토마토 궤양병 신속 진단을 위한 *Clavibacter michiganensis*의 PCR 검출법

PCR Detection Method for Rapid Diagnosis of Bacterial Canker Caused by *Clavibacter michiganensis* on Tomato

*Corresponding author

Tel: +82-63-238-6312

Fax: +82-63-238-6305

E-mail: mijpark@korea.kr

박미정* · 백창기 · 박종한

농촌진흥청 국립원예특작과학원 원예특작환경과

Mi-Jeong Park*, Chang-Gi Back, and Jong-Han Park

Horticultural and Herbal Crop Environment Division, National Institute of Horticultural and Herbal Science, Wanju 55365, Korea

Received October 19, 2018
 Revised December 3, 2018
 Accepted December 6, 2018

Bacterial canker caused by *Clavibacter michiganensis* is considered to be one of the most serious diseases, leading to economic damage to tomato worldwide. Diagnosis of the bacterial canker on tomato is known to be difficult because the causal pathogen is slow-growing on artificial media as well as causes latent infection in tomato. In this study, as a less time-consuming method, a specific primer set was newly designed for rapid detection of *C. michiganensis*. The method presented here is so simple, easy, and fast that it can be useful and practical in direct detection of the bacterial canker pathogen from tomato plants.

Keywords: Bacterial canker, *Clavibacter michiganensis*, Detection, PCR, Tomato

*Clavibacter michiganensis*는 토마토에 궤양병을 일으키는 식물병원성 세균으로 1910년 미국에서 처음으로 보고되었다(Smith, 1910). 국내에서는 1997년 경북 경주에서 토마토 궤양병이 처음 발생하였다(Choi 등, 1997). 그 이후 2007년에 토마토 주산지인 강원 철원과 전북 익산에서 궤양병이 발생하였고, 이때 분리한 균주에 대해 생화학적 특성과 유전자 염기서열 분석이 이루어진 결과 토마토 궤양병균으로 정확히 동정되었다(Myung 등, 2008). 2014년 이후부터 충남 부여 및 논산, 경북 포항, 경남 김해 등 토마토 주산지에서 궤양병이 집단적으로 발생하는 경향을 보였으며, 농가에 따라 경제적 피해가 크게 발생하

기도 하였다(국립원예특작과학원 민원 접수 기준).

토마토 궤양병은 꽃마름병, 줄기속썩음병 등과 함께 토마토의 중요한 세균병 중의 하나로 알려져 있다. 이들 세균병의 경우 병이 진전되면 식물체 지상부에서 시드는 증상이 나타나며 육안으로는 병의 종류를 판별하기가 쉽지 않으므로 확실한 진단을 위해서는 병원균의 정확한 검출법이 요구된다. 감염 식물체로부터 토마토 궤양병균의 검출을 위해서는 다음과 같은 몇 가지 방법이 있다. 감염된 식물체 조직으로부터 토마토 궤양병균을 분리·배양하기 위해서 여러 가지 선택배지 또는 반선택배지가 개발되어 있다(Fatmi 등, 1988; Ftayeh 등, 2011; Gitaitis 등, 1991; Kaneshiro 등, 2006). 희석평판법을 사용하여 균을 분리할 때에는 토마토 궤양병균의 느린 생장 속도로 인해 콜로니를 확인할 때까지 어느 정도의 시간과 많은 노력이 필요하다(de León 등, 2011). 또한 Agdia사의 간이진단키트를 이용하면

Research in Plant Disease

pISSN 1598-2262, eISSN 2233-9191

www.online-rpd.org

현장에서도 빠르고 쉽게 진단할 수 있으나 간이진단키트는 토마토 궂양병균과 유사한 세균들에 대해 비특이적인 반응을 일으킬 수 있으므로 사용시 각별한 주의가 필요하다(Yasuhara-Bell 등, 2016). 특히 프라이머를 이용한 PCR 검출법은 실험실에서 신속하고 정확하게 진단할 수 있는 장점이 있어 국내외에서 여러 세균병의 진단에 사용되고 있으며, 토마토 궂양병균 검출을 위한 conventional PCR용 프라이머와 Real-time PCR용 TaqMan 프로브가 개발된 바 있다(Bach 등, 2003; Dreier 등, 1995; Kokosková 등, 2010; Luo 등, 2008; Pastrick과 Rainey, 1999; Santos 등, 1997; Zhao 등, 2007).

본 연구에서는 국내 토마토 궂양병균의 빠른 검출을 위해 정확도와 민감도가 높은 특이 프라이머를 제작하고 PCR 시간을 단축시킴으로써 감염 식물체로부터 토마토 궂양병균을 정확하고 신속하게 진단하는 방법을 제시하고자 한다.

국내 토마토 재배지에서 발생한 궂양병 시료에서 *Clavibacter michiganensis*를 분리하였으며 10 균주를 실험에 사용하였다. 토마토 궂양병균인 *C. michiganensis*와 근연관계에 있는 종(Li 등, 2018)으로서 *C. tessellarius*, *C. nebraskensis*, *C. insidiosus*의 균주가 국외 미생물자원센터로부터 도입되어 농촌진흥청 국립농업과학원 미생물은행(KACC)에서 보존 중이며, 이들 균주의 genomic DNA를 제공받아 실험에 사용하였다(Table 1). 또한 국내에서 분리된 고추 궂양병균(*C. capsici*) 1균주(KACC 18448)를 KACC에서 분양받아 사용하였다. 또한 국립원예특작과학원에서 보존 중인 원예작물 식물병원성 세균 9종, *Acidovorax citrulli*, *Acidovorax konjaci*, *Agrobacterium tumefaciens*, *Pectobacterium carotovorum*, *Pseudomonas corrugata*, *Pseudomonas syringae*, *Pseudomonas viridiflava*, *Xanthomonas arboricola*, *Xanthomonas perforans*의 1균주씩에 대해서 특이 프라이머의 증폭 여부를 검정하였다(Table 1). 토마토 궂양병 감염 식물체에 대한 균 검출 시험을 위해 파종 후 5주간 생육시킨 토마토 유묘의 뿌리를 토마토 궂양병균의 세균현탁액(10^7 cfu/ml)에 담가 6시간 동안 충분히 흡수시키는 방법으로 침지 접종 한 후에 포장에 정식하였으며, 2주 후에 식물체 전신이 시드는 개체를 실험에 사용하였다.

균주의 genomic DNA 추출을 위해 LB 액체배지에서 24시간 배양하였으며, HiGene Genomic DNA Prep Kit (Biofact, Korea)를 사용하여 제조사의 방법에 따라 DNA를 추출하였다. 토마토 궂양병균에 특이적인 PCR 프라이머의 제작을 위해 NCBI GenBank에 등록된 *C. michiganensis* (JN603292), *C. tessellarius* (JN613836), *C. nebraskensis* (JN613835), *C. insidiosus* (DQ374154)의 16-23S ribosomal RNA intergenic spacer 유전자 염기서열을 참조하였다. 이를 통해 증폭 크기가 165 bp인 프라이머 세트

Table 1. List of bacterial strains used in this study

No.	Strain	Locality	Source
1	<i>Clavibacter michiganensis</i>	Cheongyang	12-019
2	<i>Clavibacter michiganensis</i>	Gwangju	12-031
3	<i>Clavibacter michiganensis</i>	Chuncheon	13-065
4	<i>Clavibacter michiganensis</i>	Hanam	14-132
5	<i>Clavibacter michiganensis</i>	Nonsan	14-135
6	<i>Clavibacter michiganensis</i>	Cheongyang	14-310
7	<i>Clavibacter michiganensis</i>	Cheorwon	15-079
8	<i>Clavibacter michiganensis</i>	Buyeo	16-043
9	<i>Clavibacter michiganensis</i>	Gimje	17-156
10	<i>Clavibacter michiganensis</i>	Ansan	17-338
11	<i>Clavibacter insidiosus</i>		NCPBP 1109* (KACC 19585)
12	<i>Clavibacter nebraskensis</i>		NCPBP 2581* (KACC 19586)
13	<i>Clavibacter tessellarius</i>		NCPBP 3664* (KACC 19587)
14	<i>Clavibacter capsici</i>		KACC 18448*
15	<i>Acidovorax citrulli</i>		16-088
16	<i>Acidovorax konjaci</i>		13-024
17	<i>Agrobacterium tumefaciens</i>		14-069
18	<i>Pectobacterium carotovorum</i>		18-446
19	<i>Pseudomonas corrugata</i>		18-374
20	<i>Pseudomonas syringae</i>		14-110
21	<i>Pseudomonas viridiflava</i>		17-562
22	<i>Xanthomonas arboricola</i>		18-490
23	<i>Xanthomonas perforans</i>		17-348

* Type strain.

Table 2. Primer sequences of PCR-detection for *Clavibacter michiganensis*

Primer	Primer sequence (5' → 3')
CmmF	acc ctt tcc gtc gtc ctg ttg t (22 mer)
CmmR	atc gtt tcg cct ccc cga ag (20 mer)

CmmF (5'-acc ctt tcc gtc gtc ctg ttg t-3')와 CmmR (5'-atc gtt tcg cct ccc cga ag-3')를 제작하였다(Table 2).

PCR 반응은 특이 프라이머 세트(각 10 pmole)와 genomic DNA (40 ng/μl)를 포함하는 PCR 반응 혼합물에 대해 수행하였다. PCR 조건으로는 95°C에서 3분간 pre-denaturation 반응을 시켰으며, 95°C에서 5초간 denaturation, 66°C에서 10초간 annealing, 72°C에서 10초간 extension 반응을 35회 진행하였으며, 마지막으로 72°C에서 5분간 final extension 반응을 시

Fig. 1. *Clavibacter michiganensis*-specific PCR using the CmmF/CmmR primer pair. PCR was carried out under condition of 95°C, 3 min pre-denaturation / 95°C, 5 sec; 66°C, 10 sec; 72°C, 10 sec (35 cycles) / 72°C, 5 min final extension. Ten out of ten strains of *C. michiganensis* (lane 1 to lane 10) were amplified. Lane M: 100 bp plus DNA ladder, Lane 1: *C. michiganensis* 12-019, Lane 2: *C. michiganensis* 12-031, Lane 3: *C. michiganensis* 13-065, Lane 4: *C. michiganensis* 14-132, Lane 5: *C. michiganensis* 14-135, Lane 6: *C. michiganensis* 14-310, Lane 7: *C. michiganensis* 15-079, Lane 8: *C. michiganensis* 16-043, Lane 9: *C. michiganensis* 17-156, Lane 10: *C. michiganensis* 17-338, Lane 11: *C. tessellarius* NCPPB 3664, Lane 12: *C. nebraskensis* NCPPB 2581, Lane 13: *C. insidiosus* NCPPB 1109, Lane 14: *C. capsici* KACC 18448, Lane 15: Tomato DNA, Lane 16: Tomato leaf sap.

Fig. 2. Species-specific PCR detection of *Clavibacter michiganensis* using the CmmF/CmmR primer pair. No amplification was detected except *C. michiganensis* (lane 1, positive control). Lane M: 100 bp plus DNA ladder, Lane 1: *Clavibacter michiganensis*, Lane 2: *Acidovorax citrulli*, Lane 3: *Acidovorax konjaci*, Lane 4: *Agrobacterium tumefaciens*, Lane 5: *Pectobacterium carotovorum*, Lane 6: *Pseudomonas corrugata*, Lane 7: *Pseudomonas syringae*, Lane 8: *Pseudomonas viridiflava*, Lane 9: *Xanthomonas arboricola*, Lane 10: *Xanthomonas perforans*.

Fig. 3. Sensitivity of PCR detection from bacterial cells of *Clavibacter michiganensis* using the CmmF/CmmR primer pair in a 10-fold dilution series. Amplified products were obtained from lane 1 (10^9 cfu/ml) to lane 6 (10^4 cfu/ml). Lane 6 showed a weak PCR product band. Lane M: 100bp plus DNA ladder, Lane 1: 10^9 cfu/ml, Lane 2: 10^8 cfu/ml, Lane 3: 10^7 cfu/ml, Lane 4: 10^6 cfu/ml, Lane 5: 10^5 cfu/ml, Lane 6: 10^4 cfu/ml, Lane 7: 10^3 cfu/ml, Lane 8: 10^2 cfu/ml, Lane 9: 10^1 cfu/ml, Lane 10: 10^0 cfu/ml, Lane 11: 10^{-1} cfu/ml, Lane 12: distilled water.

켰다.

PCR 프라이머의 특이성을 조사하기 위해 토마토 궤양병균 10 균주의 DNA와 고추 궤양병균(*C. capsici*) 1균주의 DNA를 비롯하여 *C. tessellarius*, *C. nebraskensis*, *C. insidiosus*의 각 균주 DNA를 포함시켜 검정하였다. 또한 건전 토마토의 잎 즙액과 토마토의 DNA도 포함시켜 특이 프라이머와의 증폭 여부를 검정하였다. PCR 시험 결과, 토마토 궤양병균 10균주의 DNA에 대해서만 165 bp 크기의 PCR 산물이 특이적으로 생성되었다(Fig. 1). 반면에 이 특이 프라이머는 고추 궤양병균뿐만 아니라 토마토 궤양병균과 계통학적으로 근연관계에 있는 다른 *Clavibacter* 종들(*C. tessellarius*, *C. nebraskensis*, *C. insidiosus*)의 DNA와는 전혀 반응하지 않았다(Fig. 1). 또한 건전한 토마토 잎에서 추출한 식물체 DNA와 토마토 즙액과 반응시켰을 때에도

어떠한 밴드도 증폭되지 않는 것을 확인할 수 있었다(Fig. 1). 또한 원예작물의 다른 식물병원성 세균의 DNA와도 반응하지 않아 특이성이 높음을 알 수 있었다(Fig. 2).

DNA를 추출하지 않고도 균주로부터 직접적인 검출이 가능한지 확인하기 위해 토마토 궤양병균 균주의 현탁액 농도를 O.D._{600 nm} 1로 조정된 후 10배씩 순차적으로 희석하여 PCR 프라이머의 민감도를 검정하였다. 세균현탁액을 10^{-10} 까지 희석하여 민감도를 측정한 결과 10^{-6} 인 10^5 cfu/ml까지는 증폭이 안정적으로 되는 것을 확인하였다. 그러나 10^{-5} 인 10^4 cfu/ml에서는 밴드가 희미하여 육안상 밴드를 분명히 구분하기는 어려우나 증폭이 미약하게 되는 것을 확인할 수 있었다. 이는 PCR에 사용되는 template 1 μ l의 양을 기준으로 최대 10 cfu가 검출될 수 있다는 것을 의미한다(Fig. 3). 기존의 토마토 궤양병균 검출용 프

라이머 중에서 CMM5/CMM6 (Dreier 등, 1995)은 검출한계가 10^4 cfu/ml이나 일부 토마토 궤양병균 균주와는 반응을 하지 않아 거짓 음성 반응을 보인다는 단점이 있다(Hadas 등, 2005; Louws 등, 1999). 또한 또 다른 프라이머 세트 Cmm1F/Cmm1R은 검출한계가 10^3 cfu/ml으로 template μ l 내 1 cfu를 검출할 수 있어 본 연구에서 새로 개발된 프라이머 세트 CmmF/CmmR보다 조금 더 민감하다는 장점이 있다(Kokosková 등, 2010). 그럼에도 불구하고 기존의 프라이머 세트를 이용한 conventional PCR과 quantitative real-time PCR과 비교하면 새로 개발된 프라이머 세트 CmmF/CmmR를 이용하여 PCR을 할 경우, PCR cycling 조건의 단계별 소요시간이 짧아 전체 PCR 시간이 대폭 줄어들어 1시간 이내에 신속한 진단이 가능하다.

토마토 궤양병균을 인공접종하여 감염시킨 식물체를 이용하여 DNA를 추출하지 않고도 감염 식물체로부터 직접적인 균 검출이 가능한 지를 검정하였다. 감염 식물체의 잎, 엽병, 지제부, 뿌리 등 여러 병든 부위를 멸균한 면도칼로 100 mg 잘라내어 마이크로튜브에 담은 후에 멸균한 3차 증류수 500 μ l를 넣고 plastic pestle로 갈아서 식물체 즙액을 제조하였다. PCR을 위해

원액을 10배 희석시킨 후 희석액 2 μ l을 template으로 사용하여 검정하였다. 그 결과, 감염 식물체의 모든 부위에서 밴드가 증폭되는 것을 확인할 수 있었다(Fig. 4). 감염 부위를 10배씩 희석한 후 즙액을 BCT 선택배지(Ftayeh 등, 2011)에 도말하여 배양시험을 한 결과, 감염 식물체의 시든 잎을 포함하여 모든 부위에서 10^7 cfu/ml 수준의 높은 농도로 궤양병균이 존재하는 것을 확인하였다. 또한 10배씩 희석한 식물체 즙액으로부터 PCR로 식물체 내 병원균의 검출 가능 농도를 측정 한 결과, 식물체 내 10^4 cfu/ml까지 밴드가 증폭이 되었으므로 식물체에 병징이 나타나지 않더라도 이 수준의 농도로 병원균이 존재할 경우에는 잠복기 상태에서도 검출이 가능할 것으로 보인다(Table 3).

본 연구에서 개발된 토마토 궤양병균 특이 프라이머로 PCR 할 경우, 병원균의 분리·배양 등 시간이 다소 소요되는 전통적 진단과정을 생략함으로써 토마토 궤양병균의 감염 여부를 빠르고 정확하게 알 수 있다. 또한 DNA 추출 과정없이 감염 식물체의 즙액을 이용하여 PCR을 바로 수행할 수 있으며 전체적인 진단시간을 단축시킴으로써 토마토 궤양병 발생 시 신속한 진

Fig. 4. Specific detection of *Clavibacter michiganensis* from different parts of artificially infected plant (A) using the CmmF/CmmR primer pair by direct PCR (B). Lane 1 to lane 9 showed PCR amplification of genomic DNA of *C. michiganensis* directly from various parts of the diseased plant. Lane M: 100bp plus DNA ladder, Lane C: uninfected control plant, Lane 1: leaf showing wilting symptom, Lane 2: leaf showing wilting symptom, Lane 3: petiole of leaf showing wilting symptom, Lane 4: shoots with no symptoms, Lane 5: petiole of leaf showing wilting symptom, Lane 6: middle part of stem, Lane 7: lower part of stem, Lane 8: root, Lane 9: discolored xylem vessel.

Table 3. Detection of *Clavibacter michiganensis* in the artificially inoculated tomato seedling by plating undiluted (1/1) and serially diluted ($1/10$ – $1/10^6$) leaf extract on selective BCT medium and PCR assay

Assays on leaf extract	Leaf extract dilution						
	1/1	1/10	1/10 ²	1/10 ³	1/10 ⁴	1/10 ⁵	1/10 ⁶
Estimated bacterial concentration on BCT medium (cfu/ml)	10 ⁷	10 ⁶	10 ⁵	10 ⁴	10 ³	10 ²	10 ¹
PCR assay	+	+	+	+	–	–	–

단과 빠른 방제가 가능할 것으로 보인다.

요 약

*Clavibacter michiganensis*는 토마토에 궤양병을 일으키는 식물병원성 세균으로 인공배지에서 자라는 속도가 매우 느리기 때문에 감염조직으로부터 병원균을 분리·배양하는 방법을 통해서 진단하기가 쉽지 않다. 또한 토마토 궤양병균은 식물체 내에서 오랜 잠복기를 거친 후에 병징을 나타내기 때문에 방제하기 어려운 세균병 중에 하나이므로 발병 시 신속한 진단을 통해 빠른 방제가 이루어져야 한다. 본 연구에서는 토마토 궤양병균의 검출을 위한 특이 프라이머를 제작함으로써 감염 식물체의 direct PCR을 통해 토마토 궤양병에 대한 빠르고 정확한 진단이 가능하도록 하였다. 새로 개발된 CmmF와 CmmR 프라이머 세트에 PCR을 수행했을 때, 토마토 궤양병균의 16-23S ribosomal RNA intergenic spacer 영역에서 약 165 bp의 단일 밴드가 특이적으로 증폭되었다. 반면에 토마토 궤양병균과 유연관계에 있는 고추 궤양병균이나 다른 *Clavibacter* 종 세균에서는 전혀 증폭되지 않는 것을 확인할 수 있었다. 이 방법은 감염 식물체로부터 DNA를 추출하지 않더라도 감염조직의 즙액에서 바로 토마토 궤양병균의 DNA 증폭이 가능하고 총 진단시간을 줄일 수 있다는 이점이 있기 때문에 토마토 궤양병의 진단에 유용하게 사용될 수 있을 것으로 판단된다.

Conflicts of Interest

No potential conflict of interest relevant to this article was reported.

Acknowledgement

This work was carried out with the support of the "Cooperative Research Program for Agriculture Science & Technology Development (Project No. PJ01205101), Rural Development Administration, Republic of Korea

References

- Bach, H. J., Jessen, I., Schloter, M. and Munch, J. C. 2003. A TaqMan-PCR protocol for quantification and differentiation of the phytopathogenic *Clavibacter michiganensis* subspecies. *J. Microbiol. Methods* 52: 85-91.
- Choi, J. E., Yoo, S. J. and Kim, H. G. 1997. Factors affecting development of bacterial canker and disease control strategy. *Plant Dis. Agric.* 3: 1-4. URL <http://ext.newnonmun.com/indexDownloadOpen.php?type=view&a=393701#> [13 December 2018]. (In Korean)
- de León, L., Siverio, F., López, M. M. and Rodríguez, A. 2011. *Clavibacter michiganensis* subsp. *michiganensis*, a seedborne tomato pathogen: healthy seeds are still the goal. *Plant Dis.* 95: 1328-1338.
- Dreier, J., Bermpohl, A. and Eichenlaub, R. 1995. Southern hybridization and PCR for specific detection of phytopathogenic *Clavibacter michiganensis* subsp. *michiganensis*. *Phytopathology* 85: 462-468.
- Fatmi, M. and Schaad, N. W. 1988. Semiselective agar medium for isolation of *Clavibacter michiganensis* subsp. *michiganensis* from tomato seed. *Phytopathology* 78: 121-126.
- Ftayeh, R. M., von Tiedemann, A. and Rudolph, K. W. E. 2011. A new selective medium for isolation of *Clavibacter michiganensis* subsp. *michiganensis* from tomato plants and seed. *Phytopathology* 101: 1355-1364.
- Gitaitis, R. D., Beaver, R. W. and Voloudakis, A. E. 1991. Detection of *Clavibacter michiganensis* subsp. *michiganensis* in symptomless tomato. *Plant Dis.* 75: 834-838.
- Hadas, R., Kritzman, G., Klietman, F., Gefen, T. and Manulis, S. 2005. Comparison of extraction procedures and determination of the detection threshold for *Clavibacter michiganensis* ssp. *michiganensis* in tomato seeds. *Plant Pathol.* 54: 643-649.
- Kaneshiro, W. S., Mizumoto, C. Y. and Alvarez, A. M. 2006. Differentiation of *Clavibacter michiganensis* subsp. *michiganensis* from seed-borne saprophyte using ELISA, Biolog and 16S rDNA sequencing. *Eur. J. Plant Pathol.* 116: 45-56.
- Kokosková, B., Mráz, I. and Fousek, J. 2010. Comparison of specificity and sensitivity of immunochemical and molecular techniques for determination of *Clavibacter michiganensis* subsp. *michiganensis*. *Folia Microbiol.* 55: 239-244.
- Louws, F. J., Rademaker, J. L. W. and de Bruijn, F. J. 1999. The three Ds of PCR-based genomic analysis of phytopathogenic bacteria: Diversity, detection, and disease diagnosis. *Annu. Rev. Phytopathol.* 37: 81-125.
- Li, X., Tambong, J., Yuan, K., Chen, W., Xu, H., Lévesque, C. A. et al. 2018. Re-classification of *Clavibacter michiganensis* subspecies on the basis of whole-genome and multi-locus sequence analyses. *Int. J. Syst. Evol. Microbiol.* 68: 234-240.
- Luo, L. X., Walters, C., Bolkan, H., Liu, X. L. and Li, J. Q. 2008. Quantification of visible cells of *Clavibacter michiganensis* subsp. *michiganensis* using a DNA binding dye and a real-time PCR assay. *Plant Pathol.* 57: 332-337.
- Myung, I. S., Kim, D. G., An, S. H., Kee, Y. K. and Kim, W.G. 2008. First report of bacterial canker of tomato caused by *Clavibacter michiganensis* subsp. *michiganensis* in Korea. *Plant Dis.* 92: 1472.
- Pastrik, K. H. and Rainey, F. A. 1999. Identification of *Clavibacter michiganensis* subspecies by polymerase chain reaction-based techniques. *J. Phytopathol.* 147: 687-693.

- Santos, M. S., Cruz, L., Norskov, P. and Rasmussen, O. F. 1997. A rapid and sensitive detection of *Clavibacter michiganensis* subsp. *michiganensis* in tomato seeds by polymerase chain reaction. *Seed Sci. Technol.* 25: 581-584.
- Smith, E. F. 1910. A new tomato disease of economic importance. *Science* 31: 794-796.
- Yasuhara-Bell, J., de Silva, A., Heuchelin, S. A., Chaky, J. L. and Alvariz, A. M. 2016. Detection of Goss's wilt pathogen *Clavibacter michiganensis* subsp. *nebraskensis* in maize by loop-mediated amplification. *Phytopathology* 106: 226-235.
- Zhao, W. J., Chen, H. Y. Zhu, S. F., Xia, M. X. and Tan, T. W. 2007. One-step detection of *Clavibacter michiganensis* subsp. *michiganensis* in symptomless tomato seeds using a TaqMan probe. *J. Plant Pathol.* 89: 349-351.