

# **STANDAARDPROTOCOL NAKTUINBOUW**

## **Detectie van *Clavibacter michiganensis* subsp. *michiganensis* in tomatenzaad m.b.v. uitplaten**

## 1. Doel

Het aantonen van al dan niet aanwezig zijn van *Clavibacter michiganensis* subsp. *michiganensis* in tomatenzaad m.b.v uitplaten.

## 2. Principe

Een monster van 30.000 zaden wordt verdeeld in drie submonsters van ieder 10.000 zaden. Twee submonsters van 5000 worden afgeteld wanneer 10.000 zaden per partij worden ingestuurd. Eerst worden de zaden geïncubeerd in buffer en gekneusd m.b.v. een stomacher. De geëxtraheerde bacteriën worden geconcentreerd en vervolgens uitgeplaat op twee semi-selectieve voedingsbodems. Verdachte isolaten worden overgezet op YDC. Recovery van Cmm wordt tijdens het uitplaten gemonitord door het spiken van ieder submonster met een gemerkt Cmm (*rif* resistent) isolaat. Wanneer de recovery van de Cmm spike onvoldoende is wordt er geen geldige uitslag afgegeven van een monster.

## 3. Afkortingen

Cmm	Clavibacter michiganensis subsp. michiganensis
Cmm1-Tris100	Tris gebufferd semi-selectief medium
GF-rif	Growth factor medium met rifampicine
SCMF	SCM-fast: semi-selectief medium op basis van SCM
KB	Kings B medium (niet selectief)
YDC	Yeast-Dextrose-CaCO <sub>3</sub> medium (niet selectief)
DKG	Duizend Korrel Gewicht
sPB	Steriele fosfaat buffer
sPBt	Steriele fosfaat buffer met Tween20

## 4. Materialen

ZUM 3059 stock suspensie in 25% glycerol uit -80 °C (ca.  $1,5 \cdot 10^6$  cfu/ml)  
IPO 500, IPO 501 en IPO 542 referentie suspensie in 25% glycerol uit -80 °C (ca.  $1,5 \cdot 10^6$  cfu/ml)  
Interscience BagMixer 400

## 5. Werkwijze

### 5.1 Inzetten en uitplaten monsters

1. Bepaal het DKG van het monster en weeg 10.000 zaden ( 2 x 5.000) of 30.000 ( 3 x 10.000) in een stomacherzak af.
2. Voeg per 5.000 zaden 100 ml en per 10.000 zaden 150 ml koude (4°C) sPBt toe. NB Let op dat alle zaden in contact zijn met buffer tijdens het weken.
3. Incubeer de zaden overnacht bij 4°C.
4. Kneus de submonsters 4 minuten op stand 9 met een Interscience BagMixer.
5. Giet 50 ml van het extract over in een centrifugebuis.
6. Centrifugeer het extract 1 minuut, 1000 g bij 4°C, giet supernatant over in nieuwe buis en centrifugeer vervolgens 20 minuten, 9000 g bij 4°C.
7. Giet het supernatant voorzichtig af en resuspendeer het pellet in eindvolume van 3,5 ml 0,07 M sPB.
8. Pipeteer per submonster 1 ml van het extract in een buisje voor het uitplaten en pipeteer 1ml extract in een 2<sup>e</sup> buisje voor spiking (zie 5.2).
9. Maak van ieder submonster in enkelvoud een 10x en 100x verdunning in 0,07 M sPB.
10. Plaat nog dezelfde dag uit omdat bewaring de recovery van Cmm negatief kan beïnvloeden. Bewaar extracten en verdunningen bij 4°C wanneer ni et binnen 3 uur uitgeplaat kan worden
11. Plaat 100 µl van het extract in duplo en 100 µl van de 10x en 100x verdunningen in enkelvoud uit op Cmm1-tris100 en SCMF.
12. Incubeer de schalen 7 dagen bij 28 °C.

### 5.2 Spiking monsters

1. Neem één buisje met ZUM 3059 stock suspensie uit -80 °C. Verdun met sPB naar een spike-verdunning ca 4 000 CFU/ml.
2. Voeg per submonster 100 µl van de ZUM 3059 spike-verdunning toe aan het buisje met 1ml extract.
3. Plaat 100 µl van gespikete extracten uit op semi-selectieve media (Cmm1-tris100 en SCMF) en incubeer platen 7 dagen ondersteboven in stoof bij 28 °C.

### 5.3 Controle spike en referentie

Per serie monsters deze controles één maal inzetten

1. Voeg in triplo 100 µl spike-verdunning toe aan 1 ml sPB.
2. Verdun de IPO 500, IPO 501 en IPO542 referentie suspensies uit de -80 C vriezer met sPB naar ca 400 CFU/ml.
3. Plaat 100 µl van elke spike verdunning en van de referentie verdunningen uit op Cmm1-tris100, SCMF en KB
4. Incubeer platen 7 dagen ondersteboven in stoof bij 28 °C.

## 5.4 Beoordeling spike en referentie

1. Beoordeel de schalen na 7 dagen bij 28°C.
2. Controleer of de referentie isolaten (zie 5.3.3) groeien op de twee selectieve media (Cmm1-tris100, SCMF)
3. Beoordeel vervolgens de spike verdunning (Cmm1-tris100, SCMF): Ga na of de recovery vergelijkbaar is tussen de triplo's van de spike controle (20-50 CFU/plaat op SCMF medium). Verklaar de toets ongeldig wanneer de spike controle in lage aantallen (<1 CFU per plaat) aanwezig is omdat dit kan leiden tot onterecht onbeoordeelbare uitslagen. Let op dat spike vaak iets harder groeit na verdunning in zaadextract dan in kale PB buffer.
4. Noteer het aantal cfu per plaat in het tracking record Cmm.

## 5.5 Beoordeling submonsters

***Let op dat de kolonie morfologie van Cmm zeer variabel is en sterk beïnvloed wordt door het groeimedium en door andere aanwezige micro-organismen.***

### *Spike*

1. Beoordeel van ieder submonster eerst de schalen met gespikete submonsters (gespikete extracten op Cmm1-tris100 en SCMF) op aanwezigheid van Cmm verdachte kolonies.
2. Submonsters zijn beoordeelbaar wanneer er minimaal 1 duidelijk verdachte Cmm kolonie waarneembaar is op tenminste één van de twee gespiktete semi-selectieve media (Cmm1-tris100 en SCMF)
3. Geef per monster aan hoeveel gespikete submonsters er te beoordelen zijn.

### *Monsters*

4. Beoordeel de submonsters op aanwezigheid van verdachte Cmm kolonies. Als er geen verdachte Cmm kolonies voorkomen in de gespikete monsters maar wel bij de ongespikete monsters beschouw deze kolonies dan als verdacht.
5. Ga na of er geen onlogische verdeling is van het doelpathogeen over de verschillende verdunningen. Sluit bij een onlogische verdeling uit dat door kruisbesmetting de spike stam in een monster terecht is gekomen. Ga bij twijfel na m.b.v. GF-rif medium (50 ppm) of de verdachte Cmm vatbaar of resistent (aanwijzing voor kruisbesmetting) is voor rifampicine.
6. Zet verdachte Cmm kolonies uit alle submonsters over op YDC (20 kolonies voor 10.000 zaden toets en 30 kolonies voor 30 000 zaden toets). Let op dat morfologie op beide media Cmm sterk variabel is en dat er lookalikes bestaan. Zet dus bij aanwezigheid van verdachten absoluut ruim over om kans op vals negatieve uitslagen te verkleinen.
7. Zet ook een spike isolaat en de 3 referentieisolaten over op YDC

## 5.6 Reinkweek op YDC

8. Incubeer de schalen 2-3 dagen bij 28°C.
9. Beoordeel de verdachte Cmm isolaten aan de hand van de referentieisolaten.

## 7. Naslagwerken en referenties

1. ISTA handbook on seed health testing. Working sheet no. 67. Eds. Bolkan, H.A., Waters, C.M., and Fatmi, M.
2. Fatmi, M. and Schaad , N.W. 1998. Semi selective agar medium for isolation of *Clavibacter michiganensis* subsp. *michiganensis* from tomato seed. *Phytopathology* 77:121-126.
3. ISHI-veg seed testing manual. "Method for the detection of *Clavibacter michiganensis* subsp. *michiganensis* on tomato seeds" version 3 January 2008.  
[http://www.worldseed.org/cms/medias/file/FocalPoints/PhytosanitaryMatters/SeedHealthTesting/ISHI-Veg/Tomato\\_Clavibacter\\_michiganensis\\_subsp\\_michiganensis.pdf](http://www.worldseed.org/cms/medias/file/FocalPoints/PhytosanitaryMatters/SeedHealthTesting/ISHI-Veg/Tomato_Clavibacter_michiganensis_subsp_michiganensis.pdf)
4. Nadkarni, et al. (2002) Determination of bacterial load by real-time PCR using a broadrange (universal) probe and primers set. *Microbiology*,148,p.257-266
5. PT verslag

## 9. Bijlagen.

<b>Cmm1tris100 pH 7.7</b>	per liter toevoegen:
Sucrose	10,0 g
Trizma base (Tris base)	3,32 g
TrisHCl	11,44 g
MgSO <sub>4</sub> • 7H <sub>2</sub> O	0,25 g
LiCl	5,0 g
Yeast extract	2,0 g
NH <sub>4</sub> Cl	1,0 g
Casein acid hydrolysate (Casamino acids)	4,0g
Agar	15,0 g
controleer pH* en autoklaveren	
na autoklaveren toevoegen	
Polymyxin B sulfate	10 mg
Nalidixic acid	28 mg
nystatine	100 mg

Let op pH van trisbuffers is moeilijk meetbaar. pH dus niet stellen.

<b>GF-rif</b>	per liter toevoegen:
K <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub>	0,40 g
MgSO <sub>4</sub> . 7H <sub>2</sub> O	0,05 g
NaCl	0,1 g
NH <sub>4</sub> H <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>	0,5 g
FeCl <sub>3</sub> *	0,01 g
glucose (watervrij)	1,0 g
gist extract (SIGMA)	3,0 g
Agar	15,0 g
stel pH 7,2 en autoklaveren	

na autoklaveren 66 µl rifampicine uitspatelen (50 µg/ml) op de plaat

\*FeCl<sub>3</sub> is zeer hygroscopisch. Dit betekent dat deze stof na het afwegen direct toegevoegd moet worden en dus niet van te voren afgewogen

---

**SCMF pH 7,3** per liter toevoegen

---

SCM medium (Duchefa)	32,2 g
gistextract	1,9 g

controleer pH 7,3 en autoklaveren

Na autoklaveren toevoegen

nalidixinezuur	20 mg
Trimetoprim	80 mg
0,1 g nicotinezuur*/50 ml demiwater	50 ml
nystatine	100 mg
kalium telluriet (1%)	1,0 ml

---

---

**Samenstelling SCM medium (Duchefa)** per liter medium

---

Agar	18,0 g
K <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub>	2,0 g
KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>	0,5 g
MgSO <sub>4</sub> watervrij	0,122 g
H <sub>3</sub> BO <sub>3</sub>	1,5 g
sucrose	10,0 g

---

---

**Kings B medium** per liter toevoegen

---

KB-medium (DUCHEFA)	37,23 g
50% glycerol	20 ml

Controleer / stel pH 7,5 en autoklaveren

---

---

**Samenstelling KB medium (Duchefa)** per liter medium

---

Proteose	20 g
K <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub>	1,5 g
MgSO <sub>4</sub>	0,73 g
Agar	15 g

---

---

**YDC medium**

gist extract (SIGMA)	10,0 g
CaCO <sub>3</sub> (fijnkorrelig)	20,0 g
demiwater	870 ml
Agar (Sigma)	15,0 g

**CHECK pH = 6,9 en autoklaveren**autoklaven apart per fles:

20,0 g glucose watervrij in 100 ml  
demiwater

Opmerking:

Glucose-oplossing na afkoelen tot ca. 50 °C steriel aan de  
mediumflessen toevoegen en goed mengen.  
Het medium moet tijdens het gieten regelmatig op de roerder  
worden gezet.

---

---

<b>sPB</b>	per liter toevoegen
Na <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub> x 12H <sub>2</sub> O	19,57 g
KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>	1,65 g5
Na <sub>2</sub> S <sub>2</sub> O <sub>3</sub>	0,5 g
controleer pH 7,4	
autoklaveren 15 minuten 121 °C	

---

---

<b>sPBt</b>	per liter toevoegen
Na <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub> x 12H <sub>2</sub> O	19,57 g
KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>	1,65 g5
Na <sub>2</sub> S <sub>2</sub> O <sub>3</sub>	0,5 g
controleer pH 7,4	
autoklaveren 15 minuten 121 °C	
toevoegen steriele tween 20 (10% opl.)	2 ml

---