

Received: 03.10.2014 / Accepted: 17.02.2015

## Influence of different methods of bacterial nucleic acid isolation on sensitivity of the PCR assay

## Wpływ różnych sposobów izolacji kwasów nukleinowych z bakterii na czułość testu PCR

Włodzimierz Przewodowski\*, Chołuj Joanna, Przewodowska Agnieszka

### Summary

Isolation of nucleic acids of different plant pathogens is one of the most important stages, which have influence on the correct molecular diagnosis of these pathogens. This study investigated the suitability of two different DNA isolation techniques used in the diagnosis of *Clavibacter michiganensis* ssp. *sepedonicus* (Cms) – quarantine bacteria responsible for potato ring rot. The quality of the isolated DNA and the sensitivity of the two methods were assessed by spectrophotometric analysis, respectively/and the sensitivity of electrophoretic DNA PCR (polymerase chain reaction) assay. Two methods of DNA extraction were compared. The first of them with CTAB (cetyltrimethylammonium bromide) method allowed to remove the components of plant tissues and while destructing membranes released nucleic acids from bacterial cells (method 1). In the second method extraction of genomic DNA was done in the presence of high concentrations of salt, which involved the selective precipitation of nucleic acids (method 2). In addition to the efficiency of the compared extraction methods the impact of bacterial slime and buffer components on the quality of the obtained DNA were also assessed. It has been shown that the best quality of DNA and PCR sensitivity was obtained using the CTAB method. The high mucoid level of tested strains only marginally reduced the detection of bacteria Cms in PCR assay.

**Key words:** *Clavibacter michiganensis* ssp. *sepedonicus*; DNA isolation; PCR; CTAB

### Streszczenie

Izolacja kwasów nukleinowych patogenów roślin jest jednym z najważniejszych etapów warunkujących prawidłową diagnostykę molekularną tych patogenów. W pracy badano przydatność różnych technik izolacji DNA kwarantannowych bakterii *Clavibacter michiganensis* ssp. *sepedonicus* (Cms) – sprawcy bakteriozy pierścieniowej ziemniaka, stosowanych w diagnostyce bakteryjnych patogenów ziemniaka. Jakość wyizolowanego DNA oraz czułość obu metod oceniano na podstawie odpowiednio analizy spektrofotometrycznej/elektroforetycznej DNA oraz czułości testu PCR (polymerase chain reaction – łańcuchowej reakcji polimerazy). Porównywano dwie różne metody izolacji DNA. Pierwsza z nich – metoda z wykorzystaniem CTAB (cetyltrimetyloamoniowy) umożliwia usunięcie komponentów tkanek roślinnych oraz destrukcję błon i uwolnienie kwasów nukleinowych z komórek bakterii (metoda 1). W drugiej z porównywanych metod ekstrakcję genomowego DNA przeprowadzano w obecności wysokiego stężenia soli powodującego selektywne wytrącanie kwasów nukleinowych (metoda 2). Oprócz efektywności metod ekstrakcji oceniano również wpływ śluzów bakteryjnych oraz komponentów buforów na jakość uzyskanych preparatów DNA. Wykazano, iż najlepszą jakość DNA i czułość testu PCR uzyskano stosując metodę CTAB, a wysoka mukoidalność badanych szczepów jedynie w nieznacznym stopniu obniżyła wykrywalność bakterii Cms testem PCR.

**Słowa kluczowe:** *Clavibacter michiganensis* ssp. *sepedonicus*; izolacja DNA; PCR; CTAB

Instytut Hodowli i Aklimatyzacji Roślin – Państwowy Instytut Badawczy  
Zakład Nasiennictwa i Ochrony Ziemniaka  
Bonin 3, 76-009 Bonin

\*corresponding author: w.przewodowski@ihar.edu.pl

## Wstęp / Introduction

Izolacja kwasów nukleinowych (DNA/RNA) patogenów roślin jest ważnym początkowym etapem wielu procedur diagnostycznych stosowanych w biologii molekularnej, warunkującym poprawność identyfikacji tych patogenów. Jednym z najważniejszych elementów pozwalających na uzyskanie wysokiej czułości testu molekularnego jest odpowiednia jakość wyizolowanego materiału genetycznego oraz możliwość usunięcia substancji, które mogłyby niekorzystnie wpływać na wynik reakcji PCR (polymerase chain reaction – łańcuchowej reakcji polimerazy). Oba te parametry w znacznym stopniu uzależnione są od sposobu izolacji kwasów nukleinowych (Mak i Ho 1992). W przypadku izolacji DNA bakteryjnego z prób roślinnych, a szczególnie bulw ziemniaka zawierających znaczną ilość komponentów aktywnych enzymatycznie, efektywność procesu izolacji oraz czystość otrzymanych preparatów jest zależna od zastosowanej metody ekstrakcji kwasów nukleinowych (Van Bechoven i wsp. 2002). Dodatkowo obecność śluzów zawierających egzopolisacharydy, którymi pokryte są komórki bakterii *Clavibacter michiganensis* ssp. *sepedonicus* (*Cms*) oraz inhibitorów reakcji PCR pochodzenia roślinnego może znacząco obniżyć czułość testów molekularnych.

Jedną z częściej stosowanych metod izolacji DNA z tkanek roślinnych jest technika opracowana przez Doyle i Doyle (1987), z użyciem jonowego detergentu CTAB (cetyltrimetylammonium bromide – bromek cetyltrimetyloamoniowy) oraz mieszaniny chloroformu i alkoholu izoamylowego. W metodzie tej na skutek zastosowanych odczynników dochodzi do rozerwania błon komórkowych, a następnie oddzielenia kwasów nukleinowych znajdujących się w fazie wodnej od pozostałych komponentów zawartych w fazie organicznej. Metoda jest szczególnie polecana do analizy próbek bogatych w polisacharydy i zanieczyszczenia polifenolowe. Alternatywna metoda ekstrakcji DNA opracowana przez Edwardsa i wsp. (1991) opiera się na wykorzystaniu innego detergentu o nazwie dodecylsulfian sodu (SDS), proteinazy K i wysokiego stężenia soli NaCl. Jest to metoda prostsza w wykonaniu i tańsza w porównaniu z metodą CTAB. W prezentowanej pracy porównano wydajność obu metod izolacji DNA, a otrzymane preparaty kwasów nukleinowych oceniano pod względem czystości i przydatności do testu PCR.

DNA izolowano z komórek gram dodatnich bakterii *Cms*, sprawcy bakteriozy pierścieniowej ziemniaka. Ze względu na specyfikę tego patogenu, obecność egzopolisacharydów bakteryjnych otaczających bakterie *Cms*, a także obecność wielu substancji towarzyszących w ekstraktach z bulw ziemniaka, efektywna izolacja DNA może być utrudniona. Ponadto obecność inhibitorów reakcji PCR może dawać wyniki fałszywie ujemne w testach molekularnych.

## Materiały i metody / Materials and methods

DNA izolowano z komórek bakteryjnych dwóch skrajnie zróżnicowanych mukoidalnie szczepów *Cms* przygotowanych w postaci świeżo sporządzonych 48-godzinnych

zawiesin bakteryjnych. Czułość metod oceniano sporządzając zawiesiny bakterii o stężeniu od 100 do 10 mln jednostek tworzących kolonie w mililitrze (jtk/ml) w różnych mediach, takich jak: sterylna woda, ekstrakt roślinny z bulw ziemniaka oraz bufor fosforanowy. Ekstrakt roślinny przygotowano z bulw odmiany Baszta umytych i osuszonych papierowym ręcznikiem, które przecierano wraz ze skórką na plastikowej tarce. Ciecz z nad osadu miąższu zlewano i przesączało przez sterylną gazę. Tak uzyskany ekstrakt porcjowano do 2 ml probówek Eppendorff i dodawano bakterie *Cms* uzyskując oczekiwane stężenie komórek w objętości 1 ml.

Do badań stosowano dwie metody izolacji DNA. W pierwszej metodzie z wykorzystaniem odczynnika CTAB, przygotowane zawiesiny wirowano 10 min  $10\,000 \times g$ , usunięto supernatant pozostawiając 100  $\mu$ l cieczy nad osadem. Osad rozpuszczono w buforze 400  $\mu$ l  $1 \times$  PBS (bufor fosforanowy) z 0,2% BSA (albumina wołowa), dodano 800  $\mu$ l podgrzanego do 60°C buforu CTAB z 0,2% Me, a następnie całość intensywnie mieszano i inkubowano 20 min w 60°C w łaźni wodnej od czasu do czasu mieszając. Dodano 600  $\mu$ l mieszaniny chloroform:alkohol izoamylowy (24:1), mieszano energicznie i wirowano  $10\,000 \times g$  przez 10 min. Supernatant przeniesiono do nowej probówki i dodano równoważną objętość zimnego izopropanolu. Całość dobrze wymieszano i umieszczono na około 30 min w -20°C, a potem wirowano  $10\,000 \times g$  przez 10 min. Uzyskany osad przepłukano 500  $\mu$ l objętością 80% EtOH i po usunięciu alkoholu, suszono w termobloku w temperaturze 55°C. DNA rozcieńczano w 50  $\mu$ l sterylnej  $H_2O$ .

W drugiej z metod, wysokosolnej, przygotowane zawiesiny zwirowano wstępnie, podobnie jak w metodzie CTAB, odebrano 800  $\mu$ l z każdej probówki, pozostawiając docelowo 200  $\mu$ l zawiesiny ze zwirowanym osadem. Dodano 200  $\mu$ l 200 mM Tris-Cl pH 8,0 (zawierającego 0,8 M NaCl i 4 mM EDTA). Do każdej z prób dodano 40  $\mu$ l 10% SDS-u oraz 8  $\mu$ l proteinazy K (0,4 mg/ml) i całość inkubowano w temperaturze 62°C całą noc we wstrząsarce laboratoryjnej. Dodano 300  $\mu$ l 6 M NaCl (do stężenia 5 M). Próby intensywnie mieszano przez 30 s przy maksymalnych obrotach, następnie wirowano 30 min  $10\,000 \times g$ . Supernatant przeniesiono do nowej probówki i dodano około 800  $\mu$ l zimnego izopropanolu. Całość dobrze wymieszano przez odwracanie probówek. Próby inkubowano przez 1 h w -20°C, a następnie wirowano 20 min w  $10\,000 \times g$ . Osad przemyto (pozostawiono na 5 min) 200  $\mu$ l 70% etanolu. Po ostrożnym usunięciu etanolu osad suszono (około 5 min) w temperaturze 55°C w termobloku przy włączonym wyciągu. DNA rozcieńczano w 50  $\mu$ l dejonizowanej i sterylnej wody.

Ilość otrzymanego DNA oznaczono za pomocą spektrofotometru mikropłytkowego Epoch (BioTek) na podstawie stosunku absorpcji A260/A280 (tab. 3). Preparaty DNA rozdzielano w 1,5% żelu agarozowym stosując napięcie 140 V przez 40 minut (rys. 1). Test PCR prowadzono według warunków opisanych przez Pastrik i Maiss (2000). Jako kontrolę negatywną do testu PCR stosowano media bez zawiesin *Cms*. DNA ze wszystkich prób izolowano trzykrotnie, każdą próbę w dwóch powtórzeniach.

Tabela 1. Czulość testu PCR dla niskomukoidalnego szczepu bakterii *Clavibacter michiganensis* subsp. *sepedonicus* (Cms)  
 Table 1. The sensitivity of the PCR assay for low mucous strain of *Clavibacter michiganensis* subsp. *sepedonicus* (Cms) bacteria

Szczep niskomukoidalny Low mucous strain	Sok z bulw – Tuber extracts						1 × PBS						H <sub>2</sub> O					
Cms [jtk/ml]	10 <sup>7</sup>	10 <sup>6</sup>	10 <sup>5</sup>	10 <sup>4</sup>	10 <sup>3</sup>	10 <sup>2</sup>	10 <sup>7</sup>	10 <sup>6</sup>	10 <sup>5</sup>	10 <sup>4</sup>	10 <sup>3</sup>	10 <sup>2</sup>	10 <sup>7</sup>	10 <sup>6</sup>	10 <sup>5</sup>	10 <sup>4</sup>	10 <sup>3</sup>	10 <sup>2</sup>
Metoda 1 – Method 1	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	–	–	+	+	+	+	+	–
Metoda 2 – Method 2	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	–	+	+	+	+	–	–

PBS – bufor fosforanowy – phosphate buffer

Tabela 2. Czulość testu PCR dla szczepu mukoidalnego bakterii *Clavibacter michiganensis* subsp. *sepedonicus* (Cms)  
 Table 2. The sensitivity of the PCR assay for mucous strain of *Clavibacter michiganensis* subsp. *sepedonicus* (Cms) bacteria

Szczep mukoidalny Mucous strain	Sok z bulw – Tuber extracts						1 × PBS						H <sub>2</sub> O					
Cms [jtk/ml]	10 <sup>7</sup>	10 <sup>6</sup>	10 <sup>5</sup>	10 <sup>4</sup>	10 <sup>3</sup>	10 <sup>2</sup>	10 <sup>7</sup>	10 <sup>6</sup>	10 <sup>5</sup>	10 <sup>4</sup>	10 <sup>3</sup>	10 <sup>2</sup>	10 <sup>7</sup>	10 <sup>6</sup>	10 <sup>5</sup>	10 <sup>4</sup>	10 <sup>3</sup>	10 <sup>2</sup>
Metoda 1 – Method 1	+	+	+	+	+	–	+	+	+	+	+	–	+	+	+	+	+	–
Metoda 2 – Method 2	+	+	+	+	+	–	+	+	+	+	+	–	+	+	+	+	–	–

PBS – bufor fosforanowy – phosphate buffer

Tabela 3. Porównanie ilości DNA wyizolowanego z mukoidalnego (M) i niskomukoidalnego szczepu bakterii *Clavibacter michiganensis* subsp. *sepedonicus* (Cms)  
 Table 3. Comparison of the amounts of DNA isolated from mucous (M) and low mucous strain of *Clavibacter michiganensis* subsp. *sepedonicus* (Cms) bacteria

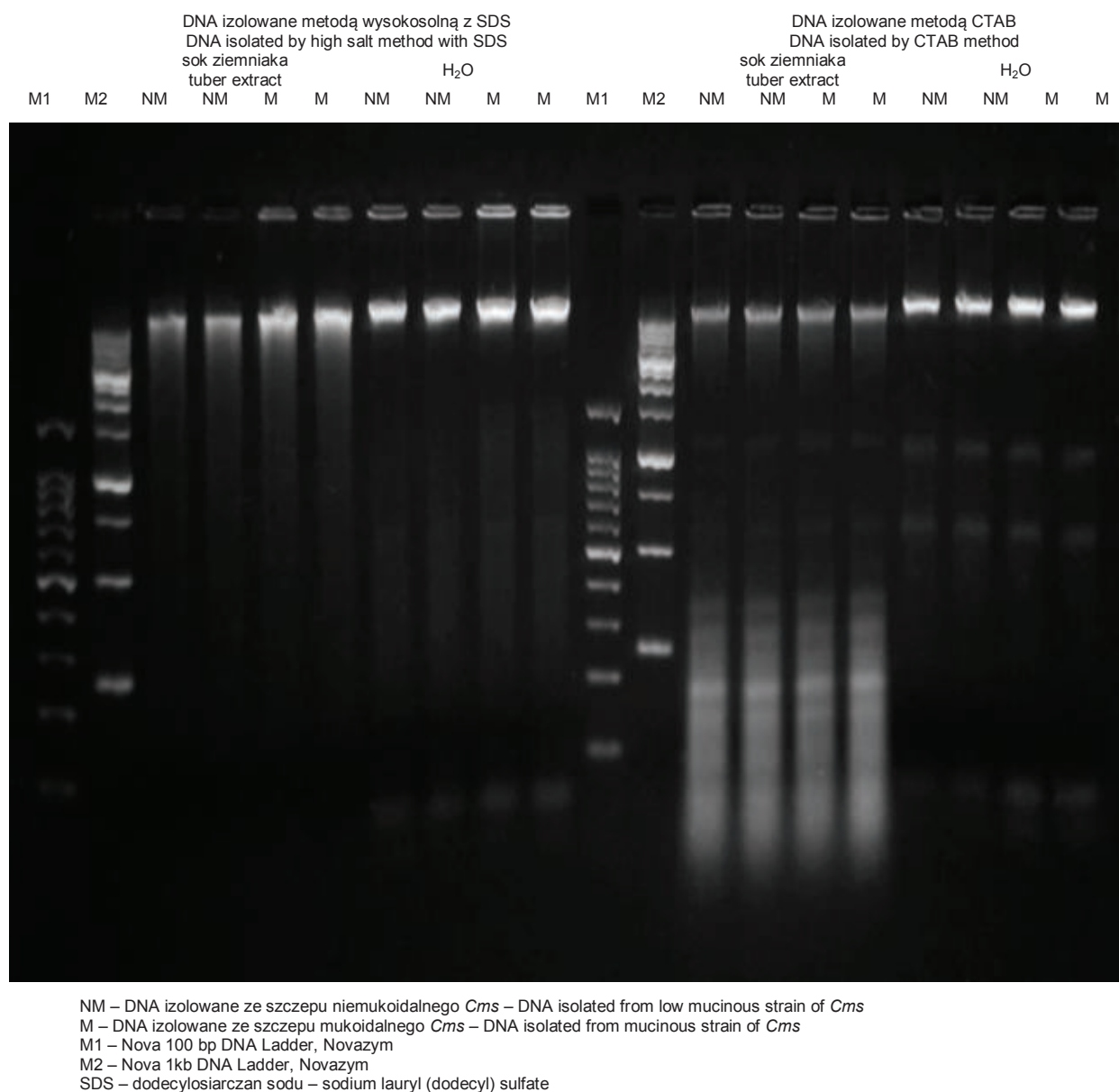
Materiał do izolacji DNA Material for DNA isolation	Metoda 1 Method 1	Metoda 2 Method 2
	ilość wyizolowanego DNA amount of isolated DNA [ug/ul]	
Szczep niskomukoidalny bakterii Cms w soku ziemniaka Low mucous strain of Cms bacteria in tuber extract	0,354±0,025	0,089±0,012
Szczep mukoidalny bakterii Cms w soku ziemniaka Mucous strain of Cms bacteria in tuber extract	0,404±0,076	0,118±0,022
Szczep niskomukoidalny bakterii Cms w 1 × PBS Low mucous strain of Cms bacteria in 1 × PBS	0,023±0,003	0,006±0,001
Szczep mukoidalny bakterii Cms w 1 × PBS Mucous strain of Cms bacteria in 1 × PBS	0,029±0,009	0,012±0,004
Szczep niskomukoidalny bakterii Cms w wodzie Low mucous strain of Cms bacteria in water	0,030±0,005	0,020±0,003
Szczep mukoidalny bakterii Cms w wodzie Mucous strain of Cms bacteria in water	0,026±0,007	0,064±0,006

PBS – bufor fosforanowy – phosphate buffer

## Wyniki i dyskusja / Results and discussion

Szybkie, czułe i specyficzne metody identyfikacji patogenów bakteryjnych są szczególnie ważne w przypadku patogenów powodujących groźne, kwarantannowe choroby, skutkujące wysokimi stratami ekonomicznymi. Wiarygodność testów molekularnych, w których DNA identyfikowanego patogenu jest amplifikowane w reakcji PCR, zależy w znacznym stopniu od jakości matrycy DNA wyizolowanej z badanej próby. Ekstrakty roślinne bogate w polisacharydy, komponenty fenolowe oraz inne meta-

bolity wtórne mogą hamować reakcję PCR lub łączyć się z DNA po liście komórek (John 1992). Opracowano wiele metod izolacji kwasów nukleinowych pozwalających wyeliminować niekorzystny wpływ komponentów roślinnych na wydajność tego procesu oraz wynik testu diagnostycznego (Doyle i Doyle 1987, 1990; Sharma i wsp. 2002). Jedną z częściej stosowanych metod w izolacji DNA z tkanek roślinnych jest metoda z użyciem kationowego detergentu (CTAB). Technika ta została pierwotnie opracowana przez Doyle i Doyle (1987), a następnie wielokrotnie modyfikowana i zaadaptowana do izolacji DNA



Rys. 1. Jakość DNA izolowanego metodą wysokosolną i CTAB (cetyltrimetylammonium bromide – bromek cetyltrimetyloamoniowy) z dwóch zróżnicowanych mukoidalnie szczepów bakterii *Clavibacter michiganensis* subsp. *sepedonicus* (*Cms*)

Fig. 1. The quality of DNA isolated by CTAB (cetyltrimethylammonium bromide) and high salt method with mucinous differentiated *Clavibacter michiganensis* subsp. *sepedonicus* (*Cms*) bacteria

z różnych roślin. Metoda z użyciem wysokiego stężenia dodecylsulfanu sodu (SDS) znalazła również szerokie zastosowanie w ekstrakcji materiału genetycznego z wielu różnych roślin, np.: tytoniu (*Nicotiana*), soi (*Glycine max*) i petunii (*Petunia*) (Dellaporta i wsp. 1983). Izolacja DNA tą metodą była możliwa nawet z tak trudnych tkanek, jak: igły świerkowe, liście ryżu czy wodorostów (Guillemaut i Maréchal-Drouard 1992; Csaikl i wsp. 1998; Wattier i wsp. 2000).

Opracowano również wiele gotowych zestawów do izolacji kwasów nukleinowych z tkanek roślinnych opartych na kolumnkach wirówkowych wypełnionych złożem. Jednak ich wykorzystanie w przypadku testowania

dużej liczby prób nie zawsze jest możliwe ze względu na relatywnie wysokie koszty wykonania ekstrakcji.

Izolacja DNA z bulw ziemniaka jest szczególnie trudna ze względu na obecność w ekstraktach tkankowych polifenoli i polisacharydów, które hamują działanie polimerazy Taq DNA (Pastrik i Maiss 2000; Kotchoni i wsp. 2003). Dodatkowo podczas maceracji bulw komponenty fenolowe utleniają się i łączą z białkami oraz kwasami nukleinowymi tworząc trwałe kompleksy, obniżając w ten sposób jakość uzyskanego DNA, czyniąc go nieprzydatnym do amplifikacji techniką PCR (Porębski i wsp. 1997).

W prezentowanych badaniach porównywano dwie różne metody izolacji DNA, z których pierwsza (z dodatkiem



CTAB) opierała się na usunięciu komponentów tkanek roślinnych oraz destrukcji błon i uwolnieniu kwasów nukleinowych z komórek bakterii. Ekstrakcję genomowego DNA przeprowadzano równocześnie metodą wysokosolną, w której zachodzi selektywne wytrącanie kwasów nukleinowych w obecności wysokich stężeń soli. Aby ocenić wpływ stopnia mukoidalności badanych bakterii na efektywność izolacji DNA, do badań wykorzystano dwa skrajnie zróżnicowane mukoidalnie szczepy *Cms* w zawiesinach o stężeniu od 100 do 10 mln jednostek tworzących kolonie w mililitrze (jtk/ml). Największą ilość DNA otrzymano przez izolację metodą CTAB z bakterii *Cms* o wysokiej mukoidalności zawieszonych w soku ziemniaka. Nieco mniejszą wydajność uzyskano przy izolacji z bakterii zawieszonych w soku, ale charakteryzujących się niższą śluzowatością. W porównaniu z metodą wysokosolną, izolacja z CTAB pozwoliła uzyskać ponad trzykrotnie większą ilość DNA dla bakterii zawieszonych w soku ziemniaka, niezależnie od stopnia mukoidalności badanych szczepów. W przypadku zawiesin bakteryjnych w pozostałych mediach (bufor fosforanowy z NaCl oraz sterylne woda) wydajność izolacji DNA tą metodą była zdecydowanie niższa od metody CTAB, która utrzymywała się na jednakowym poziomie 0,023–0,030 µg/µl. Jedynie w przypadku izolacji z bakterii silnie mukoidalnych zawieszonych w wodzie metoda wysokosolna wykazała większą wydajność od metody z użyciem CTAB (tab. 3).

Jakość uzyskanych preparatów DNA oceniano na podstawie rozdziałów elektroforetycznych w żelu agarozowym (rys. 1). Preparaty izolowane z bakterii zawieszonych w wodzie wykazywały podobny stopień czystości i degradacji niezależnie od zastosowanej metody izolacji. Największy stopień degradacji i dużą ilość fragmentów o wielkości poniżej 500 pz obserwowano w preparatach DNA izolowanych z zawiesiny bakterii w soku ziemniaka metodą CTAB (rys. 1), ale wydajność tej metody była zdecydowanie wyższa w porównaniu z metodą wysokosolną (tab. 3).

Czułość testu PCR dla zawiesin bakteryjnych o stężeniu  $10^2$ – $10^7$  jtk/ml oceniano według warunków opisanych przez Pastrik (2000), zalecanych przez EPPO (European and Mediterranean Plant Protection Organization) do rutynowej kontroli fitosanitarnej pod kątem obecności bakterii *Cms* (OEPP/EPPO 2006). W przypadku preparatów DNA pochodzących z zawiesin w soku ziemniaka skuteczność identyfikacji dla obu metod była identyczna i zachodziła

w pełnym zakresie rozcieńczeń ( $10^2$ – $10^7$  jtk/ml) dla szczepu niskomukoidalnego i ( $10^3$ – $10^7$  jtk/ml) w przypadku szczepu o niskim stopniu śluzowatości. Test PCR z użyciem DNA pochodzącego z komórek bakteryjnych zawieszonych w  $1 \times$  PBS pozwolił wykryć  $10^3$  jtk dla szczepu niskomukoidalnego zarówno przy izolacji z użyciem CTAB, jak i w warunkach wysokosolnych. Jedynie w przypadku DNA ze szczepu o niskiej śluzowatości zawieszonego w  $1 \times$  PBS izolowanego techniką wysokosolną uzyskano czułość większą o jeden rząd wielkości w porównaniu z DNA izolowanym techniką CTAB. Czułość testu PCR z użyciem DNA izolowanego z bakterii zawieszonych w wodzie była taka sama dla obu technik i obu badanych szczepów wynosząc odpowiednio  $10^3$  jtk/ml dla metody z użyciem CTAB oraz  $10^4$  jtk/ml dla metody wysokosolnej.

Z danych literaturowych wynika, że wybór optymalnej metody izolacji DNA jest zależny od rodzaju rośliny i tkanki, która jest poddawana izolacji. Porównanie ośmiu metod izolacji DNA z surowych i przetworzonych bulw ziemniaka wykazało, że najlepszą wydajnością izolacji z surowych bulw charakteryzuje się metoda CTAB, a najlepszą jakość matrycy DNA uzyskano używając cząstek magnetycznych Kingfisher. Natomiast przy izolacji DNA z suszonych produktów ziemniaczanych najbardziej wydajny okazał się zestaw Wizard Magnetic DNA Purification for Food, Promega (Smith i wsp. 2005). Niezależnie od rodzaju badanej próby (bulwy ziemniaka, suszone plastry i płatki ziemniaczane, mąka ziemniaczana, skrobia i chipsy ziemniaczane) uzyskane DNA było dobrej jakości i mogło być wykorzystane do amplifikacji techniką PCR.

## Wnioski / Conclusions

1. Zastosowana metoda izolacji DNA z komórek bakterii *Cms* wpływa na czułość testu PCR i jest zależna od medium, w jakim zawieszone są komórki bakteryjne.
2. Najlepszą jakość DNA i czułość testu PCR w wykrywaniu bakterii zawieszonych w soku ziemniaka uzyskano przy izolacji DNA techniką CTAB.
3. Mukoidalność badanych szczepów nie miała istotnego wpływu na efektywność izolacji DNA. Obniżenie czułości testu PCR występowało jedynie w przypadku szczepu silnie mukoidalnego, zawieszonego w soku ziemniaka, przy izolacji DNA techniką wysokosolną.

## Literatura / References

- Csaikl U.M., Bastian H., Brettschneider R., Gauch S., Meir A., Schauerte M., Scholz F., Sperisen C., Vornam B., Ziegenhagen B. 1998. Comparative analysis of different DNA extraction protocols: A fast, universal maxi-preparation of high quality plant DNA for genetic evaluation and phylogenetic studies. *Plant Molecular Biology Reporter* 16 (1): 69–86.
- Dellaporta S.L., Wood J., Hicks J.B. 1983. A plant DNA mini-preparation: version 2. *Plant Molecular Biology Reporter* 1 (4): 19–21.
- Doyle J.J., Doyle J.L. 1987. A rapid DNA isolation procedure for small quantities of fresh leaf tissue. *Phytochemical Bulletin* 19: 11–15.
- Doyle J.J., Doyle J.L. 1990. Isolation of plant DNA from fresh tissue. *Focus* 12: 13–15.
- Edwards K., Johnstone C., Thompson C. 1991. A simple and rapid method for the preparation of plant genomic DNA for PCR analysis. *Nucleic Acids Research* 19, p. 1349.
- Guillemaut P., Maréchal-Drouard L. 1992. Isolation of plant DNA: a fast, inexpensive, and reliable method. *Plant Molecular Biology Reporter* 10 (1): 60–65.

- John M.E. 1992. An efficient method for isolation of RNA and DNA from plants containing polyphenolics. *Nucleic Acid Research* 20 (9), p. 2381.
- Kotchoni S.O., Gachomo E.W., Betiku E., Shonukan O.O. 2003. A home made kit for plasmid DNA mini preparation. *African Journal of Biotechnology* 2 (4): 88–90.
- Mak Y.M., Ho K.K. 1992. An improved method for the isolation of chromosomal DNA from various bacteria and cyanobacteria. *Nucleic Acids Research* 20 (15): 4101–4102.
- OEPP/EPPO 2006. *Clavibacter michiganensis* subsp. *sepedonicus*. Bulletin OEPP/EPPO Bulletin 36: 99–109.
- Pastrik K.-H. 2000. Detection of *Clavibacter michiganensis* ssp. *sepedonicus* in potato tubers by multiplex PCR with coamplification of host DNA. *European Journal of Plant Pathology* 106: 155–165.
- Pastrik K.-H., Maiss E. 2000. Detection of *Ralstonia solanacearum* in potato tubers by polymerase chain reaction. *Journal of Phytopathology* 148 (11–12): 619–626.
- Porębski S., Bailey L.G., Baum B.R. 1997. Modification of a CTAB DNA extraction protocol for plants containing high polysaccharide and polyphenol components. *Plant Molecular Biology Reporter* 15 (1): 8–15.
- Sharma A.D., Gill P.K., Singh P. 2002. DNA isolation from dry and fresh samples of polysaccharide-rich plants. *Plant Molecular Biology Reporter* 20 (4), p. 415.
- Smith D.S., Maxwell P.W., De Boer S.H. 2005. Comparison of several methods for the extraction of DNA from potatoes and potato-derived products. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 53 (26): 9848–9859.
- Wattier R.A., Prodohl P.A., Maggs C.A. 2000. DNA isolation protocol for red seaweed (Rhodophyta). *Plant Molecular Biology Reporter* 18 (3): 275–281.
- Van Beckhoven J.R.C.M., Stead D.E., Van der Wolf J.M. 2002. Detection of *Clavibacter michiganensis* subsp. *sepedonicus* by AmpliDet RNA, a new technology based on real time monitoring of NASBA amplicons with a molecular Bacon. *Journal of Applied Microbiology* 93: 840–849.