholen, vorzugsweise mit einem Selektivausstrichtest.

(4) Eine Reinkultur von Pseudomonas solanacearum wird durch mindestens einen der in Abschnitt II.4.1 genannten Tests in Kombination mit einem Pathogenitätstest (Abschnitt II.4.3) zuverlässig identifiziert. Die Bestimmung von Biovar und Rasse ist fakultativ, wird aber für jeden neuen Fall empfohlen.

2. **Nachweis und Identifizierung von Pseudomonas solanacearum in Proben von Kartoffelknollen**

Das Verfahren ist zum Nachweis latenter Infektionen in Kartoffelknollen durch einen oder vorzugsweise mehrere Screeningtests geeignet, die bei positivem Befund durch die Isolierung des Erregers bestätigt werden. Im Fall der Isolierung typischer Kolonien erfolgt die Identifizierung einer Reinkultur als Pseudomonas solanacearum.

Fließdiagramm



Anmerkungen zum Fließdiagramm

(1) Probengröße

Die Standardprobengröße besteht aus 200 Knollen.

Das Verfahren ist aber auch für Proben mit weniger als 200 Knollen geeignet.

(2) Screeningtest(s)

Ein einziger Test ist möglicherweise nicht sensitiv oder zuverlässig genug, um Pseudomonas solanacearum in einer Probe nachzuweisen. Daher wird empfohlen, mehrere Tests durchzuführen, die möglichst auf unterschiedlichen biologischen Prinzipien beruhen.

(3) Immunfluoreszenztest

Der IF-Test (indirekte Methode) ist ein bewährter Screeningtest. Das ist ein Vorteil gegenüber anderen Tests, die noch nicht vollständig ausgereift oder validiert sind. Der Test wird für viele andere Quarantäne-Bakterien, z. B. Clavibacter michiganensis subsp. sepedonicus, angewendet. Bei den für diese Methode angegebenen Parametern handelt es sich um einen sensitiven Test (Nachweisgrenze von 10^3—10^4 Zellen je ml Kartoffelextraktpellet).

Ausschlaggebend für die Zuverlässigkeit des Testergebnisses ist die Qualität des Antiserums. Nur ein Antiserum mit einem hohen Titer (mindestens 2 000 für das Rohserum) ist akzeptabel, und alle Tests müssen bei dem Antiserumtiter oder einer Verdünnung unterhalb des Titers durchgeführt werden. Die indirekte Methode wird bevorzugt. Die direkte Methode kann angewandt werden, wenn Sensitivität und Spezifität des Tests denen der indirekten Methode gleichwertig sind.

Der IF-Test bietet den Vorteil der subjektiven Auswertung der Zellmorphologie und der Fluoreszenzintensität, die Aufschluß über die Reaktionsspezifität geben. Kreuzreaktionen mit serologisch verwandten, aus dem Boden stammenden oder der Knolle anhaftenden Bakterien mit gleicher Zellmorphologie von Pseudomonas solanacearum sind häufig. Der IF-Test kann als einziger Screeningtest durchgeführt werden, doch wenn Kreuzreaktionen vermutet werden, sollte ein zweiter Test, der auf einem anderen biologischen Prinzip beruht, durchgeführt werden. In einem solchen Fall ist der Selektivausstrich am geeignetsten.

(4) Selektivausstrich

Mit dem bei diesem Verfahren verwendeten modifizierten SMSA-Medium und der Versuchsmethodik handelt es sich um einen sensitiven und selektiven Test für Pseudomonas solanacearum. Das Ergebnis liegt 3—6 Tage nach der Zubereitung der Probe vor. Der Erreger liegt direkt in einer Kultur vor und läßt sich leicht identifizieren. Wenn das Potential des Tests voll ausgeschöpft werden soll, müssen die Nabelenden sorgfältig vorbereitet werden, um Sekundärbakterien aus den Knollen auszuschalten, die auf dem Medium mit Pseudomonas solanacearum konkurrieren und die Entwicklung des Erregers beeinflussen könnten. Es ist möglich, daß einige Stämme schlecht wachsen, da die Bestandteile des Mediums auch einen Einfluß auf die Zielorganismen haben können. Sorgfalt ist auch gefordert bei der Unterscheidung von Pseudomonas solanacearum von anderen Bakterien, die sich auf dem Medium entwickeln könnten. Der Selektivausstrich kann als einziger Screeningtest durchgeführt werden, doch bei einem negativen Testergebnis, das wegen einer Hemmung von Pseudomonas solanacearum durch andere Bakterien in dem Medium vermutet wird, ist ein zweiter Screeningtest durchzuführen. Am besten geeignet ist in solchen Fällen der IF-Test.

(5) ELISA-Test

Der ELISA-Test ist generell weniger sensitiv als der IF-Test (Nachweisgrenze von 10^4—10^5 Zellen je ml Kartoffelextraktpellet). Er ist preiswert und schnell, führt im allgemeinen aber eher zu falsch positiven Ergebnissen (Kreuzreaktionen) und zu falsch negativen Ergebnissen (Hemmung durch Phenolmoleküle im Kartoffelextrakt). Die Anforderungen an die Antiserumspezifität sind außerordentlich hoch. Der ELISA-Test kann nicht als einziger Screeningtest durchgeführt werden.

(6) PCR-Test

Der PCR-Test ist potentiell eine sehr sensitives Nachweisverfahren, obwohl der Test leicht dürch Pflanzen- oder Knollenextraktbestandteile behindert werden kann, die zu falsch negativen Ergebnissen führen. Einige Kartoffelsorten enthalten mehr Inhibitoren als andere. Daher müssen diese Inhibitoren beseitigt werden. Eine Möglichkeit ist die Verdünnung, doch dabei werden die Populationen von Pseudomonas solanacearum ebenfalls verdünnt. In allen Phasen der Proben- und Testvorbereitung muß sehr sorgfältig gearbeitet werden, um eine Kontamination, die zu falsch positiven Ergebnissen führen würde, zu vermeiden. Falsch positive Ergebnisse können auch durch homologe Sequenzen anderer Organismen auftreten. Daher kann der direkte PCR-Test nicht als einziger Screeningtest verwendet werden.

(7) Anreicherungstest

Die Bebrütung von Kartoffelextraktpelletproben in einer semiselektiven Bouillon, wie z. B. modifizierte SMSA-Bouillon, ermöglicht die Vermehrung von Pseudomonas solanacearum. Noch wichtiger ist vielleicht, daß auf diese Weise auch potentielle Inhibitoren der ELISA- oder PCR-Tests verdünnt werden. Pseudomonas solanacearum in Anreicherungsbouillon kann also durch IF, ELISA oder PCR nachgewiesen werden. Direktausstriche von den angereicherten Bouillons werden nicht empfohlen. Diese Anreicherungsmethoden wurden nicht gründlich genug erprobt und getestet. Sie wurden hier nur wegen ihres hohen Potentials aufgenommen. Da aber noch relativ wenig Erfahrungen mit ihnen vorliegen, können sie nicht als einzige Nachweismethoden verwendet werden.

(8) Bioassay-Test

Dieser Test wird für die selektive Anreicherung von Pseudomonas solanacearum in Kartoffelextraktpellets in Wirtspflanzen verwendet und kann an Tomatenpflanzen oder Eierfrüchten durchgeführt werden. Er erfordert optimale Inkubationsbedingungen gemäß den Angaben dieser Methode. Bakterien, die Pseudomonas solanacearum auf dem SMSA-Medium hemmen, werden diesen Test höchstwahrscheinlich nicht beeinflussen.

(9) Bestätigungstest(s)

Eine Reinkultur von Pseudomonas solanacearum wird zuverlässig identifiziert durch mindestens einen der in Abschnitt II.4.1 genannten Tests in Kombination mit einem Pathogenitätstest (Abschnitt II.4.3). Die Stammcharakterisierung ist fakultativ, wird aber für jeden neuen Fall empfohlen.

ABSCHNITT II

DIAGNOSE DER SCHLEIMKRANKHEIT BEI KARTOFFELPFLANZEN UND -KNOLLEN

1. Symptome der Schleimkrankheit

Die Kartoffelpflanze

In der frühen Phase der Infektion welken die Blätter an der Spitze der Pflanze bei hohen Temperaturen während des Tages und regenerieren nachts. Die Welke wird schnell irreversibel und führt zum Absterben der Pflanze. Das vaskuläre Gewebe in quer durchgeschnittenen Stengeln verwelkter Pflanzen kann braun werden, und aus der Schnittfläche tritt ein milchiges Exsudat aus oder kann leicht herausgedrückt werden. Wird ein durchgeschnittener Stengel senkrecht ins Wasser gehalten, treten aus den Gefäßbündeln Schleimfäden aus.

Die Kartoffelknolle

Die Kartoffelknollen sind am Nabelende quer durchzuschneiden. In der frühen Phase der Infektion zeigt sich eine glasig gelbe bis hellbraune Verfärbung des Gefäßbündelringes, aus dem nach einigen Minuten spontan oder bei Ausübung von leichtem Druck mit dem Daumen auf die Schale in der Nähe der Schnittfläche ein blasses, cremefarbiges Exsudat austritt. Später wird die Verfärbung deutlich braun, und die Nekrose kann sich bis ins parenchymatische Gewebe erstrecken. In fortgeschrittenen Stadien breitet sich die Infektion von den Nabelenden und den Augen aus, was zu rötlich-braunen, leicht eingesunkenen Läsionen auf der Schale führt. Aus ihnen kann Bakterienschleim austreten, an dem Bodenpartikel haften bleiben.

2. Schnell-Screeningtests

Schnell-Screeningstests ermöglichen die vorläufige Diagnose. Verwende einen oder mehrere der nachfolgenden Tests:

Gefäßbündeltest

Ob in welken Kartoffelstengeln Pseudomonas solanacearum vorhanden sind, kann mit folgendem leichten Test festgestellt werden:

Stengel kurz über dem Boden abschneiden, und die Schnittfläche in ein Becherglas mit Wasser halten. Kurz danach treten spontan Bakterienschleimfäden aus den Gefäßbündeln aus. Kein anderes Bakterium, das Gefäßinfektionen bei Kartoffelpflanzen verursacht, weist dieses Phänomen auf.

Nachweis von Poly-ß-hydroxybutyrat-Granula (PHB)

Die PHB-Granula in den Zellen von Pseudomonas solanacearum werden durch Anfärbung mit Nilblau A oder Sudanschwarz B sichtbar gemacht.

Entweder einen Ausstrich des Exsudats oder des suspendierten Gewebes auf einem Objektträger oder einen Ausstrich von einer 48stündigen Kultur auf YPGA oder SPA (Anlage 1) zubereiten. Ausstriche für positive Kontrollen eines Biovar-2-Rasse-3-Stamms und bei Bedarf für eine negative Kontrolle eines heterologen Stammes zubereiten und trocknen lassen. Die Unterseite des Objektträgers mehrmals schnell durch eine Flamme führen, bis der Ausstrich fixiert ist.

Nilblautest

1. Fixierten Ausstrich mit 1%iger wäßriger Lösung von Nilblau A überspülen.
   10 Minuten bei 55 °C inkubieren.
2. Färbelösung ablaufen lassen. Kurz unter fließendem Leitungswasser abwaschen. Überschüssiges Wasser mit Papiertüchern aufnehmen.
3. Ausstrich mit 8%iger wäßriger Essigsäure überspülen.
   1 Minute bei Raumtemperatur inkubieren.
4. Unter schwach fließendem Leitungswasser abwaschen. Mit Papiertüchern trockenlöschen.
5. Mit einem Tropfen Wasser wieder befeuchten. Deckglas auflegen.
6. Gefärbten Ausstrich unter einem Epifluoreszenzmikroskop bei 450 nm unter Ölimmersion und bei einer Vergrößerung von 1 000 betrachten.

   Auf kräftig orangefarbene Fluoreszenz von PHB-Granula achten. Auch bei Normallicht betrachten, um sicherzustellen, daß die Granula intrazellulär sind und die Zellmorphologie typisch für Pseudomonas solanacearum ist.

Sudanschwarztest

1. Fixierten Ausstrich mit 0,3%iger Sudanschwarz-B-Lösung in 70%igem Ethanol überspülen. 10 Minuten bei Raumtemperatur inkubieren.
2. Färbelösung ablaufen lassen. Kurz unter Leitungswasser abwaschen. Überschüssiges Wasser mit Papiertüchern aufnehmen.
3. Ausstrich kurz in Xylol tauchen. Mit Papiertüchern trockenlöschen.

   Achtung! Xylol ist gesundheitsschädlich. Im Abzug arbeiten.
4. Ausstrich mit 0,5%igem (w/v) wäßrigem Safranin überspülen und 10 Sekunden bei Raumtemperatur belassen.

   Achtung! Safranin ist gesundheitsschädlich. Im Abzug arbeiten.
5. Unter schwach fließendem Leitungswasser abwaschen. Mit Papiertüchern trockenlöschen. Deckglas auflegen.
6. Gefärbten Ausstrich im Durchlichtmikroskop unter Ölimmersion bei einer Vergrößerung von 1 000 betrachten.

   PHB-Granula in Zellen von Pseudomonas solanacearum sind blau-schwarz gefärbt. Die Zellwände sind rosa gefärbt.

Andere Tests

Als andere Screeningtests eignen sich der IF-Test (Abschnitt III.2), der ELISA-Test (Abschnitt III.3) und der PCR-Test (Abschnitt III.4).

3. **Isolierungsverfahren**

3.1. Das Exsudat oder Bereiche verfärbten Gewebes vom Gefäßbündelring in der Knolle oder von den Gefäßsträngen im Stengel entfernen.

In einem geringen Volumen sterilen, destillierten Wassers oder 50 mM Phosphat-Puffer suspendieren und 5—10 Minuten stehenlassen.

3.2. Mindestens zwei Dezimalverdünnungen, 1/10 und 1/100, der Suspension herstellen oder bei Bedarf mehr.

3.3. Ein Standardvolumen der Suspension und der Verdünnungen auf ein Universalnährmedium NA, YPGA und SPA (Anlage 1) und/oder auf das Kelman's Tetrazolium-Medium (Anlage 1) und/oder auf das selektive SMSA-Medium (Anlage 7) überführen. Mit einem geeigneten Verdünnungsausstrichverfahren ausspateln oder ausstreichen. Es kann günstig sein, einen Satz separater Platten mit einer verdünnten Zellsuspensionskultur eines Biovar-2-Rasse-3-Stamms von Pseudomonas solanacearum als positive Kontrolle anzulegen.

3.4. Die Platten 3 Tage bei 28 °C bebrüten. Bei langsamem Wachstum kann bis zu 6 Tagen bebrütet werden, wobei aber die Kolonien auf SMSA-Medium atypisch werden und absterben können.

Auf den Universalnährmedien bilden virulente Isolate von Pseudomonas solanacearum perlweiße, flache, unregelmäßige und flüssige Kolonien, oft mit charakteristischen Wirbeln.

Auf Kelman's Tetrazolium-Mediun bilden virulente Isolate von Pseudomonas solanacearum typische cremefarbene, flache, unregelmäßige, flüssige Kolonien mit blutrot gefärbtem Zentrum.

Avirulente Formen von Pseudomonas solanacearum bilden dagegen butterartige, dunkelrote Kolonien.

Virulente Isolate von Pseudomonas solanacearum bilden auf dem SMSA-Medium milchig-weiße, flache, unregelmäßige und flüssige Kolonien mit blutrot gefärbtem Zentrum.

Avirulente Formen von Pseudomonas solanacearum bilden weniger flüssige Kolonien, die vollständig rosa bis rot auf dem SMSA-Medium erscheinen.

3.5. Kolonien mit charakteristischer Morphologie durch Subkultur auf einem Universalnährmedium reinigen. Regelmäßiges Subkultivieren, das zum Verlust der Virulenz führen könnte, ist zu vermeiden.

4. **Bestätigungstest(s)**

4.1. *Identifizierung von Pseudomonas solanacearum*

Identifiziere Reinkulturen von Pseudomonas solanacearum durch zumindest eines der nachfolgenden Verfahren:

Nähr- und enzymatische Tests

Hinweis: In jeden Test geeignete Kontrollstämme einbeziehen.

Es wurden Tests ausgewählt, die entscheidende Bedeutung für die Bestimmung von Art und Biovar haben. Folgende phänotypische Eigenschaften von Pseudomonas solanacearum sind universell vorhanden oder abwesend:

Fluoreszierende Pigmente	–
PHB-Einschlüsse	+
Oxidations-/Fermentations-Test	O+/F–
Katalase	+
Kovacs' Oxidase	+
Nitratreduktion	+
Citratverwertung	+
Wachstum bei 40 °C	–
Wachstum in 1 % NaCl	+
Wachstum in 2 % NaCl	–
Arginin-Dihydrolase	–
Gelatineverflüssigung	–
Stärkehydrolyse	–
Aesculinhydrolyse	–
Levanproduktion	–

Medien und Methoden sind Lelliott & Stead (1987) zu entnehmen.

IF-Test

Eine Suspension von 10^6 Zellen je ml von der Kultur und dem(n) Kontrollstamm(stämmen) zubereiten. Eine Reihe von Zweifachverdünnungen des Antiserums zubereiten. Das IF-Verfahren anwenden (Abschnitt III.2). Der IF-Titer der Kultur muß dem der positiven Kontrolle entsprechen.

ELISA-Test

Eine Suspension von $> 10^6$ Zellen je ml von der Kultur und von dem(n) Kontrollstamm(stämmen) zubereiten. Das ELISA-Verfahren anwenden (Abschnitt III.3). Der Extinktionswert der Kultur muß dem der positiven Kontrolle entsprechen.

PCR-Test

Eine Suspension von 10^6 Zellen je ml von der Kultur und von dem(n) Kontrollstamm(stämmen) zubereiten. Das PCR-Verfahren anwenden (Abschnitt III.4). Das PCR-Produkt der Kultur muß die gleiche Größe und das gleiche Restriktionsenzymanalyse (REA)-Muster haben wie das der positiven Kontrolle.

Fluoreszenz-in-Hybridisierung (FISH)

Eine Suspension von 10^6 Zellen je ml von der Kultur und von dem(n) Kontrollstamm(stämmen) zubereiten. Das FISH-Verfahren (van Beuningen et al., 1995) mit dem PCR-Primer OLI-1 (Seal et al., 1993) anwenden. Die Kultur muß die gleiche Reaktion aufweisen wie die positive Kontrolle.

Proteinprofil

Denaturierte Proteine ganzer Zellen werden durch Polyacrylamid-Gelelektrophorese (PAGE) getrennt (Stead, 1992a).

Bestimmung des Fettsäureprofils (FAP)

Die Kultur und eine positive Kontrolle 48 Stunden bei 28 °C auf Trypticase-Soja-Agar wachsen lassen und das FAP-Verfahren anwenden (Janse, 1991: Stead, 1992a; Stead, 1992b). Das Profil der Kultur muß mit dem der positiven Kontrolle identisch sein. Charakteristische Fettsäuren unter den angegebenen Bedingungen sind 14:0 3OH, 16:0 2OH, 16:1 2OH und 18:1 2OH.

4.2. *Stammcharakterisierung*

Die Stammcharakterisierung ist fakultativ, wird aber für jeden neuen Fall unter Anwendung von zumindest einem der nachfolgenden Tests empfohlen.

Biovarbestimmung

Pseudomonas solanacearum wird nach der Fähigkeit, aus drei Zuckeralkoholen und drei Zuckern Säuren zu bilden, in Biovare eingeteilt (Hayward, 1964, 1994):

	Biovar				
	1	2	3	4	5
Verwertung von:					
— Maltose	–	+	+	–	+
— Laktose	–	+	+	–	+
— Cellobiose	–	+	+	–	+
— Mannit	–	–	+	+	+
— Sorbit	–	–	+	+	–
— Dulcit	–	–	+	+	–

Durch zusätzliche Tests kann Biovar 2 in Subphänotypen unterschieden werden (Hayward, 1994):

	Biovar 2	Biovar 2-A	Biovar 2-T
Verwertung von Trehalose	–	+	+
Verwertung von Inosit	+	–	+
Verwertung von D-Ribose	–	–	+
Pektolytische Aktivität	gering	gering	hoch

Rassenbestimmung

Die Rasse (Buddenhagen et al., 1962) wird auf der Grundlage eines Pathogenitätstests an Tomatenpflanzen oder Eierfrüchten und an Tabakpflanzen sowie durch einen Hypersensitivitätsreaktionstest (HR) an Tabakblättern (Lozano und Sequeira, 1970) bestimmt:

	Rasse(*)		
	1	2	3
Reaktionen bei:			
— Tomatenpflanzen/Eierfrüchten	Welke	keine Reaktion	Welke
— Tabakpflanzen	Welke	keine Reaktion	keine Reaktion
— Tabakblättern	Nekrose (48 Std.) und Welke (7—8 Tage)	HR (12—24 Std.)	Chlorose (2—8 Tage)

(*) Rasse 4 (pathogen an Ingwer und einigen anderen Wirten) und Rasse 5 (nur pathogen an Maulbeere) sind nicht berücksichtigt.

Die Bestimmung der Rasse mit dem Pathogenitätstest oder dem Hypersensitivitätstest an Tabak muß nicht sehr zuverlässig sein und kann anhand der Bestimmung des Biovars und des ursprünglichen Wirtes erfolgen.

Die Kultur kann weiter charakterisiert werden durch:

Genetischen Fingerabdruck

Die molekulare Unterscheidung von Stämmen des Pseudomonas-solanacearum-Komplexes kann erfolgen durch:

RFLP-Analyse (Cook et al., 1989).

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

4.3. *Pathogenitätstest*

Dieser Test dient zur Bestätigung der Diagnose von Pseudomonas solanacearum und der Bestätigung der Virulenz der als Pseudomonas solanacearum identifizierten Kulturen.

Aus der Kultur und einem positiven Kontrollstamm ein Inokulum mit einer Zelldichte von 10^6/ml zubereiten. 5—10 Tomatenpflanzen oder Eierfrüchte vorzugsweise im Dreiblattstadium oder älter beimpfen (Abschnitt III. 6). Bis zu zwei Wochen bei Temperaturen von 22 °C—28 °C und hoher relativer Luftfeuchtigkeit kultivieren und täglich wässern. Auf Anzeichen von Welke und/oder Epinastie, Chlorosen, Stauchungen achten.

Von Pflanzen mit charakteristischen Symptomen wie folgt isolieren:

— ein Stengelstück 2 cm oberhalb der Inokulationsstelle entnehmen;

— in wenig sterilem destilliertem Wasser oder 50mM Phosphatpuffer suspendieren, zerkleinern und ausplattieren, inkubieren, anschließend auf typische Kolonien von Pseudomonas solanacearum bonitieren.

ABSCHNITT III

NACHWEIS UND IDENTIFIZIERUNG VON PSEUDOMONAS SOLANACEARUM IN PROBEN VON KARTOFFELKNOLLEN

Hinweis: Die Standardprobengröße besteht aus 200 Knollen. Das Verfahren ist aber auch für Proben mit weniger als 200 Knollen geeignet.

1. **Vorbereitung der Probe für den Test**

Hinweis: Das mit diesem Verfahren gewonnene Kartoffelextraktpellet kann auch für den Nachweis von Clavibacter michiganensis subsp. sepedonicus verwendet werden.

Optionen vor dem Test, falls als zweckmäßig angesehen:

i) Die Probe bis zu 2 Wochen bei 25—30 °C inkubieren, um die Vermehrung geringer Pseudomonas-solanacearum-Populationen zu fördern;

ii) die Knollen unter fließendem Wasser mit geeigneten Desinfektions- und Waschmitteln waschen. Die Knollen an der Luft trocknen.

1.1. Mit einem sauberen und desinfizierten Skalpell oder Gemüsemesser die Schale am Nabelende der Knolle entfernen, so daß das vaskuläre Gewebe sichtbar wird. Am Nabelende jeder Knolle sorgfältig ein kleines kegelförmiges Stück (3—5 mm Durchmesser) vaskulären Gewebes herausschneiden. Dabei ist darauf zu achten, daß möglichst wenig nichtvaskuläres Gewebe erfaßt wird. An jeder Knolle der Probe durchführen.

Hinweis: In dieser Phase können die Knollen visuell untersucht werden (Abschnitt II.1). Knollen mit Symptomen oder starker Fäule sind auszusondern und gesondert zu prüfen (Abschnitt II).

1.2. Die Nabelenden in einen geschlossenen Behälter geben. Die Nabelenden sollten sofort verarbeitet werden. Ist dies nicht möglich, sollten sie nicht länger als 24 Stunden oder bei 4 °C nicht länger als 72 Stunden aufbewahrt werden.

1.3. Die Nabelenden sind nach einem der folgenden Verfahren zu verarbeiten:

i) Die Nabelenden in einen geeigneten Behälter geben.

Ausreichendes Volumen Mazerationspuffer (Anlage 2) zugeben, um die Nabelenden zu bedecken.

Die Stücke in einem Waring-Blender oder Ultra-Turrax gerade bis zur vollständigen Homogenisierung zerkleinern. Eine zu starke Homogenisierung sollte vermieden werden.

Das Mazerat 15—30 Minuten ziehen lassen.

ii) Die Nabelenden in einen geeigneten Behälter geben.

Ausreichendes Volumen Mazerationspuffer zugeben, um die Nabelenden zu bedecken.

Den Behälter auf eine Schüttelmaschine stellen.

Bei 50—100 rpm 4 Stunden bei 20 °C—22 °C oder 16—24 Stunden bei 4 °C inkubieren.

iii) Die Nabelenden in einen festen Einmalmazerationsbeutel (z. B. Stomacher-Beutel, Abmessungen 105 mm × 150 mm, strahlungssteril) geben.

Die Nabelenden mit einem geeigneten Werkzeug, z. B. einem Hammer, bis zur vollständigen Homogenisierung zerkleinern.

Ausreichendes Volumen des Mazerationspuffers zugeben, um die Nabelenden zu bedecken.

Das Mazerat 15—30 Minuten absetzen lassen.

1.4. Die Bakterien sind nach einem der folgenden Verfahren aus den aufgearbeiteten Nabelenden zu extrahieren:

i) Das Mazerat vorsichtig in Zentrifugenröhrchen abgießen, Rückstand dabei im Behälter oder Beutel lassen. Wenn das dekantierte Mazerat trüb ist: bei einer Temperatur unter 10 °C und nicht mehr als 180 g 10 Minuten zentrifugieren.

Dekantiertes Mazerat oder Überstand von der ersten Zentrifugierung 15 Minuten lang bei 7 000 g oder 10 Minuten lang bei 10 000 g und bei einer Temperatur unter 10 °C zentrifugieren.

Den Überstand verwerfen, ohne das Pellet aufzurühren.

ii) Das Mazerat durch ein Filtrationssystem mit einer Porenweite von 40—100 µm filtrieren. Dabei ist die Filtration mit einer Vakuumpumpe zu verstärken.

Das Filtrat in einem Zentrifugenröhrchen auffangen.

Das Filtrat mit Mazerationspuffer waschen.

Das Filtrat 15 Minuten lang bei 7 000 g oder 10 Minuten lang bei 10 000 g und bei einer Temperatur unter 10 °C zentrifugieren.

Den Überstand verwerfen, ohne das Pellet aufzurühren.

1.5. Das Pellet in 1 ml Pelletpuffer (Anlage 2) suspendieren.

In zwei gleiche Teile und jeden Teil in ein Mikroröhrchen füllen.

Ein Mikroröhrchen wird für den Test verwendet. Der Rest dieses Extrakts wird während des Tests bei 4 °C aufbewahrt.

Dem anderen Mikroröhrchen 10—25 % (v/v) steriles Glycerin zugeben. Vortexen. Bei - 18 °C (Wochen) oder - 70 °C (Monate) lagern.

2. **IF-Test**

Antiserum für Pseudomonas solanacearum, vorzugsweise Rasse 3/Biovar 2, verwenden. Den Titer an einer Suspension von 10^6 Zellen je ml eines homologen Stammes von Pseudomonas solanacearum mit einer geeigneten Verdünnung des Fluoreszeinisothiocyanat-Konjugats (FITC) nach den Empfehlungen des Herstellers bestimmen. Das Rohserum sollte einen IF-Titer von mindestens 1 : 2 000 haben.

Multiwell-Objektträger vorzugsweise mit 10 Feldern von mindestens 6 mm Durchmesser verwenden.

Auf jeden Objektträger eine FITC-Konjugatkontrolle auftragen. Bei einer großen Anzahl von Objektträgern kann auf die PBS-Kontrolle verzichtet werden. Der Test sollte allerdings mit einer PBS-Kontrolle wiederholt werden, wenn die FITC-Kontrolle eine positive Zelle aufweist.

Separate Positivkontroll-Träger mit einer Suspension von 10^6 Zellen je ml von einem Stamm der entsprechenden Rasse/Biovar von Pseudomonas solanacearum vorbereiten. In jeder Testreihe ist ein Objektträger zu verwenden.

2.1. Die Objektträger sind nach einem der folgenden Verfahren vorzubereiten:

i) Pellets mit relativ wenig Stärke:

Ein abgemessenes Standardvolumen (15 µl reichen für ein Feld von 6 mm Durchmesser aus — bei größeren Feldern ein entsprechend größeres Volumen verwenden) des resuspendierten Pellets auf eine Reihe von Feldern pipettieren. Die verbleibende Reihe kann wie in Abbildung 1 dargestellt für ein Duplikat oder für eine zweite Probe verwendet werden.

ii) Andere Pellets:

Dezimalverdünnungen, d. h. 1/10, 1/100 und 1/1 000, des resuspendierten Pellets in Pelletpuffer herstellen. Ein abgeschlossenes Standardvolumen (15 µl reichen für ein Feld von 6 mm Durchmesser aus — bei größeren Feldern ein entsprechendes größeres Volumen verwenden) des resuspendierten Pellets und jeder Verdünnung auf eine Reihe von Feldern pipettieren. Die verbleibende Reihe kann wie in Abbildung 2 dargestellt für ein Duplikat oder für eine zweite Probe verwendet werden.

2.2. Tropfen trocknen lassen. Bakterienzellen entweder durch Erhitzen, Abflammen oder mit 95 %igem Ethanol am Objektträger fixieren.

2.3. IF-Verfahren

i) Bei Objektträgervorbereitung nach 2.1.i):

Einen Satz Zweifachverdünnungen des Antiserums in IF-Puffer (Anlage 3) zubereiten:

1/4 des Titers (T/4), 1/2 des Titers (T/2), Titer (T) und das Doppelte des Titers (2T).

ii) Bei Objektträgervorbereitung nach 2.1.ii):

Zubereitung der Arbeitsverdünnung des Antiserums in IF-Puffer. Die Arbeitsverdünnung ist die Verdünnung des Antiserums mit optimaler Spezifität und hat normalerweise die Hälfte des Titers.

Abbildung 1

Vorbereitung des Objektträgers nach 2.1.i) und 2.3.i)

Standardverdünnung des resuspendierten Pellets

T = Titer

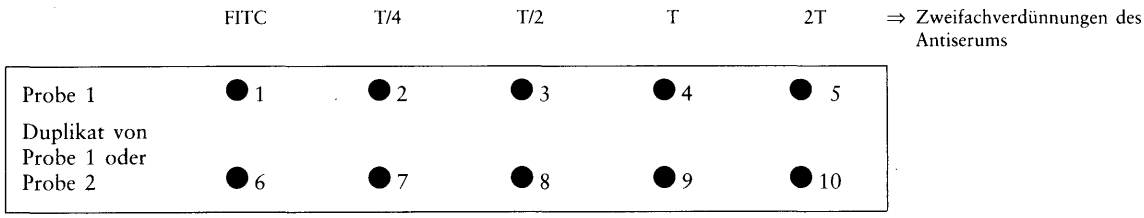
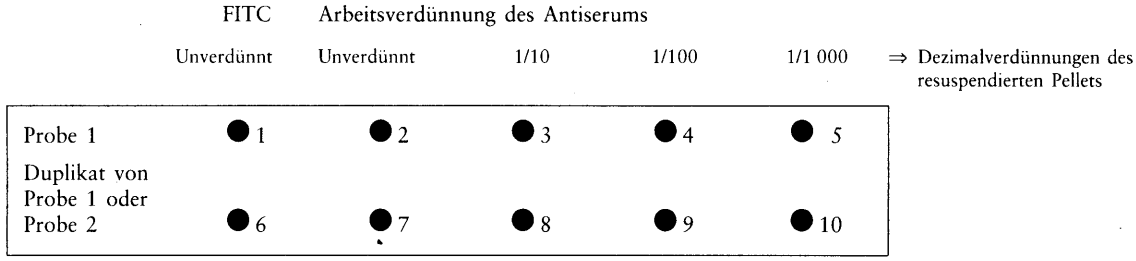


Abbildung 2

Vorbereitung des Objektträgers nach 2.1.ii) und 2.3.ii)



2.3.1. Die Objektträger auf feuchten Papiertüchern auslegen.

Alle Testfelder mit Antiserumverdünnung(en) bedecken. Auf die FITC-Fehler PBS auftragen. Das auf die Felder aufgetragene Antiserumvolumen muß dem Volumen des aufgetragenen Extraktes entsprechen.

2.3.2. Abgedeckt 30 Minuten lang bei Raumtemperatur inkubieren.

2.3.3. Die Antiserumtropfen vom Objektträger vorsichtig abschütteln, und die Objektträger sorgfältig mit IF-Puffer spülen. 5 Minuten mit IF-Puffer-Tween und anschließend 5 Minuten in IF-Puffer waschen (Anlage 3).

Überschüssige Feuchtigkeit sorgfältig entfernen.

2.3.4. Die Objektträger auf feuchten Papiertüchern auslegen.

Die Testfelder und das FITC-Feld mit der Verdünnung des zur Bestimmung des Titers verwendeten FITC-Konjugats bedecken. Das auf die Felder aufgetragene Konjugatvolumen muß dem Volumen des aufgetragenen Antiserums entsprechen.

2.3.5. Abgedeckt 30 Minuten lang bei Raumtemperatur inkubieren.

2.3.6. Die Konjugattropfen vorsichtig vom Objektträger abschütteln. Wie unter 2.3.3 angegeben waschen und spülen.

Überschüssige Feuchtigkeit sorgfältig entfernen.

2.3.7. Auf jedes Feld 5—10 µl 0,1 M phosphatgepuffertes Glycerin (Anlage 3) oder eine ähnliche Deckflüssigkeit auftragen und Deckglas auflegen.

2.4. Auswertung des IF-Tests

Objektträger unter einem Epifluoreszenz-Mikroskop mit Filtern, die für FITC-Anregung geeignet sind, unter Ölimmersion bei einer Vergrößerung von 500—1 000 untersuchen. Jedes Feld in zwei rechtwinklig zueinanderstehenden Durchmessern sowie entlang des Feldrandes mikroskopisch untersuchen.

Zunächst den Objektträger mit der Positivkontrolle prüfen. Die Zellen müssen stark fluoreszieren und vollständig gefärbt sein. *Hinweis: Bei abweichender Färbung zum Normalzustand ist der Test zu wiederholen.*

Auswertung der zu untersuchenden Objektträger. Zunächst auf Abwesenheit von fluoreszierenden Zellen in den FITC-Kontrollfeldern prüfen. Fluoreszierende Zellen im FITC-Kontrollfeld deuten auf unspezifische Bindung des Konjugats, Autofluoreszenz oder Kontamination hin. *Hinweis: Wenn dies festgestellt wird, ist der Test zu wiederholen.*

Stark fluoreszierende Zellen mit charakteristischer Morphologie von Pseudomonas solanacearum in den Testfeldern beobachten. Die Intensität der Fluoreszenz muß der des positiven Kontrollstammes bei gleicher Antiserumverdünnung entsprechen. Zellen mit unvollständiger Färbung oder mit schwacher Fluoreszenz sind nicht zu berücksichtigen, es sei denn, es gibt viele solcher Zellen (siehe Auswertung des IF-Testergebnisses).

Auswertung des IF-Testergebnisses

i) Für jede Probe, bei der keine stark fluoreszierenden Zellen mit charakteristischer Morphologie gefunden werden, ist der IF-Test negativ.

ii) Für jede Probe, bei der stark fluoreszierende Zellen mit charakteristischer Morphologie gefunden werden, ist die mittlere Anzahl der Zellen pro Mikroskopfeld zu bestimmen und je ml (N) resuspendiertes Pellet (Anlage 4) zu berechnen.

Eine Bakteriendichte von ungefähr 10^3 Zellen je ml resuspendiertes Pellet ist als die Nachweisgrenze für den IF-Test anzusehen:

— Bei Proben mit $N > 10^3$ Zellen je ml resuspendiertes Pellet ist der IF-Test als positiv zu bewerten;

— bei Proben mit $N > 10^3$ Zellen je ml resuspendiertes Pellet kann der IF-Test als positiv bewertet werden;

iii) Wird eine große Anzahl (< 10^5 Zellen je ml) unvollständig oder schwach fluoreszierender Zellen beim Antiserumtiter festgestellt, sollte ein zweiter Test durchgeführt werden:

— entweder ein Test auf der Grundlage eines anderen biologischen Prinzips

oder

— ein weiterer IF-Test, entweder mit einem zweiten Antiserum oder einer zehnfachen Verdünnung des Pellets.

3. **ELISA-Test**

(Nach Robinson-Smith et al., 1995)

Antiserum für Pseudomonas solanacearum, vorzugsweise Rasse 3 Biovar 2, verwenden. Den Titer an einer Suspension von 10^6 Zellen je ml eines homologen Stamms von Pseudomonas solanacearum bestimmen.

Es wird empfohlen, NUNC-Polysorb-Mikrotiterplatten zu verwenden.

Der Test sollte eine negative Kartoffelextraktkontrolle und eine PBS-Kontrolle umfassen.

Als positive Kontrolle ist eine Suspension von > 10^6 Zellen je ml von einem Stamm der entsprechenden Rasse/Biovar von Pseudomonas solanacearum zu verwenden. Der Test ist genauso durchzuführen wie für die Probe(n), aber getrennt von den Proben auf der Mikrotiterplatte.

3.1. 100—200 µl des resuspendierten Pellets in ein Mikroröhrchen pipettieren.

4 Minuten lang bei 100 °C erhitzen. Mikroröhrchen auf Eis legen.

3.2. Gleiches Volumen doppelt starken Carbonat-Beschichtungs-Puffer (Anlage 5) zugeben. Vortexen.

3.3. *In mindestens* zwei Vertiefungen der Mikrotiterplatte Aliquote von jeweils 100 µl geben. Eine Stunde bei 37 °C oder über Nacht bei 4 °C inkubieren.

3.4. Extrakte aus den Vertiefungen vollständig entfernen. Vertiefungen dreimal mit PBS-Tween (Anlage 5) waschen; die letzte Waschlösung sollte mindestens 5 Minuten in den Vertiefungen bleiben.

3.5. Die geeignete Verdünnung vom Pseudomonas-solanacearum-Antiserum in Blockierungs-Puffer (Anlage 5) zubereiten. 100 µl der Antiserumverdünnung in die Vertiefungen geben.

Eine Stunde bei 37 °C inkubieren.

3.6. Antiserum aus den Vertiefungen vollständig entfernen. Vertiefungen wie zuvor beschrieben (3.4) waschen.

3.7. Die geeignete Verdünnung des Konjugats der alkalischen Phosphatase in Blockierungs-Puffer zubereiten. 100 µl der Konjugatverdünnung in die Vertiefungen geben.

Eine Stunde bei 37 °C inkubieren.

3.8. Konjugat aus den Vertiefungen vollständig entfernen. Vertiefungen wie zuvor beschrieben (3.4 und 3.6) waschen.

3.9. Alkalische Phosphatasesubstratlösung zubereiten (Anlage 5). 100 µl in die Vertiefungen geben. Zwischen 30 Minuten und 1 Stunde bei Dunkelheit und Raumtemperatur inkubieren.

3.10. Extinktion bei 409 nm ablesen.

Auswertung des ELISA-Tests

Der ELISA-Test ist negativ, wenn die optische Dichte (OD) der Probe < 2×OD der negativen Kontrolle beträgt.

Der ELISA-Test ist positiv, wenn die optische Dichte (OD) der Probe > 2×OD der negativen Kontrolle beträgt.

4. **PCR-Test**

(nach Seal et al., 1993)

Hinweis: Bei allen Schritten der Probenzubereitung und anderen Tätigkeiten in Zusammenhang mit PCR müssen Pipettenspitzen mit Filtern verwendet werden.

Eine Suspension von 10^6 Zellen je ml von einem Rasse-3-Biovar-2-Stamm von Pseudomonas solanacearum als positive Kontrolle zubereiten. Der Test ist genauso durchzuführen wie für die Probe(n).

4.1. 100 µl des resuspendierten Pellets in ein Mikroröhrchen pipettieren.

Alternativ können 90 µl des resuspendierten Pellets in ein Mikroröhrchen gegeben werden, das 10 µl 0,5 M NaOH enthält. Durch wiederholtes Umdrehen des Mikroröhrchens mischen.

4.2. 4 Minuten bei 100 °C erhitzen. Mikroampulle sofort auf Eis legen.

4.3. Zumindest zwei Dezimalverdünnungen, z. B. 1/10 und 1/100, oder bei Bedarf mehr, in sterilem, destilliertem oder ultrareinem Wasser (UPW) zubereiten.

4.4. Die PCR-Reaktionsmischung (Anlage 6) in einem sterilen Röhrchen durch Zugabe der folgenden Komponenten in folgender Reihenfolge zubereiten:

Für ein Reaktionsvolumen von 50 µl

Komponente	Menge	Endkonzentration
Steriles, destilliertes Wasser oder UPW	30,8 µl—33,8 µl	
10 × PCR-Puffer	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 mM
Primer Y-2 (20 µM)	2,5 µl	1 mM
Taq-Polymerase (5U/µl)	0,2 µl	1,0 U
Gesamtvolumen	45 µl—48 µl	

Für mehr Reaktionen

Die Menge jeder Komponente für die erforderliche Anzahl von Reaktionen berechnen. Die Komponenten mischen und 45 µl—48 µl des Gemisches in sterile PCR-Röhrchen geben. Röhrchen mit der PCR-Reaktionsmischung auf Eis lagern.

Für Reaktionsvolumen von 25 µl:

Menge der Komponenten entsprechend verringern.

4.5. PCR-Amplifikation

4.5.1. Fakultativ! Röhrchen mit der gekochten Probe und der positiven Kontrolle pulszentrifugieren.

Den Röhrchen mit der PCR-Reaktionsmischung in der angegebenen Reihenfolge 2—5 µl der Probe(n), Wasserkontrolle und positiven Kontrolle zugeben. Röhrchen in den Heizblock des DNA-Thermocyclers stellen.

4.5.2. Folgendes Programm durchführen:

1 Zyklus:
i) 2 Minuten bei 96 °C: Denaturierung der Matrizze;

50 Zyklen:
ii) 20 Sekunden bei 94 °C: Denaturierung;
iii) 20 Sekunden bei 68 °C: Anlagerung der Primer;
iv) 30 Sekunden bei 72 °C: Verlängerung der Kopie;

1 Zyklus:
v) 10 Minuten bei 72 °C: weitere Verlängerung;

1 Zyklus:
vi) bei 4 °C halten.

Hinweis: Diese Parameter beziehen sich auf einen Perkin Elmer 9600. Bei anderen Thermocyclern ist möglicherweise eine Mineralölschicht im PCR-Reaktionsröhrchen erforderlich und/oder eine Veränderung der Dauer von Schritt ii), iii) und iv) im Amplifikationsprofil.

4.5.3. Röhrchen aus dem Thermocycler nehmen. Das PCR-Produkt analysieren. Wenn dies nicht sofort geschehen kann, sind die Röhrchen zur Verwendung am selben Tag bei 4 °C bzw. für einen längeren Zeitraum bei –18 °C zu lagern.

4.6. Analyse des PCR-Produkts

Die PCR-Fragmente werden durch Agarose-Gelelektrophorese und Anfärben mit Ethidiumbromid nachgewiesen.

4.6.1. Ein geeignetes Agarosegel zubereiten, indem man Agarose in Tris/Acetat-Elektrophorese-Puffer (TAE) vorsichtig aufkocht.

4.6.2. Die geschmolzene Agarose auf 50—60 °C abkühlen, in die Gelgießkammer der Elektrophoreseapparatur füllen und den Kamm einsetzen. Die Lösung erstarren lassen.

4.6.3. Den Kamm herausnehmen. Das Gel in TAE tauchen, so daß es gerade 2—3 mm mit dem Puffer bedeckt ist.

4.6.4. 3-µl-Tropfen Beladungs-Puffer auf Parafilm geben. 12 µl des PCR-Produkts von den Proben, der Positivkontrolle oder der Wasserkontrolle zugeben und durch leichtes Ansaugen in der Pipettenspitze vor dem Einfüllen mischen. Die angegebenen Volumina können der Kapazität der Vertiefungen im Agarosegel angepaßt werden.

4.6.5. Die Vertiefungen des Gels sorgfältig befüllen. In mindestens eine Vertiefung als Bezugssubstanz einen geeigneten DNA-Marker geben.

4.6.6. Netzgerät an die Elektrophoreseapparatur anschließen. Die Elektrophorese bei 5—8 V/cm durchführen, bis die Front des Trackingindikators sich innerhalb von 1 cm vom Ende des Gels befindet.

4.6.7. Stromversorgung abschalten und Netzgerät von der Elektrophoreseapparatur abnehmen.

Das Gel vorsichtig herausnehmen und 30—45 Minuten in Ethidiumbromidlösung tränken.

Hinweis: Beim Umgang mit Ethidiumbromid, einem starken Mutagen, sind stets Einmalhandschuhe zu tragen!

4.6.8. Färbemittel 10—15 Minuten in destilliertem Wasser abwaschen.

4.6.9. Das/die amplifizierte(n) DNA-Fragment(e) durch UV-Transillumination sichtbar machen. Das PCR-Produkt von Pseudomonas solanacearum mit den Primern OLI-1 und Y-2 hat eine Länge von 288 bp. Mit dem DNA-Marker und der positiven Kontrolle vergleichen.

Hinweis: Die Wasserkontrolle muß auf jeden Fall negativ sein. Fällt sie positiv aus, ist der Test zu wiederholen.

4.6.10. Zur Dokumentation gegebenenfalls das Gel photographieren.

4.6.11. Die Echtheit des amplifizierten Fragments durch Restriktionsenzymanalyse (REA) bestätigen.

4.7. Restriktionsenzymanalyse (REA)

4.7.1. 8,5 µl des PCR-Produkts (4.5.3) in ein neues Mikroröhrchen geben. 1 µl des 10×Enzympuffers und 0,5 µl des Restriktionsenzyms Avall zugeben.

4.7.2. Durch leichtes Ansaugen in der Pipettenspitze mischen. Wenn Tropfen an den Wänden des Röhrchens verbleiben, in der Mikrozentrifuge pulszentrifugieren. Eine Stunde bei 37 °C inkubieren.

4.7.3. Das verdaute PCR-Fragment wie zuvor (4.6) durch Agarose-Gelelektrophorese analysieren.

Auswertung des PCR-Testergebnisses

Der PCR-Test ist negativ, wenn das charakteristische 288-bp-Fragment nicht nachgewiesen *und* das Fragment für den positiven Kontrollstamm von Pseudomonas solanacearum nachgewiesen wird.

Der PCR-Test ist positiv, wenn das 288-bp-Fragment nachgewiesen wird *und* die REA zeigt, daß das amplifizierte Fragment mit dem positiven Kontrollstamm von Pseudomonas solanacearum identisch ist.

5. **Selektivausstrichtest**

(nach Elphinstone et al., 1996)

5.1. Der Test wird mit einer geeigneten Verdünnungsausstrichtechnik durchgeführt, z. B.:

i) mindestens zwei Dezimalverdünnungen, d. h. 1/10 und 1/100, des resuspendierten Pellets in Pelletpuffer zubereiten. Ein abgemessenes Standardvolumen (50—100 µl) des resuspendierten Pellets und jeder Verdünnung auf ein modifiziertes selektives SMSA-Medium (Anlage 7) aufbringen und mit einem Glasstäbchen über die gesamte Fläche des Mediums verteilen.

Wenn es zweckmäßig erscheint, ist mit einer 10-µl-Öse auch ein Verdünnungsausstrich des resuspendierten Pellets durchzuführen. Die Öse zwischen den Strichen abflammen.

ii) Ein abgemessenes Standardvolumen (50—100 µl) des resuspendierten Pellets auf ein modifiziertes selektives SMSA-Medium aufbringen und mit einem Glasstäbchen über die gesamte Fläche des Mediums verteilen. Das Stäbchen ohne Abflammen auf zwei weiteren Platten mit modifiziertem SMSA-Medium ausstreichen.

5.2. Mit der gleichen Verdünnungsausstrichtechnik eine Suspension von 10^6 Zellen je ml von einem virulenten Rasse-3-/Biovar-2-Stamm von Pseudomonas solanacearum als positive Kontrolle auf einen Satz separater Platten mit modifiziertem SMSA-Medium auftragen.

5.3. Die Platten bei 28 °C bebrüten. Die Platten nach 3 Tagen erstmals prüfen. Bei Negativbefund bis zu insgesamt 6 Tagen weiter bebrüten. Virulente Isolate von Pseudomonas solanacearum bilden milchig weiße, flache, unregelmäßige und flüssige Kolonien mit deutlich erkennbaren roten bis purpurfarbenen Zentren mit Strichen oder Wirbeln.

5.4. Kolonien mit charakteristischer Morphologie durch Subkultur auf einem Universalnährmedium (Anlage 1) reinigen.

5.5. Reinkulturen identifizieren (Abschnitt II.4.1) und positive Pseudomonas-solanacearum-Kulturen durch einen Pathogenitätstest (Abschnitt II.4.3) bestätigen.

Auswertung des Ergebnisses des Selektivausstrichtests

Der Selektivausstrichtest ist negativ, wenn nach sechs Tagen keine Kolonien isoliert werden oder wenn keine charakteristischen Kolonien von Pseudomonas solanacearum isoliert werden, vorausgesetzt, daß keine Hemmung durch Kolonien anderer Bakterien vermutet wird und daß charakteristische Kolonien von Pseudomonas solanacearum von den positiven Kontrollen gefunden worden sind.

Der Verdünnungsausstrichtest ist positiv, wenn charakteristische Kolonien von Pseudomonas solanacearum isoliert werden.

6. **Bioassay-Test**

(nach Janse, 1988)

6.1. Für jede Probe sind 10 Testpflanzen anfälliger Tomaten- oder Eierfruchtsämlinge im Dreiblattstadium zu verwenden. Die Testpflanzen sind 24 Stunden vor der Inokulation nicht zu wässern.

6.2. 100 µl des resuspendierten Pellets auf die Testpflanzen aufteilen. Den Stengel zwischen den Keimblättern sowie eine oder mehrere weitere Stellen beimpfen.

6.3. Mit der gleichen Technik 10 Sämlinge mit einer Suspension von 10^6 Zellen je ml eines virulenten Rasse-3-/Biovar-2-Stamms von Pseudomonas solanacearum als positive Kontrolle und mit Pelletpuffer als negative Kontrolle beimpfen.

Zur Vermeidung von Kreuzkontaminationen sind die positiven Kontrollpflanzen von den anderen Pflanzen zu trennen.

6.4. Die Testpflanzen bei 22 °C bis 28 °C und hoher relativer Luftfeuchte bis zu 4 Wochen und täglichem Wässern weiter wachsen lassen. Auf Anzeichen von Welke, Epinastie, Chlorosen und/oder Wachstumsstörungen achten.

6.5. Von infizierten Pflanzen isolieren (Abschnitt II). Reinkulturen mit charakteristischer Morphologie identifizieren (Abschnitt II.4.1) und Pseudomonas-solanacearum-Kulturen durch einen Pathogenitätstest bestätigen (Abschnitt II.4.3).

6.6. Bei Bedarf bei Testpflanzen, die keine Anzeichen für eine Infektion zeigen, überprüfen, ob keine Infektion vorliegt. Von jeder Testpflanze 2 cm über der Inokulationsstelle einen 1 cm großen Abschnitt des Stengels entnehmen. Die Gewebeteile in Mazerationspuffer homogenisieren. Verdünnungsausstrichtest durchführen (Abschnitt III.5.1). Bei positivem Befund Reinkulturen mit charakteristischer Morphologie identifizieren (Abschnitt II.4.1) und positive Kulturen durch einen Pathogenitätstest (Abschnitt II.4.3) bestätigen.

Auswertung des Bioassay-Testergebnisses

Der Bioassay-Test ist negativ, wenn die Testpflanzen nicht mit Pseudomonas solanacearum infiziert sind, vorausgesetzt, Pseudomonas solanacearum ist in den Positivkontrollen nachgewiesen worden.

Der Bioassay-Test ist positiv, wenn die Testpflanzen mit Pseudomonas solanacearum infiziert sind.

7. **Anreicherungstest**

(nach J. G. Elphinstone et al., 1996)

7.1. 100 µl des resuspendierten Pellets in 3 ml modifizierte SMSA-Bouillon geben (Anlage 7).

7.2. 48 Stunden lang, auf keinen Fall länger als 72 Stunden, bei 28 °C mit zwecks Belüftung lose aufgesetzter Kappe bebrüten.

7.3. Kappe schließen und vortexen. Für den IF-Test (dieser Abschnitt, Ziffer 2), den ELISA-Test (dieser Abschnitt, Ziffer 3) und/oder den PCR-Test (dieser Abschnitt, Ziffer 4) aliquotieren.

8. **Pathogenitätstest**

Siehe Abschnitt II.4.3.

Anlage 1

Nährmedien für Kulturen von Pseudomonas solanacearum

Nähragar (NA)

Nähragar (Difco)	23 g
Destilliertes Wasser	1 l

In 1-Liter-Kolben 0,5-Liter-Volumen des Mediums zubereiten.

Die Substanzen auflösen.

Durch 15minütiges Autoklavieren bei 121 °C sterilisieren.

Auf 50 °C abkühlen. Platten gießen.

Hefe-Pepton-Glukose-Agar (YPGA)

Hefeextrakt (Difco)	5 g
Bacto-Pepton	5 g
D(+)-Glukose (Monohydrat)	10 g
Bacto-Agar (Difco)	15 g
Destilliertes Wasser	1 l

In 1-Liter-Kolben 0,5-Liter-Volumen des Mediums zubereiten.

Die Substanzen auflösen.

Durch 15minütiges Autoklavieren bei 121 °C sterilisieren.

Auf 50 °C abkühlen. Platten gießen.

Saccharose-Pepton-Agar (SPA)

Saccharose	20 g
Pepton	5 g
K_2HPO_4	0,5 g
$MgSO_4 \cdot 7H_2O$	0,25 g
Bacto-Agar (Difco)	15 g
Destilliertes Wasser	1 l

In 1-Liter-Kolben 0,5-Liter-Volumen des Mediums zubereiten.

Die Substanzen auflösen. Erforderlichenfalls auf pH 7,2—7,4 einstellen.

Durch 15minütiges Autoklavieren bei 121 °C sterilisieren.

Auf 50 °C abkühlen. Platten gießen.

Kelmans Tetrazolium-Medium

Casaminosäuren (Difco)	1 g
Bacto-Pepton (Difco)	10 g
Dextrose	5 g
Bacto-Agar (Difco)	15 g
Destilliertes Wasser	1 l

In 1-Liter-Kolben 0,5-Liter-Volumen des Mediums zubereiten.

Die Substanzen auflösen.

Durch 15minütiges Autoklavieren bei 121 °C sterilisieren.

Auf 50 °C abkühlen.

Filtersterilisierte wäßrige Lösung von Triphenyl-Tetrazoliumchlorid (Sigma) bis zu einer Endkonzentration von 50 mg/l zugeben.

Platten gießen.

Anlage 2

Material für die Vorbereitung der Probe

Mazerationspuffer: 50 mM Phosphatpuffer, pH 7,0

Dieser Puffer wird für die Gewebemazeration verwendet.

$Na_2 HPO_4$	4,26 g
$KH_2 PO_4$	2,72 g
Destilliertes Wasser	1 l

Die Substanzen auflösen und den pH-Wert bestimmen. Nach Bedarf aliquotieren. Durch 15minütiges Autoklavieren bei 121 °C sterilisieren.

Bei Durchführung der direkten PCR wird die Zugabe von 5 % Polyvinylpyrrolidon MG 40.000 (PVP-40) empfohlen, um die Inzidenz der Amplifizierungshemmung durch aromatische Moleküle im Extrakt zu reduzieren.

Bei Anwendung des Waring-Blender- oder Ultra-Turrax-Homogenisierungsverfahrens zur Mazeration des Kartoffelgewebes wird die Zugabe eines Verflüssigungsmittels, eines Schaumverhütungsmittels oder eines Antioxidationsmittels empfohlen.

Lubrolflocken	0,5 g/l
DC-Silikon-Antischaum	1,0 ml/l
Tetranatriumpyrophosphat	1,0 g/l

Getrennt autoklavieren. Bis zum Erreichen der gewünschten Konzentration zugeben.

Pelletpuffer: 10 mM Phosphatpuffer, pH 7,2

Dieser Puffer wird für die Resuspendierung und Verdünnung der Pellets der Kartoffelnabelenden verwendet.

$Na_2 HPO_4 \cdot 12 H_2O$	2,7 g
$Na H_2PO_4 \cdot 2 H_2O$	0,4 g
Destilliertes Wasser	1 l

Die Substanzen auflösen und den pH-Wert prüfen. Nach Bedarf aliquotieren. Durch 15minütiges Autoklavieren bei 121 °C sterilisieren.

Anlage 3

Material für den IF-Test

IF-Puffer: 10 mM phosphatgepufferte Kochsalzlösung (PBS), pH 7,2

Dieser Puffer wird für die Verdünnung von Antisera benutzt.

$Na_2HPO_4 \cdot 12\ H_2O$	2,7 g
$NaH_2PO_4 \cdot 2\ H_2O$	0,4 g
NaCl	8,0 g
Destilliertes Wasser	1 l

Die Substanzen auflösen und den pH-Wert prüfen. Nach Bedarf aliquotieren.

Durch 15minütiges Autoklavieren bei 121 °C sterilisieren.

IF-Puffer-Tween

Dieser Puffer wird zum Waschen von Objektträgern verwendet. 0,1 % Tween 20 zum IF-Puffer geben.

0,1 M phosphatgepuffertes Glycerin, pH 7,6

Dieser Puffer wird zur Erhöhung der Fluoreszenz als Einbettungsmittel auf den Feldern des IF-Objektträgers verwendet.

$Na_2HPO_4 \cdot 12\ H_2O$	3,2 g
$NaH_2PO_4 \cdot 2\ H_2O$	0,15 g
Glycerin	50 ml
Destilliertes Wasser	100 ml

Anlage 4

Bestimmung des Kontaminationsgrads im IF-Test

Fläche (S) eines Feldes eines Multiwell-Objektträgers

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

wobei D = Durchmesser des Gesamtfeldes. (1)

Fläche (s) des Objektivfeldes

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

wobei d = Durchmesser des Objektivfeldes. (2)

d entweder durch direktes Messen oder aufgrund der folgenden Formeln ermitteln:

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

wobei i = Feldkoeffizient (hängt vom Okulartyp ab und variiert zwischen 8 und 24),

K = Tubuskoeffizient (1 oder 1,25),

G = (100fache, 40fache usw.) Vergrößerung des Objektivs.

Von (2)

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

Von (3)

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

Anzahl der typischen fluoreszierenden Zellen je Feld (c) zählen.

Anzahl der typischen fluoreszierenden Zellen je Gesamtfeld (C) berechnen.

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

Anzahl der typischen fluoreszierenden Zellen je ml Pellet (N) berechnen.

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

wobei y = Volumen des Pellets auf dem Objektträgerfeld,

F = Pelletverdünnungsfaktor.

Anlage 5

Material für den ELISA-Test

2 × Carbonat-Beschichtungs-Puffer, pH 9,6

Na_2CO_3	6,36 g
$NaHCO_3$	11,72 g
Destilliertes Wasser	1 l

Die Substanzen auflösen und den pH-Wert messen. Nach Bedarf aliquotieren.

Durch 15minütiges Autoklavieren bei 121 °C sterilisieren.

Wenn der Extrakt einen hohen Anteil aromatischer Moleküle enthält, kann Natriumsulfit mit einer Endkonzentration von 0,2 % als Antioxidationsmittel zugegeben werden.

10 × phosphatgepufferte Kochsalzlösung (PBS), pH 7,4

NaCl	80 g
KH_2PO_4	2 g
$Na_2HPO_4 \times 12H_2O$	29 g
KCl	2 g
Destilliertes Wasser	1 l

Die Substanzen auflösen und den pH-Wert messen. Nach Bedarf aliquotieren.

Durch 15minütiges Autoklavieren bei 121 °C sterilisieren.

Phosphatgepufferte Kochsalzlösung-Tween (PBS-T)

10 × PBS	100 ml
10 % Tween 20	5 ml
Destilliertes Wasser	895 ml

(Antikörper)-Blockierungs-Puffer (muß frisch angesetzt werden)

10 × PBS	10 ml
Polyvinylpyrrolidon-MG 44.000 (PVP-44)	2 g
10 % Tween 20	0,5 g
Milchpulver	0,5 g
Destilliertes Wasser	auf 100 ml

Alkalische Phosphatase-Substratlösung, pH 9,8

Diethanolamin	97 ml
Destilliertes Wasser	800 ml

Mischen und mit konzentrierter HCl auf pH 9,8 einstellen.

Mit destilliertem Wasser auf 1 Liter auffüllen.

0,2 g $MgCl_2$ zugeben.

Je 15 ml Lösung 2 Phosphatase-Substrattabletten (5 mg) (Sigma) auflösen.

Anlage 6

Material für den PCR-Test

Sequenz der Oligonukleotidprimer

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

Reagenzien siehe Seal et al., 1993.

Anlage 7

Material für den Selektivausstrich- und Anreicherungstest

SMSA-Selektivmedium (Engelbrecht, 1994, modifiziert von Elphinstone et al., 1996)

Basismedium	
Casaminosäuren (Difco)	1 g
Bacto-Pepton (Difco)	10 g
Glycerin	5 ml
Agar (Difco)	15 g
Destilliertes Wasser	1 l

In 1-Liter-Kolben 0,5-Liter-Volumen des Mediums zubereiten.

Die Inhaltsstoffe auflösen und den pH-Wert prüfen. Erforderlichenfalls vor dem Autoklavieren auf pH 6,5 einstellen. Pseudomonas solanacearum wächst auf dem Medium bei pH > 7,0 nicht gut.

Durch 15minütiges Autoklavieren bei 121 °C sterilisieren.

Auf 50 °C abkühlen.

Für die angegebenen Endkonzentrationen folgende Inhaltsstoffe (alle von Sigma) zugeben:

Kristallviolett	5 mg/l		
Polymixin-B-Sulfat	100 mg/l	(ca. 600 000 Einheiten)	Sigma P-1004
Bacitracin (*)	25 mg/l	(ca. 1 250 Einheiten)	Sigma P-0125
Chloramphenicol	5 mg/l		Sigma C-3175
Penicillin-G	0,5 mg/l	(ca. 825 Einheiten)	Sigma P-3032
Tetrazoliumsalze	50 mg/l		

Die Inhaltsstoffe in 70%igem Ethanol zu den für das zubereitete Mediumvolumen angegebenen Konzentrationen auflösen. einige Inhaltsstoffe, z. B. Polymixin und Chloramphenicol, müssen leicht erwärmt und geschüttelt werden.

SMSA-BOUILLON (Elphinstone et al., 1996)

Zubereitung wie für SMSA-Selektivmedium, jedoch ohne Agar.

Aliquote von 3 ml in 30-ml-Einweg-Universalröhrchen füllen.

(*) Erforderlichenfalls kann die Kontamination mit saprophytischen Bakterien durch Erhöhung der Bacitracinkonzentration auf 300 ppm verringert werden, ohne daß die Isolierung von Pseudomonas solanacearum beeinträchtigt wird.

Bibliographie

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.