



中华人民共和国国家标准

GB/T 28978—2012

马铃薯环腐病菌检疫鉴定方法

Detection and identification of *Clavibacter michiganensis* subsp. *sepedonicus*

2012-12-31 发布

2013-06-01 实施

中华人民共和国国家质量监督检验检疫总局
中国国家标准化管理委员会 发布

前 言

本标准按照 GB/T 1.1—2009 给出的规则起草。

请注意本文件的某些内容可能涉及专利。本文件的发布机构不承担识别这些专利的责任。

本标准由全国植物检疫标准化技术委员会(SAC/TC 271)提出并归口。

本标准起草单位:中华人民共和国厦门出入境检验检疫局检验检疫技术中心、中华人民共和国福建出入境检验检疫局检验检疫技术中心、中华人民共和国浙江出入境检验检疫局。

本标准主要起草人:廖富荣、林石明、吴媛、沈建国、吴志毅、陈青、张明哲、陈红运、黄蓬英。

马铃薯环腐病菌检疫鉴定方法

1 范围

本标准规定了基于生理生化特性、致病性特征、血清学、分子生物学特征的马铃薯环腐病菌检测和鉴定方法。

本标准适用于马铃薯环腐病菌在马铃薯块茎、植株上的检测与鉴定。

2 规范性引用文件

下列文件对于本文件的应用是必不可少的。凡是注日期的引用文件,仅注日期的版本适用于本文件。凡是不注日期的引用文件,其最新版本(包括所有的修改单)适用于本文件。

SN/T 1135.5—2007 马铃薯环腐病菌检疫鉴定方法

3 马铃薯环腐病菌基本信息

中文名称:密执安棒状杆菌环腐亚种

俗名:马铃薯环腐病菌

拉丁学名:*Clavibacter michiganensis* subsp. *sepedonicus*

属于微杆菌科(Microbacteriaceae)、棒形杆菌属(*Clavibacter*)的成员。

马铃薯环腐病菌(以下简称 Cms)引起马铃薯环腐病,可通过带病的种薯进行远距离传播,也报道可通过番茄等种子传播,关于 Cms 的其他信息参见附录 A。

4 方法原理

马铃薯环腐病菌具有独特的培养性状和生理生化特征,该病菌的生理生化特性、致病性特征,以及血清学、分子生物学特征是制定本标准的主要依据。

5 主要仪器设备

本标准的检测鉴定方法主要使用以下仪器设备:

微量榨汁机、酶标仪、洗板机、微量天平(感量:0.001 g)、生物培养箱、荧光显微镜、PCR 仪、荧光 PCR 仪、电泳仪、水平电泳槽、凝胶成像仪、高速冷冻台式离心机、BIOLOG 自动微生物鉴定系统、浊度计、水浴槽或恒温孵育器、pH 计、各种量程的可调移液器(1 000 μ L、200 μ L、100 μ L、20 μ L、10 μ L、2 μ L)。

6 检测与鉴定

6.1 症状检查

马铃薯环腐病菌侵染马铃薯植株后,在马铃薯块茎、植株上可产生症状(参见附录 A),通过症状检查可以初步判断是否为 Cms 引起的病害。

6.2 表现症状样品中病原菌的分离

6.2.1 培养基的选择

从马铃薯块茎、茎秆、叶片等植物组织中分离病原菌选择用 MTNA 培养基(见 B. 1)或 NCP-88 培养基(见 B. 2),用酵母葡萄糖矿物盐培养基(YGM)(见 B. 3)或葡萄糖营养琼脂(NDA)(见 B. 4)进一步纯化。

6.2.2 分离纯化

按附录 C 给出的方法,从发病的植物组织中分离病原菌。当分离到疑似 Cms 的纯培养后,按 6.4~6.6 给出的方法进行鉴定,然后按 6.7 给出的方法进行致病性测定。

6.3 潜伏侵染样品初筛与分离

6.3.1 样品制备

按附录 D 的给出的方法,每份检测样品取 200 个马铃薯块茎,洗涤去除表面土壤后,切取维管束组织制备马铃薯块茎悬浮液。

6.3.2 初筛检测

利用 DAS-ELISA 方法(按 6.5 给出的方法)对制备马铃薯块茎悬浮液进行初筛检测。如果 DAS-ELISA 检测结果为阳性的,则用 RT-PCR 方法(按 6.6.1 给出的方法)进行验证。

6.3.3 生物学测定

把初筛检测阳性的马铃薯块茎悬浮液接种到感病的茄子上,进行生物学测定(按 6.7 给出的方法)。

6.3.4 分离纯化

按附录 C 给出的方法,把初筛检测阳性的马铃薯块茎悬浮液进行系列稀释(10^{-1} 、 10^{-2} 、 10^{-3}),分别取 100 μ L 涂布到 MTNA 培养基(见 B. 1)或 NCP-88 培养基中(见 B. 2)上进行分离培养。

对疑似 Cms 菌落按 6.4~6.6 给出的方法进行鉴定,然后按 6.7 给出的方法进行致病性测定。

注:分离纯化可以和生物学测定平行进行。

6.4 BIOLOG 鉴定

按附录 E 给出的方法,把疑似 Cms 的纯培养接种到 BUG 培养基(见 B. 7)上富集培养,然后接种到 GEN III 鉴定板上进行鉴定。

6.5 DAS-ELISA 检测

对于表现症状的植物组织样品,按 1:10 的比例(质量:体积)在检测样品中加入样品提取缓冲液(见 B. 10),研磨成匀浆后,离心,上清液作为检测样品。

对于已分离纯化的细菌纯培养,用样品提取缓冲液(见 B. 10)制备约 10^6 CFU/mL 的菌悬液作为检测样品。

对于潜伏侵染的植物组织样品,制成样品悬浮液后(见附录 D),用样品悬浮液进行检测。

按试剂操作说明书或按 SN/T 1135.5—2007 中 5.2 给出的试验方法。用 Cms 已知菌株作阳性对照,并设置相应的阴性对照。

6.6 分子生物学检测

6.6.1 PCR 检测

本标准提供多个检测 Cms 的 PCR 方法,任意选用其中一种 PCR 法进行检测,按 F.1 和 F.2 给出的方法。用 Cms 已知菌株作阳性对照,并设置相应的阴性对照和空白对照。

6.6.2 实时荧光 PCR 检测

本标准提供 2 个检测 Cms 的实时荧光 PCR 方法,任意选用其中一种方法进行检测,按 F.1 和 F.3 给出的方法。用 Cms 已知菌株作阳性对照,并设置相应的阴性对照和空白对照。

6.7 致病性测定

按附录 G 给出的方法,把培养 3 d 的纯培养物制备成约 10^5 CFU/mL 菌悬液,接种到 5~10 株茄子幼苗的茎秆上。用新鲜配制的马铃薯环腐病菌已知菌株制备成约 0^5 CFU/mL~ 10^6 CFU/mL 的菌悬液作为阳性对照,接种 5 株茄子幼苗。用无菌水作为阴性对照,接种 5 株茄子幼苗。

7 结果判定与报告

7.1 结果判定

7.1.1 当 BIOLOG 检测或 DAS-EILS 检测或分子生物学检测(PCR 方法或实时荧光 PCR 方法),其中两种基于不同原理的方法检测结果为阳性、且致病性测定为阳性时,判定为马铃薯环腐病菌。

7.1.2 当 DAS-EILSA 检测或分子生物学检测(PCR 方法或实时荧光 PCR 方法)初筛检测结果为阴性,或只有其中一种检测方法结果为阳性时,判定为非马铃薯环腐病菌。

7.2 结果记录与保存

7.2.1 记录各项实验数据,包括样品种类、来源,检测时间、地点、方法和结果等。DAS-ELISA 检测结果保存吸光值的数据报告,PCR 检测结果保存电泳照片,实时荧光 PCR 检测结果保存采集的数据。

7.2.2 检出马铃薯环腐病菌的马铃薯块茎、茎秆、或叶片等样品,在超低温冰箱中保存,以备复核;分离纯化的马铃薯环腐病菌保存到超低温冰箱中,或冻干后低温保存。

附 录 A

(资料性附录)

马铃薯环腐病菌相关信息

A.1 名称与分类地位

中文名称:密执安棒形杆菌马铃薯环腐亚种、密执安棒形杆菌环腐亚种、密执安棍状杆菌环腐亚种

拉丁名称: *Clavibacter michiganensis* subsp. *sepedonicus* (Speckermann & Kotthof, 1914) Davis, Gillaspie, Vidaver & Harris 1984.

同物异名: *Corynebacterium michiganensis* subsp. *sepedonicum* (Speckermann & Kotthof, 1914) Carlson & Vidaver, 1982; *Corynebacterium michiganensis* pv. *sepedonicum* (Speckermann & Kotthof, 1914) Dye & Kemp 1977; *Corynebacterium sepedonicum* (Speckermann & Kotthof, 1914) Skaptason & Burkholder 1942.

俗 称:马铃薯环腐病菌

英文名称:Potato ring rot; bacterial ring rot of potato; ring rot of potato; vascular potato wilt

英文缩写:CMS 或 Cms

分类地位:细菌界(Bacteria),厚壁菌门(Firmicutes),放线菌纲(Actinobacteria),放线菌亚纲(Actinobacteridae),放线菌目(Actinomycetales),微球菌亚目(Micrococccineae),微杆菌科(Microbacteriaceae),棒形杆菌属(*Clavibacter*)

A.2 症状特征

A.2.1 马铃薯块茎

A.2.1.1 马铃薯块茎上的症状

块茎外部症状不明显,但横切后可看到维管束变为乳黄色以至黑褐色,重病薯维管束变色部分可连成一圈、成环状,严重时皮层与髓部可以脱离。腐烂通常是从顶端的维管组织到块茎的中心皮层逐步发展的。用手挤压切开的病薯,可看到维管束部分有乳白色或黄色菌液流出。经越冬贮藏的病薯,芽眼干枯变黑或外表开裂。在病害晚期,由于次生菌的进一步侵染,维管束也可变黑并腐烂。

A.2.1.2 与青枯病(褐腐病)的区别

与茄科劳尔氏菌(*Ralstonia solanacearum*)引起的青枯病(褐腐病)区别在于:在病害早期,马铃薯环腐病腐烂组织通常保持乳白色、具粘稠的奶酪状特征,而马铃薯褐腐病腐烂组织呈褐色、更加粘稠、软泥状。

A.2.1.3 与黑茎病的区别

与胡萝卜软腐欧文氏菌马铃薯黑胫亚种(*Erwinia carotovora* subsp. *atroseptica*)引起的黑茎病区别在于:黑茎病在块茎上腐烂成粘团状,腐烂始于脐部,呈放射状向髓部扩展,病部黑褐色,横切可见维管束亦呈黑褐色,用手压挤皮肉不分离,湿度大时,薯块变为黑褐色,腐烂发臭。

A.2.2 马铃薯植株

A.2.2.1 马铃薯植株上的症状

在田间,马铃薯环腐病在植株上的症状有时很少被发现,经常只出现在季节的末期。该症状很容易被其他病害、衰老或机械损伤等混淆,所以在现场检验时很容易被遗漏。马铃薯环腐病引起萎蔫症状很少出现,只是叶片和块茎变小,偶尔植株矮化。环腐病引起萎蔫通常是缓慢的,最初只局限于叶缘。感染的嫩叶经常依旧展开,造成不成对的叶片。受侵染的叶片木质部堵塞,经常在脉间区域产生褪绿、黄色到橙色,进一步向下影响到茎秆。受感染的小叶、叶片、甚至茎秆,最终可能死亡。

A.2.2.2 与其他病害的区别

茄科劳尔氏菌、胡萝卜软腐欧文氏菌胡萝卜软腐亚种、胡萝卜软腐欧文氏菌马铃薯黑胫亚种(*E. carotovora* subsp. *atroseptica*)、菊欧文氏菌(*E. chrysanthemi*)、孔状短小茎点霉(*Phoma exigua* var. *foveata*)等系统性病原也可以引起萎蔫症状,与马铃薯环腐病菌引起的萎蔫症状的区别是:

- 菊欧文氏菌侵染可以使茎秆变黑,而马铃薯环腐病菌不会使茎秆变黑。
- 其他几种病菌引起的萎蔫症状是使整个叶片或整个植株快速萎蔫,而马铃薯环腐病菌不会引起快速萎蔫。

A.3 寄主范围

在自然条件下,只侵染马铃薯(*Solanum tuberosum*)。甜菜(*Beta vulgaris*)被认为也是该病菌的自然寄主,但不表现症状。人工接种可以侵染西红柿(*Lycopersicon esculentum*)、茄子(*Solanum melongena*)、醋栗番茄(*Lycopersicon pimpinellifolium*)等茄科(*Solanaceae*)植物,并都表现症状。

A.4 分布

欧洲:奥地利、白俄罗斯、塞浦路斯、捷克共和国、丹麦、爱沙尼亚、芬兰、德国、希腊、拉脱维亚、立陶宛、荷兰、挪威、波兰、罗马尼亚、俄罗斯、斯洛伐克、瑞典、乌克兰、英国。

亚洲:中国、日本、哈萨克斯坦、韩国、朝鲜、尼泊尔、乌兹别克斯坦。

非洲:阿尔及利亚。

北美洲:加拿大、美国。

A.5 形态特征

菌体棍棒状,球形,或卵圆形,单生或双呈“V”形,有时排列成栅栏状,大小($0.4\ \mu\text{m}\sim 0.6\ \mu\text{m}$) $\times$ ($0.8\ \mu\text{m}\sim 1.2\ \mu\text{m}$)。不产生芽孢,无荚膜,无鞭毛,不能运动。该病菌革兰氏呈阳性,老龄菌易变为阴性。

A.6 培养性状

该病菌生长最低温度 $1\ ^\circ\text{C}\sim 2\ ^\circ\text{C}$,最高温度 $31\ ^\circ\text{C}\sim 33\ ^\circ\text{C}$,生长最适温度为 $20\ ^\circ\text{C}\sim 23\ ^\circ\text{C}$,在温度 $55\ ^\circ\text{C}$ 条件下经10 min致死,生长最适pH值为8.0~8.4。该病菌具有生理分化现象。

A.7 生理生化特性

马铃薯环腐病菌的生理生化特征见表 A.1。

表 A.1 用于马铃薯环腐病菌鉴定的营养和生理性状特征

测试	反应
氧化发酵测试(Oxidative and fermentative test, O/F)	惰性的或微弱的氧化反应
氧化酶测试(Oxidase test)	—
过氧化氢酶测试(Catalase test)	+
硝酸还原反应(Nitrate reduction)	—
脲酶活性(Urease activity)	—
H ₂ S 的产生(H ₂ S production)	—
吲哚的产生(Indole production)	—
柠檬酸利用(Citrate utilization)	—
淀粉水解(Starch hydrolysis)	—或微弱
纤维素酶活性(Cellulase activity)	+或微弱
37℃下生长(Growth at 37℃)	—
7% 氯化钠下生长(Growth in 7% NaCl)	—
凝胶水解(Gelatin hydrolysis)	—
秦皮素苷水解(Aesculin hydrolysis)	+
甘油产酸(Acid from glycerol)	—
乳糖产酸(Acid from lactose)	—或微弱
鼠李糖产酸(Acid from rhamnose)	—
水杨甙产酸(Acid from salicin)	—
注：+为阳性反应，—为阴性反应。	

A.8 侵染途径

A.8.1 带菌种薯是主要的初侵染源，采用切块播种时，切刀传病是扩大再侵染的主要途径。切一刀病薯的切刀能传染 24~40 个健薯。病菌从伤口侵入，潮湿时也可从皮孔侵入。

A.8.2 病菌可以在盛放种薯的容器上存活，这些容器也是薯块感病的来源之一。

A.8.3 环腐病细菌在土壤中不能长期存活，当年收获遗留田间的病薯不能成为次年初侵染源。

A.8.4 灌溉水或雨水也可将病薯腐烂释放出来的细菌传到健薯或健株根茎上。

A.8.5 带菌种薯的细菌随养分和水分的流动沿维管束依次向上进入新芽、茎、叶柄和叶内，形成系统侵染。病菌破坏输导组织，阻塞养分和水分的流通，造成地上部分卷叶、矮化和萎蔫。当匍匐茎长出时，病菌又沿匍匐茎的维管束进入新生薯块，但种子不带菌。

A.8.6 病害发生的最适温度 18℃~24℃，16℃以下症状出现少，当土温超过 31℃时，细菌生长受抑制，病害发生轻。

附录 B
(规范性附录)
培养基及缓冲液的配制

B.1 MTNA 培养基

酵母提取物 2.0 g;甘露醇 2.5 g; K_2HPO_4 0.25 g; KH_2PO_4 0.25 g;NaCl 0.05 g; $MgSO_4 \cdot 7H_2O$ 0.1 g; $MnSO_4 \cdot H_2O$ 0.015 g; $FeSO_4 \cdot 7H_2O$ 0.005 g;琼脂 (Oxoid no.1) 16.0 g;蒸馏水加至 1.0 L。溶解,调整 pH 值到 7.2。

高压灭菌后(121 °C,15 min),冷却至 50 °C,加入抗生素:三甲氧苄二氨嘧啶 0.06 g,萘啶酸 0.002 g,两性霉素 B 0.01 g。

抗生素保存溶液:三甲氧苄二氨嘧啶(5 mg/mL)和萘啶酸(5 mg/mL)保存在 96 %的甲醇中,两性霉素 B(1 mg/mL)保存在二甲基亚砷中。保存溶液用无菌过滤器过滤。

基础培养基保质期 3 个月。当加入抗生素后,保存在冰箱中的培养基保质期 1 个月。

B.2 NCP-88 培养基

营养琼脂 23 g;酵母提取物 2.0 g;D-甘露醇 5 g; K_2HPO_4 2 g; KH_2PO_4 0.5 g; $MgSO_4 \cdot 7H_2O$ 0.25 g;蒸馏水加至 1.0 L。溶解,调整 pH 值到 7.2。

高压灭菌后(121 °C,15 min),冷却至 50 °C,加入抗生素:多粘菌素 B 0.003 g,萘啶酸 0.008 g,放线菌酮 0.2 g。

把抗生素溶解在保存溶液中:萘啶酸保存在 0.01 mol/L 的 NaOH,放线菌酮在 50 %乙醇中,多粘菌素 B 在蒸馏水中。保存溶液用无菌过滤器过滤。

基础培养基保质期 3 个月。当加入抗生素后,保存在冰箱中的培养基保质期 1 个月。

B.3 酵母矿物盐培养基(Yeast glucose mineral salts medium, YGM)

Bacto 酵母提取物 2.0 g;D(+)葡萄糖(一水合物)2.5 g; K_2HPO_4 40.25 g; KH_2PO_4 0.25 g; $MgSO_4 \cdot 7H_2O$ 0.1 g; $MnSO_4 \cdot H_2O$ 0.015 g;NaCl 0.05 g; $FeSO_4 \cdot 7H_2O$ 0.005 g;Bacto 琼脂 18 g;蒸馏水加至 1.0 L。

溶解,0.5 L 体积的培养基在 115 °C 下高压灭菌 20 min。

B.4 葡萄糖营养琼脂(Nutrient dextrose agar, NDA)

含有 1 % D(+)葡萄糖(一水化物)的 Difco bacto 营养琼脂¹⁾。115 °C 下高压灭菌 20 min。

1) Difco bacto 营养琼脂是由 Difco 提供的产品的商品名。给出这一信息是为了方便本标准的使用者,并不表示对该产品的认可。如果其他等效产品具有相同的效果,则可使用这些等效产品。

B.5 改良 YGM 培养基(YGM-modified)

酵母提取物 2.0 g; K_2HPO_4 0.25 g; KH_2PO_4 0.25 g; $MgSO_4 \cdot 7H_2O$ 0.1 g; $MnSO_4 \cdot H_2O$ 0.15 g; NaCl 0.05 g; $FeSO_4 \cdot 7H_2O$ 0.005 g; 溴百里酚蓝 0.05 g; 蒸馏水加至 1.0 L。在 115 °C 下高压灭菌 20 min。

B.6 NBY 培养基

营养琼脂 23 g; 酵母提取物 2.0 g; KH_2PO_4 0.5 g; K_2HPO_4 2.0 g; $MgSO_4 \cdot 7H_2O$ 0.25 g; D(-) 甘露醇 5.0 g; 蒸馏水加至 1.0 L。在 115 °C 下高压灭菌 20 min。

B.7 BUG 培养基, pH 7.3

称取 57 g 的 BUG 琼脂培养基粉末(BIOLOG 公司)²⁾ 到 1 000 mL 蒸馏水或去离子水中, 煮沸溶解; 冷却后(25 °C)调整 pH 值至 7.3 ± 0.1 。121 °C 灭菌 15 min; 冷却至 45 °C~50 °C, 分装至培养皿中。

B.8 50 mmol/L 磷酸缓冲液, pH 7.0

该缓冲液用于植物组织中细菌的提取。

Na_2HPO_4 (无水) 4.26 g; KH_2PO_4 2.72 g; 蒸馏水加至 1.00 L。溶解, 调 pH 值至 7.0, 在 121 °C 下高压灭菌 15 min。

以下试剂对于细菌提取可能是有益的: Lubrol flakes(抗絮凝剂) 0.5 g; DC silicone antifoam(防沫剂) 1.0 mL; 焦磷酸四钠(抗氧化剂) 1.0 g; 聚乙烯吡咯烷酮 40 000(PVP-40)(PCR 抑制物的结合物) 50 g。

B.9 10 mmol/L 磷酸缓冲液, pH 7.2

该缓冲液用于马铃薯块茎顶部提取物离心浓缩后重新悬浮和稀释。

$Na_2HPO_4 \cdot 12H_2O$ 2.7 g; $NaH_2PO_4 \cdot 2H_2O$ 0.4 g; 蒸馏水加至 1.0 L。溶解, 调 pH 值至 7.2, 在 121 °C 下高压灭菌 15 min。

B.10 样品提取缓冲液, pH 7.4

Na_2SO_3 1.3 g; PVP(MW 24 000~40 000) 20.0 g; Na_2N_3 0.2 g; Tween-20 20 mL, 溶于 1 L 的 1× PBST(见 B.11), 调 pH 到 7.4。

B.11 1×PBST, pH 7.4

NaCl 8.0 g, KH_2PO_4 0.2 g, Na_2HPO_4 1.15 g, KCl 0.2 g, NaN_3 0.2 g, 加入 900 mL 蒸馏水溶解, 用 NaOH 或 HCl 调节 pH 值到 7.4, 然后加水至 1 L。

然后向上述溶液中加入 0.5 mL 的 Tween-20。

2) BUG 培养基粉末是由 BIOLOG 公司提供的商品名。给出这一信息是为了方便本标准的使用者, 并不表示对该产品的认可。如果其他等效产品具有相同的效果, 则可使用这些等效产品。

附 录 C
(规范性附录)

植物组织中病原菌的分离纯化

C.1 表现症状样品的制备

C.1.1 从表现症状的马铃薯块茎维管束环或者茎秆或叶片的维管束等检测样品中去除腐烂或褪绿组织(如果需要,使用70%乙醇进行表面消毒)。

C.1.2 加入少量的蒸馏水或50 mmol/L的磷酸缓冲液(见B.8)悬浮,或研磨样品。

C.1.3 每个检测样品从 10^{-2} 稀释到 10^{-4} 。

C.2 潜伏侵染样品的制备

C.2.1 按附录D给出的方法,从未表现症状的马铃薯块茎样品中制备马铃薯块茎悬浮液。

C.2.2 把马铃薯块茎悬浮液进行系列稀释(10^{-1} 、 10^{-2} 、 10^{-3})。

C.3 病原菌的分离培养

C.3.1 方法一

C.3.1.1 分别取100 μ L系列稀释的样品悬浮液,涂布到MTNA培养基(见B.1)或NCP-88培养基中(见B.2)。

C.3.1.2 利用Cms已知的菌株(如NCPPB 4053)制备成 10^6 CFU/mL的菌悬液作为阳性对照,进行10倍系列稀释,并涂布到MTNA培养基或NCP-88培养基中。

C.3.2 方法二

C.3.2.1 用涂布器把最初100 μ L马铃薯检测样品涂布到第一块MTNA培养基或NCP-88培养基平板上,然后把该涂布器使用到第二块琼脂平板上,用涂布器上的残留物进行划线。最后,在第三块琼脂平板上重复,通过涂布器产生一个有效稀释。

C.3.2.2 利用Cms已知的菌株(如NCPPB 4053)制备成 10^6 CFU/mL的菌悬液作为阳性对照。

C.3.3 培养与检查

C.3.3.1 平板在黑暗中、21 $^{\circ}$ C~23 $^{\circ}$ C下培养。Cms最适宜的生长温度21 $^{\circ}$ C,28 $^{\circ}$ C将对生长造成伤害。

C.3.3.2 3 d后检查平板,并与阳性对照比较,然后在5 d、7 d和10 d后观察平板。

注:从植物组织上分离通常需要10 d。

C.3.3.3 在平板过分生长之前,也就是在3 d~5 d之后,观察是否有疑似菌落。

C.4 病原菌的纯化

把Cms疑似菌落转移到YGM培养基(见B.3)上培养、纯化,通常重复2~3次。用菌落放光灯观察菌落形态,确保疑似菌落已纯化。

附 录 D

(规范性附录)

潜伏侵染的马铃薯块茎样品的制备

D.1 洗涤

把 200 个马铃薯块茎放在自来水下冲洗,去除薯块表面土壤,晾干。

D.2 块茎顶部维管束组织的切取

用解剖刀(或其他合适的工具),去除每个马铃薯块茎块茎顶端部分的表皮,切下块茎顶部,并尽可能挖除块茎顶部上圆锥形的非维管束组织,保留块茎顶部的维管束组织。解剖刀通过在 70%酒精浸泡后、燃烧消毒。

注:切下的块茎顶部最好立即处理,或在 24 h 内处理。否则,保存在 $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$ 中,但不要超过 2 周。

D.3 马铃薯块茎悬浮液的制备

D.3.1 在块茎顶部的维管束组织中加入约 40 mL、50 mmol/L 的磷酸缓冲液(pH 7.0)(见 B.8),在摇床上(50 r/min~100 r/min)、低于 $24\text{ }^{\circ}\text{C}$ 下搅动 4 h 或 $4\text{ }^{\circ}\text{C}$ 下放置 16 h~24 h。

注:也可以把块茎顶部的维管束组织放入搅拌机中粉碎;或者放入密封样品塑料袋中压碎。

D.3.2 轻轻倒出上清液,在 $4\text{ }^{\circ}\text{C}$ ~ $10\text{ }^{\circ}\text{C}$ 下 7 000 g 离心 15 min(或 10 000 g 离心 10 min),倒掉上清液。

注:如果极其混浊,在低速下离心澄清(低于 180 g 离心 10 min, $4\text{ }^{\circ}\text{C}$ ~ $10\text{ }^{\circ}\text{C}$);然后把上清液进一步离心。

D.3.3 在沉淀中加入 1 mL 无菌的 10 mmol/L 磷酸缓冲液(pH 7.2)(见 B.9),把沉淀重新悬浮,即为马铃薯块茎样品悬浮液。

D.3.4 把制备的样品悬浮液分成相等的两份:一份用于检测鉴定,另一份加入无菌的甘油至终浓度为 10%~25%(体积分数)并保存在 $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$ 冰箱中备用。

附录 E (规范性附录)

BIOLOG 微生物自动鉴定系统鉴定

E.1 细菌的纯培养

把经分离纯化的纯培养(见附录 C),用 BIOLOG 微生物自动鉴定系统进行鉴定。通过菌落放大大灯观察菌落形态确认为纯培养物。

E.2 纯培养的富集培养

采用“+”字交叉法画线,将纯化的培养物接种到 BUG 培养基上(见 B.7),在 21℃~23℃下培养 16 h~24 h。

E.3 菌悬液的制备

E.3.1 先关掉浊度计的开关,调整指针到 0% T。用吸水纸擦干净接种液 IF-A³⁾ 的试管外壁。打开浊度计的开关,将 IF-A 空白液置于浊度仪中,调整指针至 100% T。用标准浊度液(85% T Turbidity Standard、或 65% T Turbidity Standard)检查浊度仪的准确性。

E.3.2 观察培养 16 h~24 h 后或更长时间的培养基纯培养平板外观,用记号笔在准备鉴定的菌落背面作好标记,标记 1~3 个菌落。

E.3.3 取无菌棉签粘取 1 个准备鉴定的菌落(注意不要带出培养基)。

E.3.4 将无菌棉签小心插入上述 IF-A 接种液的试管中。首先将无菌棉签沿试管内壁旋转几圈,将菌落转至试管内壁,然后用无菌棉签上下划动,并转动试管,将菌落均匀分散。

E.3.5 将试管置于试管架上静置 5 min,然后用浊度计测量浊度值。如果浊度值不在 90%~98% T 范围内,通过添加菌体或空白接种液把浊度值调整到预定的浊度值范围内,最佳为 94% T。

E.3.6 把调整好浓度的菌悬液用于下一步接种使用。

E.4 GEN III 鉴定板的接种与培养

E.4.1 从 4℃冰箱中取出 96 孔 GEN III 微孔板⁴⁾,放置在工作台上,使之达到室温。

E.4.2 将制备好的菌悬液倾入 V 型加样槽中。保留约 1 mL 菌悬液在试管中,不要倾入加样槽。

E.4.3 用八道移液器吸取菌悬液到 GEN III 鉴定板中,每孔加 100 μL 菌悬液。然后室温下静置 10 min 左右。

注:加样需小心,不要溅出,以避免污染;接种时间不得超过 20 min。

E.4.4 将鉴定板放入密闭的盒或袋中(为防止水分蒸发,可加入湿的纸团或纱布),在 30℃培养箱中培养 4 h~24 h。

3) IF-A 是由 BIOLOG 公司提供的商品名。给出这一信息是为了方便本标准的使用者,并不表示对该产品的认可。如果其他等效产品具有相同的效果,则可使用这些等效产品。

4) GEN III 微孔板是由 BIOLOG 公司提供的商品名。给出这一信息是为了方便本标准的使用者,并不表示对该产品的认可。如果其他等效产品具有相同的效果,则可使用这些等效产品。

E.5 上机读数

E.5.1 打开计算机并打开应用软件“MicroStation/MicroLog 3”,并打开读数仪电源(MicroStation)。

E.5.2 点击“Setup”标签,在“Reader”标签下选择读数仪的型号(MicroStation 1 或 MicroStation 2),点击“initialize reader”按钮,当“Com Port”显示“Open”,下方显示“Ready”时,仪器初始化完毕。另外,在“Program Options”标签下设置显示信息、在 Database 标签下设置数据库。

E.5.3 点击“Read”标签,选择“Read Setup”标签,设置输入、输出模式。如在 Input Mode 下列菜单中选择“Reader”,Use Batch 下列菜单中选择“No”;在 Automatic Print-out 下列菜单中选择“Yes”可以自动打印结果,否则选“No”;在“Save To Data File”下列菜单中选择“Yes”,点击等号后的“Date File Name”,输入文件名称及保存的路径,不保存数据则选“No”。

E.5.4 点击右上角的“Read New Plate”按钮,显示“Plate Information”。在下列区域输入样品识别信息:

- Project:输入 3 个字母的计划信息;
- Plate Number:输入微孔板数量(可选项);
- Plate Type:下列菜单中选择微孔板类型“GEN III”;
- Protocol:下列菜单中选择程序“A”;
- Incubation Hours:输入微孔板孵育时间。

E.5.5 在放置微孔板前,用软棉布或纸擦拭微孔板的底部,以去除底部的指纹及污染。

E.5.6 把微孔板放入读数仪的样品架内,取下微孔板盖,并确认 A1 孔在左上角,合上读数仪样品腔的盖子。

E.5.7 点击“Read”按钮开始读数,结果将显示在“Read Information”内。

E.6 结果判定

一般观察孔出现紫色较多的时候便可以开始上机读数(一般在 8 h 以后),24 h 基本可以确定结果,根据以下显示结果判定:

- 当结果显示“No ID Yet”,或显示 Species ID 但非 *Clavibacter michiganensis* subsp. *sepedonicus* 时,则 BIOLOG 检测结果为阴性;
- 当 PROB 接近或等于 1、SIM>0.75、DIS<5.0,且结果显示为“Species ID:*Clavibacter michiganensis* subsp. *sepedonicus*”时,则 BIOLOG 检测结果为阳性。

E.7 注意事项

使用 MicoStation 鉴定过程中,应注意以下几点:

- 用于鉴定的菌株应完全纯化,并利用特定培养基经几次转代培养保证微生物的活性;
- 应在无菌环境下操作,以避免污染;
- 尽量使用一次性玻璃器皿,以避免残留的清洁剂对结果造成影响;
- 用于鉴定的 GEN III 微孔板,使用前都应预热,使之达到室温;
- 浊度仪每次使用前都应校正;
- 用于接种的菌悬液浓度应用浊度仪进行测量,使菌悬液浓度位于特定浓度范围;
- 制备菌悬液时,一定不要将培养基挑进去;
- 从打开铝箔袋把微孔板暴露在空气中,到接种完成,在 20 min 以内完成。

附 录 F

(规范性附录)

分子生物学检测

F.1 DNA 模板的制备

F.1.1 快速制备法

F.1.1.1 马铃薯块茎悬浮液

按照以下方法从马铃薯块茎悬浮液中提取 DNA:

- 吸取 100 μL 悬浮液到 1.5 mL 的离心管中,并盖上盖子;
- 13 000 r/min 离心 3 min;
- 倒掉上清液,放入 100 μL 的 50 mmol/L NaOH 溶液;
- 在加热槽或水浴中($>95\text{ }^{\circ}\text{C}$)加热 10 min~15 min;
- 把样品转移到冰上冷却;
- 在 PCR 或实时荧光 PCR 反应前,用磷酸缓冲液稀释 10 倍;
- 取 2 μL 用于 PCR 或实时荧光 PCR 反应。

F.1.1.2 纯培养

按照以下方法从分离纯化的纯培养中提取 DNA:

- 用超纯水制备大约 10^6 CFU/mL 的菌悬液;
- 取 100 μL 菌悬液到 1.5 mL 的离心管中,并盖上盖子;
- 13 000 r/min 离心 3 min;
- 在加热槽或水浴中 $100\text{ }^{\circ}\text{C}$ 加热 4 min;
- 在冰上冷却后,用于 PCR 或实时荧光 PCR 反应。

F.1.2 总 DNA 的常规制备

根据不同的样品类型,选择合适的 DNA 提取方法:

- 对于分离纯化的纯培养,推荐使用革兰氏阳性菌 DNA 提取方法提取 DNA。
- 对于具有症状的马铃薯块茎、叶片或茎秆等植物组织,从病斑上取 0.1 g 的植物组织,研磨后,使用植物 DNA 提取方法或其他商用的 DNA 提取试剂盒提取总 DNA。
- 对于无症状的马铃薯块茎样品,取 100 μL 样品悬浮液(见附录 C)提取 DNA。

F.2 PCR 检测

F.2.1 引物及序列

目前,有多对可用于特异性检测的 PCR 引物,引物及序列见表 F.1。另外,引物 NS-7-F(5'-gag-gcaataacaggtctgtgatgc-3')和 NS-8-R(5'-tccgcaggttcacctacgga-3')是用于扩增植物内 18S rRNA 基因的引物,可作为 PCR 内对照,从马铃薯、茄子和番茄中扩增的 DNA 片段大小为 377 bp。

表 F.1 用于马铃薯环腐病菌 PCR 检测的特异引物及序列

引物名称	引物序列(5'-3')	扩增大小	目的基因	参考文献
PSA-1	ctccttgtggggtgggaaaa	502 bp	IGS ^a	[9]
PSA-R	tactgagatgtttcacttcccc			
CMSIF1	tgtactcggccatgacgttgg	1 066 bp	IS1121 ^b	[10]
CMSIR1	tactgggtcatgacgttgggt			
CMSIF2	tcccacggtaatgctcgtctg	885 bp	IS1121	[10]
CMSIR2	gatgaaggggtcaagctgggtc			
CmsSp1f	ccttgtggggtgggaaaa	215 bp	IGS	[11]
CmsSp5r	tgtgatccaccgggtaaa			
Cms50F	gagcgcgatagaagaggaactc	193 bp	Cms50 ^c	[12]
Cms50R	cctgagcaacgacaagaaaaatag			
Cms72aF	ctactttcgcggttaagcagtt	213 bp	Cms72 ^c	[12],[13]
Cms72aR	gcaagaatttcgtctctatcc			

^a 16S-23S rRNA 基因间隔区(Intergenic spacer region of the 16S-23S rRNA genes)。

^b pCS1 质粒及染色体中的插入因子 IS1121(Insertion element IS1121)。

^c Cms 基因组序列中该亚种的特异性序列。

F.2.2 PCR 扩增

25 μL 的反应体积: 2.5 μL 10 $\times$ PCR 缓冲液(含 Mg^{2+}), 0.5 μL 的 dNTP(各 10 mmol/L), 0.5 μL Taq DNA 聚合酶, 上游引物 1 μL (10 $\mu\text{mol/L}$), 下游引物 1 μL (10 $\mu\text{mol/L}$), 2 μL 的 DNA 模板, 17.5 μL 的分子级 H_2O 。在 PCR 仪上完成反应, 反应程序见表 F.2。所有检测样品都需重复一次。

注 1: 当使用由引物 PSA-1/PSA-R 和 NS-7-F/NS-8-R 组成的多重 PCR 方法检测时, 除特异引物外, 还应加入另外一对引物 PSA-1/PSA-R 和 NS-7-F/NS-8-R, 并相应减少 H_2O 的体积, 使总体积为 25 μL 。

注 2: 引物 CMSIF1/CMSIR1 和 CMSIF2/CMSIR2 组成巢式 PCR, 先由 CMSIF1/CMSIR1 扩增后, 再由 CMSIF2/CMSIR2 扩增。

表 F.2 普通 PCR 反应条件

引物对	预变性	反应循环	总延伸
Sp1f/ Sp5r	95 $^{\circ}\text{C}$, 5 min	94 $^{\circ}\text{C}$ 变性 60 s, 62 $^{\circ}\text{C}$ 退火 45 s, 72 $^{\circ}\text{C}$ 延伸 90 s; 共 40 循环	72 $^{\circ}\text{C}$, 7 min
PSA-1/ PSA-R	95 $^{\circ}\text{C}$, 5 min	95 $^{\circ}\text{C}$ 变性 60 s, 64 $^{\circ}\text{C}$ 退火 60 s, 72 $^{\circ}\text{C}$ 延伸 60 s; 共 10 循环 95 $^{\circ}\text{C}$ 变性 30 s, 62 $^{\circ}\text{C}$ 退火 30 s, 72 $^{\circ}\text{C}$ 延伸 60 s; 共 25 循环	72 $^{\circ}\text{C}$, 7 min
Cms50F/ Cms50R	95 $^{\circ}\text{C}$, 5 min	94 $^{\circ}\text{C}$ 变性 45 s, 55 $^{\circ}\text{C}$ 退火 60 s, 72 $^{\circ}\text{C}$ 延伸 10 s; 共 10 循环 94 $^{\circ}\text{C}$ 变性 45 s, 55 $^{\circ}\text{C}$ 退火 40 s, 72 $^{\circ}\text{C}$ 延伸 15 s; 共 40 循环	72 $^{\circ}\text{C}$, 7 min
Cms72aF/ Cms72aR	95 $^{\circ}\text{C}$, 5 min	94 $^{\circ}\text{C}$ 变性 45 s, 60 $^{\circ}\text{C}$ 退火 60 s, 72 $^{\circ}\text{C}$ 延伸 15 s; 共 10 循环 92 $^{\circ}\text{C}$ 变性 45 s, 60 $^{\circ}\text{C}$ 退火 40 s, 72 $^{\circ}\text{C}$ 延伸 20 s; 共 40 循环	72 $^{\circ}\text{C}$, 7 min
CelA-F/ CelA-R ^a	95 $^{\circ}\text{C}$, 5 min	92 $^{\circ}\text{C}$ 变性 30 s, 60 $^{\circ}\text{C}$ 退火 45 s, 72 $^{\circ}\text{C}$ 延伸 30 s; 共 40 循环	72 $^{\circ}\text{C}$, 7 min
CMSIF1/ CMSIR1	95 $^{\circ}\text{C}$, 5 min	94 $^{\circ}\text{C}$ 变性 60 s, 60 $^{\circ}\text{C}$ 退火 60 s, 72 $^{\circ}\text{C}$ 延伸 60 s; 共 35 循环	72 $^{\circ}\text{C}$, 7 min
CMSIF2/ CMSIR2	95 $^{\circ}\text{C}$, 5 min	94 $^{\circ}\text{C}$ 变性 60 s, 60 $^{\circ}\text{C}$ 退火 60 s, 72 $^{\circ}\text{C}$ 延伸 60 s; 共 35 循环	72 $^{\circ}\text{C}$, 7 min

^a 引物序列见表 F.3, 扩增片段大小为 150 bp。

F.2.3 凝胶电泳

PCR产物经1.5%琼脂糖凝胶电泳分析。每个样品取5 μL 的PCR产物与1 μL 的6 $\times$ 上样缓冲液混合均匀,并加到置于0.5 $\times$ TBE缓冲液的1.5%琼脂糖凝胶孔中,然后在120 V下电泳。电泳结束后,在0.5 $\mu\text{g}/\mu\text{L}$ 的溴化乙锭(EB)溶液中染色约5 min,然后在清水中清洗后,在凝胶成像系统中观察,拍照,并保存照片。

F.2.4 PCR检测结果的判定

在阴性对照和空白对照没有产生条带、阳性对照产生预期大小的条带情况下:

- 如果检测样品出现与阳性对照大小一致的条带,则为阳性;
- 如果检测样品未出现与阳性对照大小一致的条带,则为阴性。

F.3 实时荧光PCR检测

F.3.1 引物及探针

使用Taq Man检测系统,引物及探针序列见表F.3。

表 F.3 实时荧光PCR所使用的引物

引物名称	引物序列(5'-3')	终浓度 μmol/L	目的基因	参考文献
CelA-F	tctctcagtcattgtaagatgat	0.75	Cellulase A [*]	[13]
CelA-R	attcgaccgctctcaaa	0.75		
CelA probe ^b	FAM-ttcgggcttcaggagtgctgt-BHQ1	0.16		
Cms 50-2F	cggagcgcgataagaagagga	0.3	Cms50	[14]
Cms 133R	ggcagagcatcgctcagtacc	0.3		
Cms 50-53T ^c	HEX-aaggaagtcgtcggatgaagatgcg-BHQ1	0.2		
注: Taq Man 探针 Cms 50-53T 和 CelA probe 也可以标记其他合适的报告基团和淬灭基团。				
[*] 纤维素酶 A 基因				
^b 探针:5'端标记报告基团 6-carboxy-fluorescein (FAM)(荧光发射最大波长 517 nm),3'端标记标记淬灭基团 BHQ1				
^c 探针:5'端标记报告基团 Hex(荧光发射最大波长 553 nm),3'端标记标记淬灭基团 BHQ1				

F.3.2 实时荧光PCR步骤

25 μL 的反应体积:10 μL 2 $\times$ 定量PCR反应混合液,加入上下游引物及相应的Taq Man探针(使用量见表F.3),2 μL 的DNA模板,ddH₂O补足体积。所有检测样品都需重复一次。反应条件见表F.4。

表 F.4 实时荧光PCR反应条件

引物对及探针	预变性	反应条件
CelA-F/ CelA-R, CelA probe	95 $^{\circ}\text{C}$, 5 min	95 $^{\circ}\text{C}$ 30 s, 60 $^{\circ}\text{C}$ 45 s, 72 $^{\circ}\text{C}$ 32 s, 共 40 循环
Cms 50-2F/ Cms 133R, Cms 50-53T	95 $^{\circ}\text{C}$, 5 min	95 $^{\circ}\text{C}$ 15 s, 64 $^{\circ}\text{C}$ 45 s, 共 40 循环

F.3.3 实时荧光 PCR 结果的判定

在阳性对照 Ct 值 ≤ 34 , 阴性对照和空白对照的 Ct 值 ≥ 40 前提下:

- 如果检测样品的 Ct 值 ≤ 35 时, 则判定为阳性;
- 如果检测样品的 Ct 值 ≥ 40 时, 则判定为阴性;
- 如果 $35 < \text{Ct} < 40$ 时, 则应重新测试。重新测试后, 如果仍然为 $35 < \text{Ct} < 40$, 则判定为阳性。

附 录 G

(规范性附录)

生物学测定

G.1 说明

本附录规定的方法,一方面用于潜伏侵染样品的生物学测定,另一方面用于分离纯化后纯培养的致病性测定。

G.2 测试植物的培育

把感病的茄子种子播种在介质土中,待长到子叶完全展开(约 10 d~14 d),把幼苗转移花瓶中。待幼苗长至 2~3 叶期、第 3 真叶完全展开,用于接种。接种前的 1 d~2 d 不要给茄子浇水,以减少细胞压力。每个样品正常需要 15~25 株的茄子植物。

注:用于生物学测定的茄子应选择感病品种,如“Black Beauty”、“Long Tom”、“Balsa”、“Rima”等。

G.3 接种

G.3.1 接种前准备

在接种前,最好准备一个长宽高为 15 cm×10 cm×5 cm 的盒子,并切开一个可以放置 10 cm 的花瓶开口,用于接种时支撑(参见图 G.1)。

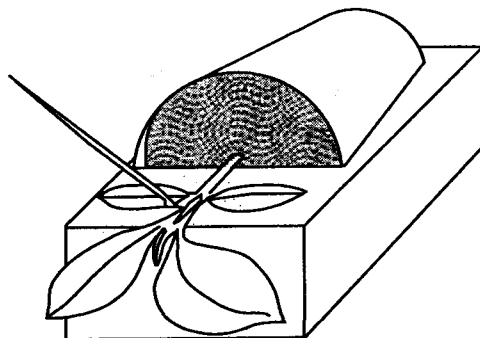


图 G.1 用于支撑及接种测试茄子的装置

G.3.2 切开接种

G.3.2.1 接种检测样品

把马铃薯块茎悬浮液(或菌悬液)接种到茄子苗上,每个样品接种 15~25 株的茄子。具体操作如下:

- 把准备接种的茄子苗水平放在支撑装置中,并在茎杆和盒子间垫上一张无菌的铝箔纸;
- 在茄子子叶和第一片真叶之间的茎杆上,用无菌的解剖刀纵向切开一个长约 0.5 cm~1.0 cm、深约为茎杆直径四分之三的切口;

——或者在茎杆上以约 5° 的斜角进行斜切,切口长约 1.0 cm、深约茎杆直径的三分之二;

注:解剖刀必需在 70% 酒精浸泡后、然后燃烧消毒,以避免交叉污染。

——在切口上加入 1 滴(约 5 μL ~10 μL) 的马铃薯块茎悬浮液(见附录 D),或加入 1 滴约 10^5 CFU/mL 的菌悬液;

——用无菌的凡士林(或用 1:1 配制的石蜡油和凡士林)封住切口。

G.3.2.2 接种对照样品

用已知的 Cms 菌株配制成 10^5 ~ 10^6 的菌悬液,用相同方法接种 5 株的茄子,作为阳性对照。用无菌的 10 mmol/L 磷酸缓冲液(见 B.9),使用相同的接种方法接种 5 株的茄子,作为阴性对照。

G.3.3 注射接种

用无菌的注射器把马铃薯块茎悬浮液(见附录 D)、或用纯培养制备的约 10^5 CFU/mL 的菌悬液注射到子叶上方的茎杆中。

G.4 培养与观察

G.4.1 把接种后的茄子苗放在 18 $^{\circ}\text{C}$ ~24 $^{\circ}\text{C}$ 的温室中,至少培养 4 周,并保证充足的光照(每天光照 16 h)和湿度(最好高于 70%)、以及充足的水分以避免因水分流失或缺少水分而萎蔫。最适宜的温度是 21 $^{\circ}\text{C}$ 。

G.4.2 1 周后定期检查症状,并计算显示症状的植物数量。Cms 在茄子上引起叶片萎蔫,可能开始于叶缘。萎蔫组织可能最初显示暗绿色或斑驳,但在变坏死前转暗淡。脉间萎蔫经常有油脂状的水渍出现,而坏死组织经常有一个明亮的黄色边缘。

G.4.3 一旦症状出现,按附录 C 给出的方法从萎蔫的叶片或茎杆上重新分离。用 70% 酒精擦拭叶片和茎杆进行表面消毒。

G.4.4 用 PCR 等方法对茄子汁液和重新分离的纯培养进行检测验证。或对重新分离的纯培养进行革兰氏染色。

G.4.5 在某些情况下(特别是生长条件不理想情况下),Cms 可能以潜伏侵染形式存在茄子内,甚至在接种 4 周后也没有显示症状。如果观察到 4 周后还没有症状产生,在接种位置的上方切取 1 cm 的茎杆,然后采用 PCR 等方法进行检测。如果检测结果是阳性的,则按附录 C 给出的方法重新分离。

G.5 生物学测定结果的判定

在阳性对照的茄子上显示出典型的症状,并且阴性对照的茄子上没有发现症状:

——如果接种的茄子未显示症状,且 PCR 等方法检测结果为阴性,生物学检测结果则是阴性的;

——如果从接种的茄子上重新分离到 Cms,生物学检测结果则是阳性的。

参 考 文 献

- [1] 程池, 杨梅, 等. Biolog 微生物自动分析系统——细菌鉴定操作规程的研究. 食品与发酵工业, 2006, 32(5): 50-54.
- [2] 东秀珠, 蔡妙英, 等. 常见细菌系统鉴定手册. 北京: 科学出版社, 2001: 267-277.
- [3] OEPP/EPPO. EPPO Standard PM 7/59 (1): *Clavibacter michiganensis* subsp. *sepedonicus*. Bulletin OEPP/EPPO Bulletin, 2006, 36: 99-109.
- [4] de la Cruz AR, Wiese MV & Schaad NW. A semi-selective medium for the isolation of *Clavibacter michiganensis* subsp. *sepedonicus* from potato tissue. Plant Disease, 1992, 75: 830-834.
- [5] Jansing H & Rudolph K. Physiological capabilities of *Clavibacter michiganensis* subsp. *sepedonicus* and development of a semi-selective medium. Journal of Plant Pathology, 1998, 105: 590-601.
- [6] CAB International, 2005. Crop Protection Compendium, 2005 Edition. Wallingford, UK: CAB International. www.cabicompendium.org/cpc.
- [7] Palomo JL, Lopez M M, Garcia-Benavides P, Velazquez E, Martinez-Molina E. Evaluation of the API 50CH and API ZYM systems for rapid characterization of *Clavibacter michiganensis* subsp. *sepedonicus*, causal agent of potato ring rot. European Journal of Plant Pathology, 2006, 115: 443-451.
- [8] Martin J & Beaumanoir N. Comparison of the effectiveness of five extraction methods for *Clavibacter michiganensis* subsp. *sepedonicus* and *Ralstonia solanacearum* from potato tubers. Bulletin OEPP/EPPO Bulletin, 2001, 31: 153-157.
- [9] Dinesen I & De Boer SH. Extraction of *Clavibacter michiganensis* subsp. *sepedonicus* from composite samples of potato tubers. American Potato Journal, 1995, 72: 133-142.
- [10] Pastrok KH. . Detection of *Clavibacter michiganensis* subsp. *sepedonicus* in potato tubers by multiplex PCR with coamplification of host DNA. European Journal of Plant Pathology, 2000, 106: 155-165.
- [11] Lee IM, Bartoszyk IM, Gundersen DE, Mogen B, and Davis R E. Nested PCR for ultrasensitive detection of the potato ring rot bacterium, *Clavibacter michiganensis* subsp. *sepedonicus*. Applied and Environmental Microbiology, 1997, 63: 2625-2630.
- [12] Li X & De Boer SH. Selection of polymerase chain reaction primers from an intergenic spacer region for detection of *Clavibacter michiganensis* subsp. *sepedonicus*. Phytopathology, 1995, 85: 837-842.
- [13] Mills D, Russell B & Hanus JW. Specific detection of *Clavibacter michiganensis* subsp. *sepedonicus* by amplification of three unique DNA sequences isolated by subtraction hybridisation. Phytopathology, 1997, 87: 853-861.
- [14] Gudmestad NC, Mallik I, Pasche JS, Anderson NR, and Kinzer K. A real-time PCR assay for the detection of *Clavibacter michiganensis* subsp. *sepedonicus* based on the cellulase A gene sequence. Plant Dis. , 2009, 93: 649-659.
- [15] Schaad W, Berthier-Schaad Y, Sechler A & Knorr D. Detection of *Clavibacter michiganensis* subsp. *sepedonicus* in potato tubers by BIO-PCR and an automated real-time fluorescence detection system. Plant Disease, 1999, 83: 1095-1100.