การตรวจแบคทีเรีย *Clavibacter michiganensis* subsp. *nebraskensis* จากเมล็ดพันธุ์ข้าวโพดที่นำเข้าจากประเทศสหรัฐอเมริกา โดยเทคนิค Real time PCR

Detection of *Clavibacter michiganensis* subsp. *nebraskensis* from Corn seeds import from United States of America by Real time PCR

ณัฏฐิมา โฆษิตเจริญกุล[1/] ทิพวรรณ กันหาญาติ[1/]
รุ่งนภา ทองเครื่ง[1/] ชลธิชา รักใคร่[2/]
[1/]กลุ่มวิจัยโรคพืช สำนักวิจัยพัฒนาการอารักขาพืช
[2/]กลุ่มวิจัยการกักกันพืช สำนักวิจัยพัฒนาการอารักขาพืช

รายงานความก้าวหน้า

โรคเหี่ยว (Goss's Bacterial Wilt of corn) หรือ โรคใบไหม้ (Leaf Blight of corn) โรคที่สำคัญของข้าวโพดและเป็นศัตรูกักกันพืชของประเทศไทย เชื้อสาเหตุเกิดจากแบคทีเรีย *Clavibacter michiganensis* subsp. *nebraskensis* ที่มีแหล่งกำเนิดดั้งเดิมและระบาดในประเทศสหรัฐอเมริกา สามารถถ่ายทอดได้ทางเมล็ดพันธุ์ (seed transmission) ประเทศไทยมีการนำเข้าเมล็ดพันธุ์จากประเทศสหรัฐอเมริกา โดยมีมูลค่าการนำเข้า 85,984,962 บาท ทำให้มีความเสี่ยงที่แบคทีเรีย *C. michiganensis* subsp. *nebraskensis* อาจติดมากับเมล็ดพันธุ์ได้ การทดลองนี้จึงมีจุดมุ่งหมายในการพัฒนาวิธีการตรวจหาแบคทีเรีย *C. michiganensis* subsp. *nebraskensis* โดยวิธี real time PCR ให้มีประสิทธิภาพ รวดเร็วและความแม่นยำสูง โดยออกแบบไพรเมอร์เพื่อใช้ในการตรวจสอบเชื้อแบคทีเรีย *C. michiganensis* subsp. *nebraskensis* จากยีน16S ribosomal RNA gene ส่วน 16S-23S ribosomal RNA intergenic spacer โดยได้ไพรเมอร์ดังนี้ Cmn probe FAM-5VTTCCGTCGTCCTTTCGTGGATG3V-TAMRA อยู่ในระหว่างการนำเข้าเชื้อแบคทีเรีย *C. michiganensis* subsp. *nebraskensis* จึงยังไม่สามารถสกัด DNA จากแบคทีเรีย *C. michiganensis* subsp. *nebraskensis* เพื่อนำมาเป็น DNA positive control

รหัสการทดลอง 03-31-60-01-01-00-02-60

คำนำ

ประเทศไทยเป็นแหล่งผลิตข้าวโพดที่สำคัญของภูมิภาคเอเชียตะวันออกเฉียงใต้ มีพื้นที่ปลูกประมาณ 7ล้านไร่ ประเทศไทยสั่งนำเข้าเมล็ดข้าวโพดเพื่อการบริโภคและใช้เป็นพ่อพันธุ์แม่พันธุ์ เพื่อการผลิตเมล็ดพันธุ์ลูกผสม สำหรับใช้ในประเทศและส่งออกไปยังประเทศต่างๆ โดยในปี 2556 มีปริมาณการนำเข้า ข้าวโพดเลี้ยงสัตว์ จำนวน 182,174,288 กิโลกรัม/ปี มูลค่าการนำเข้า 751,421,853 บาท มีปริมาณการส่งออกข้าวโพด 561,133,133 กิโลกรัมต่อปี มูลค่าการส่งออกประมาณ 4,138,610,061 ล้านบาท (ที่มา: สำนักงานเศรษฐกิจการเกษตร) จากการที่ประเทศไทยมีการนำเข้าเมล็ดพันธุ์ทำให้มีความเสี่ยงในการเป็นเส้นทาง (pathway) ของศัตรูพืชกักกันที่สำคัญที่อาจติดมากับเมล็ดพันธุ์ได้ โรคเหี่ยว (Goss's Bacterial Wilt of corn) หรือ โรคใบไหม้ (Leaf Blight of corn) โรคที่สำคัญของข้าวโพดและเป็นศัตรูกักกันพืชของประเทศไทย เชื้อสาเหตุเกิดจากแบคทีเรีย *Clavibacter michiganensis* subsp. *nebraskensis* ที่มีแหล่งกำเนิดดั้งเดิมในประเทศสหรัฐอเมริกา พบระบาดอย่างกว้างขวางในประเทศสหรัฐอเมริกา สามารถถ่ายทอดได้ทางเมล็ดพันธุ์ (seed transmission) ประเทศไทยมีการนำเข้าเมล็ดพันธุ์จากประเทศสหรัฐอเมริกา โดยมีมูลค่าการนำเข้า 85,984,962 บาท ทำให้มีความเสี่ยงที่แบคทีเรีย *C. michiganensis* subsp. *nebraskensis* อาจติดมากับเมล็ดพันธุ์ได้ ดังนั้นการพัฒนาวิธีการตรวจหาแบคทีเรียสาเหตุโรคพืชที่มีประสิทธิภาพจึงมีความจำเป็นที่ใช้เป็นเครื่องมือในการตรวจหาแบคทีเรียศัตรูกักกันเพื่อป้องกันไม่ให้แบคทีเรียศัตรูกักกันเข้ามาในประเทศไทย การทดลองนี้จึงมีจุดมุ่งหมายในการพัฒนาวิธีการตรวจหาแบคทีเรีย *C. michiganensis* subsp. *nebraskensis* โดยวิธี real time PCR ให้มีประสิทธิภาพ รวดเร็วและความแม่นยำสูง สามารถตรวจหาแบคทีเรียพบในระดับปริมาณน้อย เป็นที่ยอมรับจากประเทศนำเข้า และสามารถนำไปใช้เป็นวิธีตรวจหาแบคทีเรียสาเหตุโรคเน่า จากเมล็ดพันธุ์ข้าวโพดที่นำเข้าได้

การพัฒนาเทคนิคการตรวจวินิจฉัย แบคทีเรีย *C. michiganensis* subsp. *nebraskeksis* สาเหตุโรคเหี่ยว (Goss's Bacterial Wilt of corn) ของข้าวโพด ได้มีการพัฒนาโดย Gross and Vidaver (1979) ได้รายงานการใช้ อาหารที่เหมาะสม semi-selective medium CNS ในการแยกแบคทีเรีย *C. michiganensis* subsp. *nebraskensis* จากตัวอย่างพืชและดิน โดยจะได้แบคทีเรียโคโลนีสีเหลืองอมส้ม มีเมือก ขอบเรียบ เป็นประกาย โคโลนีมีผิวคล้ายเนย มีขนาด 4 มม.หลังจาก 6 วันที่อุณหภูมิ 25 องศาเซลเซียสPastrik and Rainey (1999) ได้ศึกษาการจัดจำแนกและความแตกต่างของแบคทีเรีย ในกลุ่ม *Calvibacter michiganensis* species โดยใช้เทคนิค Polymerase chain raction(PCR) ทำให้ได้primer ที่เฉพาะเจาะจง ต่อแบคทีเรียในกลุ่ม *C. michiganensis* โดยสามารถแยกความแตกต่างของ 5 ชนิดได้ด้วยขนาดของชิ้นดีเอ็นเอที่เฉพาะเจาะจง *C. michiganensis* subsp *sepedonicus* ได้ขนาด 502 bp, *C. michiganensis* subsp *michiganensis* ขนาด 210 bp, *C. michiganensis* subsp *insidiosus* ขนาด 393 bp, *C. michiganensis* subsp *tessellarius* ขนาด 587 bp และ *C. michiganensis* subsp *nebraskensis* ขนาด 393 bp .

Ye *et.al.* (2014) ได้พัฒนาวิธีการตรวจหาแบคทีเรีย *C. michiganensis* subsp *nebraskensis* จากเมล็ดข้าวโพดที่นำเข้า โดยได้พัฒนาวิธี nested PCR ใช้ primer CM1/CM4 and PSM1/CM3 พบว่า สามารถตรวจหาแบคทีเรีย *C. michiganensis* subsp *nebraskensis* ในปริมาณต่ำสุดที่ตรวจได้ ดีเอ็นเอ ที่ 8 fg และ ในระดับเซลแบคทีเรีย ได้ 6.8 CFU และมีความไวในการตรวจมากกว่าเทคนิค PCR ด้วย primer PSM1/CM3 ผลจากการสุ่มตรวจเมล็ดพันธุ์ 100 เมล็ดที่นำเข้ามาจากสหรัฐอเมริกา วิธี nested PCR สามารถตรวจพบ 24% ส่วนเทคนิคPCR ตรวจได้เพียง 8% เท่านั้น ซึ่งวิธีการตรวจสอบสามารถใช้เป็นวิธีการประจำในการตรวจหาแบคทีเรีย *C. michiganensis* subsp *nebraskensis* จากตัวอย่างเมล็ดพันธุ์ข้าวโพดนำเข้า

เทคนิค Real time PCR เป็นเทคนิคที่พัฒนาขึ้นมาจากข้อจำกัดของเทคนิค PCR (Polymerase chain reaction) ทำให้สามารถตรวจวิเคราะห์เชิงปริมาณได้ (Quantitative) เห็นผลได้แบบทันที (real tme & on line) บนหน้าจอคอมพิวเตอร์ (Higuchi *et.al.* 1992) ในขณะที่เทคนิค PCR ไม่สามารถวิเคราะห์เชิงปริมาณได้ และการวิเคราะห์ผลต้องทำในแผ่นวุ้นใช้เวลานานและย้อมด้วยสาร ethedium bromide ที่อันตราย (Reischl and Kochanowski,1999) เทคนิค Real time PCR เป็นการพัฒนานำเทคโนโลยี 2 ส่วน ได้แก่การพัฒนาเทคโนโลยีการตรวจหาดีเอ็นเอในสารละลายโดยใช้สารเรืองแสง(Fluorescence reporters) ต่างๆ และการใช้เครื่อง themocycler ซึ่งเป็นเครื่องควบคุมอุณหภูมิขึ้นลงตามระยะเวลาที่กำหนด มารวมกันเป็นเครื่อง Real time themocycler โดยเพิ่มส่วนที่เป็นแหล่งกำเหนิดแสงเพื่อไปก่อให้เกิดการเรืองแสงของชิ้นดีเอ็นเอ และส่วนตรวจวัดการเรืองแสงที่เกิดขึ้น ณ เวลานั้นๆ (Higuchi *et.al.* 1992)

Gudmestad *et.al.* (2004) ได้มีการออกแบบไพรเมอร์จาก ยีน cellulaseA (CelA) gene sequence เพื่อใช้กับเทคนิค Real time PCR ในการตรวจหาแบคทีเรีย *C. michiganensis* subsp. *sepedonicus* จากหัวพันธุ์มันฝรั่ง เพื่อรับรองหัวพันธุ์ในอุตสาหกรรมการผลิตหัวพันธุ์มันฝรั่งในประเทศสหรัฐอเมริกา ไพรเมอร์ CelA มีความเฉพาะเจาะจงกับแบคทีเรีย *C. michiganensis* subsp. *sepedonicus* มีความไวในการตรวจมากกว่า ไพรเมอร์อื่นได้แก่ CMS50/72a โดยสามารถตรวจได้ในระดับ 10 เซล/ml การตรวจสอบแบคทีเรีย *C. michiganensis* subsp. *sepedonicus* โดยเทคนิค Real time PCR ด้วยไพรเมอร์ CelA เป็นวิธีการที่ให้ผลการตรวจสอบที่มีประสิทธิภาพ แม่นยำ และรวดเร็ว

วิธีดำเนินการ

อุปกรณ์

1. อุปกรณ์มาตรฐานในห้องปฏิบัติการแบคทีเรีย ได้แก่ ตู้เขี่ยเชื้อชนิดปลอดเชื้อ อุปกรณ์การแยกเชื้อแบคทีเรีย
2. อุปกรณ์วิทยาศาสตร์ เช่น ตู้ควบคุมอุณหภูมิ ตู้เย็นสำหรับเก็บตัวอย่าง หม้อนึ่งความดันไอ เครื่องเขย่าชนิดควบคุมอุณหภูมิ เครื่องวัดค่าดูดกลืนแสง (spectrophotometer) ตู้อบ (oven) เครื่อง Thermocycler (Biometra ®)
3. เครื่องแก้วและอุปกรณ์อื่นๆที่ใช้ในห้องปฏิบัติการ เช่น เครื่องชั่ง, pH meter เป็นต้น
4. สารเคมีที่ใช้ในการเตรียมอาหารเลี้ยงเชื้อ

วิธีการ

การขออนุญาตนำเข้าแบคทีเรีย ***Clavibacter michiganensis*** **subsp** ***nebraskensis*** เนื่องจากแบคทีเรีย *C. michiganensis* subsp. *nebraskensis* ไม่มีรายงานการปรากฏพบในประเทศไทย ดังนั้นจึงจำเป็นต้องมีการขออนุญาตนำเข้าจากต่างประเทศเช่น Belgian Coordinated collection of Microorganism โดยจัดทำคำขออนุญาตนำเข้า (แบบพก.1) พร้อมเสนอข้อมูลการนำเข้าสิ่งต้องห้ามเพื่อการทดลองหรือวิจัย เสนอต่อคณะอนุกรรมการนำเข้าสิ่งต้องห้ามเพื่อการทดลองหรือวิจัย เมื่อได้รับอนุญาตแล้ว จึงดำเนินการนำเข้ามาเพื่อทดลองต่อไป

specific primer สืบค้นข้อมูล primer ที่ได้มีรายงานว่า สามารถใช้ในการตรวจวินิจฉัย โรคเหี่ยว (Goss's Bacterial Wilt of corn) หรือ โรคใบไหม้ (Leaf Blight of corn) ได้ผลดีและมีความเฉพาะเจาะจงต่อแบคทีเรีย *C. michiganensis* subsp. *nebraskensis* คัดเลือก primer จากนั้นนำลำดับเบสของ primer ไปสังเคราะห์เพื่อใช้ในการตรวจวินิจฉัยโรคเน่าวงแหวนโดยวิธี Real time PCR ต่อไป

การแยก genomic DNA ให้บริสุทธิ์ (Purified genomic DNA) การแยก genomic DNA ให้บริสุทธิ์ ใช้วิธีของ Pitcher *et al.* (1989) โดยใช้เชื้อบริสุทธิ์แบคทีเรีย *C. michiganensis* subsp. *nebraskensis* สาเหตุโรคเหี่ยว (Goss's Bacterial Wilt of corn) หรือ โรคใบไหม้ (Leaf Blight of corn) ของข้าวโพด อายุ 48 ชั่วโมง บนอาหารแข็ง LB ใช้ลูปฆ่าเชื้อ แตะเชื้อแบคทีเรียให้เต็มหนึ่งลูป ละลาย ใน 1 มิลลิลิตร Resuspension buffer (0.15 M NaCl และ 0.01M EDTA pH 8.0) นำไปปั่นตกตะกอนด้วยเครื่องหมุนเหวี่ยง Hettich (Universal 116, Gemnany) ที่ความเร็วรอบ 14,000 รอบต่อนาที นาน 5 นาที ทิ้งส่วนน้ำใสข้างบน เติมด้วย 100 ไมโครลิตร TE buffer pH 8.0 (10 mM Tris และ 1mM EDTA pH 8.0) ผสมให้เข้ากันโดยใช้ เครื่องปั่น vortex เติมด้วย 500 ไมโครลิตรของ Guanidine thiocyanate – EDTA – Sarkosyl solution ผสมให้เข้ากัน เติมด้วย 250 ไมโครลิตร ของ 7.5 M ammonium acetate ที่แช่เย็นใน ตู้เย็น -20 °C ผสมให้เข้ากัน วางบนน้ำแข็ง 5 นาที เติมด้วย 500 ไมโครลิตร chloroform/iso-amyl-alcohol (24/1) ผสมให้เข้ากัน นำไปปั่นตกตะกอนด้วยเครื่องหมุนเหวี่ยง

Hettich (Universal 116, Gemnany) ที่ความเร็วรอบ 14,000 รอบต่อนาที นาน 10 นาที เก็บส่วนน้ำใสข้างบน ใส่หลอดใหม่ที่บรรจุ สาร isopropanol ที่แช่เย็นใน ตู้เย็น -20 °C จำนวน 378 ไมโครลิตร ผสมให้เข้ากันโดยการพลิกหลอดกลับไปมา จากนั้นนำไปหมุนเหวี่ยงเพื่อเก็บตะกอน genomic DNA ที่ความเร็วรอบ 14000 รอบต่อนาที นาน 10 นาที ล้างตะกอนดีเอนเอด้วย 150 ไมโครลิตร ของ 70 % ethanol จำนวน 2 ครั้ง ทิ้งให้แห้งที่อุณหภูมิห้อง ลายตะกอนDNA ด้วย TE buffer pH. 8.0 ปริมาณ 100 ไมโครลิตร วัดปริมาณความเข้มข้น และคุณภาพของดีเอนเอ ที่ช่วงคลื่น A260/A280 ด้วยเครื่องspectrophotometer (U 2001 UV/Vis, Hitachi Instruments, Inc., USA) และปรับความเข้มข้น DNA ของเชื้อแต่ละไอโซเลทให้มีความเข้มข้น 50 นาโนกรัม/ไมโครลิตร เพื่อนำไปทดสอบปฏิกิริยา Polymerase chain reaction

ทดสอบหาสภาพที่เหมาะสมของปฏิกิริยา Real time PCR โดยการหา Tm ที่เหมาะสมของไพรเมอร์ เพื่อนำมาทำการทดสอบปฏิกิริยา Real time PCR จะได้อุณหภูมิในการจับคู่ไพรเมอร์กับดีเอ็นเอต้นแบบ (annealing temperature) ที่เหมาะสม ตลอดจนทดสอบหาเวลาที่เหมาะสมในการทำปฏิกริยาในแต่ละช่วงเวลา ทดสอบสภาวะที่เหมาะสมของ Real time PCR เพื่อหา crossing point และ วิเคราะห์หา melting curve

ทดสอบความจำเพาะ (specificity) และความไว (sensitivity) ของปฏิกิริยา Real time PCR ในการตรวจแบคทีเรีย *C. michiganensis* subsp. *nebraskensis* เป็นการทดสอบ primer ที่สังเคราะห์ไว้ โดยใช้สภาพที่เหมาะสมที่ได้จากข้อ 3 มาทำการทดสอบความจำเพาะของ primer โดยใช้ DNA และเซลของเชื้อแบคทีเรีย *C. michiganensis* subsp. *nebraskensis* ความเข้มข้นของ DNA ที่ 50 ng และความเข้มข้นของเซลล์ที่ 10^8 cfu/ml การทดสอบความไวในการตรวจสอบแบคทีเรีย *C. michiganensis* subsp. *nebraskensis* (sensitivity) ของ primer โดยใช้สภาพที่เหมาะสมที่ได้จากข้อ 3 โดยใช้ DNA ของ แบคทีเรีย *C. michiganensis* subsp. *nebraskensis* ที่มีความเข้มข้น 8 ระดับ ตั้งแต่ 50 นาโนกรัม ถึง 100 เฟมโตกรัม และใช้เซลล์ แบคทีเรีย *C. michiganensis* subsp. *nebraskensis* ที่ความเข้มข้น 10^8, 10^7, 10^6, 10^5, 10^4, 10^3, 10^2, 10 หน่วยโคโลนี/มิลลิลิตร

ทดสอบวิธี Real time PCR ในการตรวจหาแบคทีเรีย *C. michiganensis* subsp. *nebraskensis* จากเมล็ดพันธุ์ข้าวโพดที่นำเข้า ทำการสุ่มตัวอย่างเมล็ดพันธุข้าวโพด ที่นำเข้าจากด่านตรวจพืช ตามวิธีของ ASTA นำมาบดแล้วที่เติมด้วย 100 ul ของ phosphate buffer saline pH 7.0 บดตัวอย่างด้วย plastic disposable pestles ให้ละเอียดนำไปตกตะกอนด้วยเครื่อง centrifuge ที่ 5,000 rpm เป็นเวลา 5 นาที เก็บส่วนบนที่เป็นน้ำใสใส่หลอด microcentrifuge ขนาด 1.5 ml ทิ้งส่วนตะกอน นำ 2 ul ของตัวอย่างเป็นต้นแบบในการทำปฏิกิริยา Real time PCR ตามปฏิกิริยาที่กล่าวมาแล้วข้างต้น และทุกตัวอย่างเปรียบเทียบกับการตรวจเชื้อบนอาหาร semi-selective for *C. michiganensis* subsp. *nebraskensis*

เวลาและสถานที่

ต.ค.59 – ก.ย.62 ที่ กลุ่มวิจัยโรคพืช สำนักวิจัยพัฒนาการอารักขาพืช

ผลการทดลอง

การขออนุญาตนำเข้าแบคทีเรีย ***Clavibacter michiganensis*** **subsp.** ***nebraskensis*** เนื่องจากแบคทีเรีย *C. michiganensis* subsp. *nebraskensis* ไม่มีรายงานการปรากฏพบในประเทศไทย ดังนั้นจึงจำเป็นต้องมีการขออนุญาตนำเข้าจากต่างประเทศเช่น Belgian Coordinated collection of Microorganism โดยจัดเตรียมทำคำขออนุญาตนำเข้า (แบบพก.1) พร้อมเสนอข้อมูลการนำเข้าสิ่งต้องห้ามเพื่อการทดลองหรือวิจัย อยู่ในระหว่างการเสนอต่อคณะอนุกรรมการนำเข้าสิ่งต้องห้ามเพื่อการทดลองหรือวิจัย เมื่อได้รับอนุญาตแล้ว จึงดำเนินการนำเข้ามาเพื่อทดลองต่อไป

ออกแบบไพรเมอร์ที่มีความเฉพาะเจาะจง (specific primer) ดำเนินการสืบค้นข้อมูลลำดับ nucleotide ของยีนที่สำคัญของ แบคทีเรีย *C. michiganensis* subsp. *nebraskensis* ใน GenBank (www.ncbi.nlm.nih.gov) เพื่อนำมา ออกแบบprimer ที่เฉพาะเจาะจงกับเชื้อ แบคทีเรีย *C. michiganensis* subsp. *nebraskensis* โดยพบว่า ยีนที่นำมาออกแบบไพรเมอร์คือยีน16S ribosomal RNA gene ส่วน 16S-23S ribosomal RNA intergenic spacer โดยได้ไพรเมอร์ดังนี้ Cmn probe FAM-5VTTCCGTCGTCCTTTCGTGGATG3V-TAMRA

การเตรียม DNA positive control เนื่องจากอยู่ในระหว่างการนำเข้าเชื้อแบคทีเรีย *C. michiganensis* subsp. *nebraskensis* จึงยังไม่สามารถสกัด DNA จากแบคทีเรีย *C. michiganensis* subsp. *nebraskensis* เพื่อนำมาเป็น DNA positive control ดังนั้นจึงได้ดำเนินการสังเคราะห์ยีน 16S-23S ribosomal RNA intergenic spacer เพื่อนำมาใช้เป็น DNA positive control เพื่อดำเนินการทดสอบไพรเมอร์ต่อไป

สรุปผลการทดลองและคำแนะนำ

เนื่องจากแบคทีเรีย *C. michiganensis subsp. sepedonicus* และ C. *michiganensis* subsp. *nebraskensis* ไม่มีรายงานการปรากฏพบในประเทศไทย ดังนั้นจึงจำเป็นต้องมีการขออนุญาตนำเข้าจากต่างประเทศเช่น Belgian Coordinated collection of Microorganism โดยจัดเตรียมทำคำขออนุญาตนำเข้า (แบบพก.1) พร้อมเสนอข้อมูลการนำเข้าสิ่งต้องห้ามเพื่อการทดลองหรือวิจัย อยู่ในระหว่างการเสนอต่อคณะอนุกรรมการนำเข้าสิ่งต้องห้ามเพื่อการทดลองหรือวิจัย เมื่อได้รับอนุญาตแล้ว จึงดำเนินการนำเข้ามาเพื่อทดลองต่อไป

เอกสารอ้างอิง

CAB International. 2007. Crop Protection Compendium 2007 Edition. (Computer Program).CAB International. Wallingford, UK.

Gross DC, Vidaver AK, 1979. A selective medium for isolation of *Corynebacterium nebraskense* from soil and plant parts. Phytopathology, 69(1):82-87

Gudmestad, N. C., Mallik, I., Pasche, J. S., Anderson, N. R., and Kinzer, K. 2009. A real-timePCR assay for the detection of *Clavibacter michiganensis* subsp. *sepedonicus* based on the cellulose A gene sequence. Plant Dis. 93:649-659.

Higuchi, R., Dollinger, G, Walsh,P.S. and Griffith,R. 1992. Simultaneous amplification and detection of specific DNA sequences. Biotechnology (NY) 10:413-417.

Pastrik K-H and Rainey FA. 1999. Identification and differentiation of *Clavibacter michiganensis* subspecies by polymerase chain reaction-based techniques. Journal of Phytopathology 147, 687-693..

Reischi, U. and Kochanowski B. 1999. Quantitative PCR. In Method in Molecur Medicine: Quantitative PCR Protocol. Edited by Kochanowski B.and Reischi, U. Humana Press, Totowa, New Jersey. Pp 3-30.

YE Lu-fei, SU Han, ZHOU Guo-liang, YIN Li-ping, LI Xiao-jun, YANG Sai-jun, YI Jian-ping, 2014. Detection of Clavibacter michiganensis subsp. nebraskensis in imported corn by PCR. ACTA Phytopathological sinica 44(2) 121-128.