

Metodyka pobierania próbek materiału szkółkarskiego do badań laboratoryjnych na obecność bakterii *Erwinia amylovora*

Rośliny testowane:

Grusza – *Pyrus L* i pigwa *Cydonia oblonga Mill.*

Bakteria *E. amylovora* jest polifagiem i poraża ponad 130 gatunków roślin, głównie z rodziny różowate. Może żyć na roślinach zakażając je (jako pasożyt), co prowadzi do zamierania porażonych organów, ale także – przynajmniej przez pewien czas – może przeżywać na ich powierzchni bez zakażenia (jako epifit). Bezobjawowo porażony materiał szkółkarski jest uważany za jeden z głównych czynników rozprzestrzeniania bakterii.

W prawodawstwie Unii Europejskiej, *E. amylovora*, dla roślin do sadzenia rodzaju *Pyrus L.* oraz gatunku *Cydonia oblonga Mill.* ma status regulowanego agrofaga niekwarantannowego i jest także uznawana za agrofag kwarantanny dla stref chronionych utworzonych ze względu na tę bakterię. (Sobiczewski, Bielicki, 2022). W Polsce obowiązują rozporządzenia Ministra Rolnictwa i Rozwoju Wsi z dnia 31 marca 2017 r., poz. 757 w sprawie szczegółowych wymagań dotyczących wytwarzania i jakości materiału szkółkarskiego oraz z dnia 3 lipca 2020 r., poz. 1244 zmieniające rozporządzenie w sprawie szczegółowych wymagań dotyczących wytwarzania i jakości materiału szkółkarskiego.

E. amylovora jest sprawcą zarazy ogniowej, choroby której pierwsze objawy na **gruszy** można zaobserwować już wiosną na kwiatach (sady zrażnikowe). Organy te są początkowo jakby przesycone wodą, następnie gwałtownie więdną, kurczą się i zamierają, zmieniając zabarwienie na ciemnobrunatne do czarnego. Na brzegach liści, wokół nerwu głównego lub między nerwami bocznymi pojawiają się brunatne, które z czasem powiększają się i mogą objąć całą blaszkę liściową. Porażone liście kurczą się i często zwijają wzdłuż głównego nerwu do środka. Mogą nie opadać nawet do zimy. Młode pędy (sady zrażnikowe, szkółki, mateczniki) są najczęściej bezpośrednio zakażane, więdną od wierzchołka, często zakrzywiając się na kształt pastorału i – podobnie jak liście – brunatnieją i zamierają. Na gałęziach i pniu drzew powstają charakterystyczne zgorzele. W miejscu porażenia kora jest początkowo nabrzmiąta i uwodniona, później zapada się, ciemnieje i zasycha, a pod koniec lata może charakterystycznie pękać. Kształt zgorzeli najczęściej jest zbliżony do elipsy o poszarpanych brzegach, czasem przypomina klin skierowany podstawą do góry. Porażonym organom może towarzyszyć wyciek bakteryjny – początkowo szarobiały, z czasem przybierający zabarwienie pomarańczowe i bursztynowe. Objawy zarazy ogniowej, jeśli nie towarzyszy im charakterystyczny wyciek bakteryjny, można niekiedy pomylić z innymi chorobami czy

uszkodzeniami powodowanymi przez entomofagi i mróz (Sobiczewski i in. 1998; Sobiczewski, Schollenberger, 2002).

Objawy zarazy ogniowej w matecznikach **pigwy** występują na pędach i liściach. Są podobne do tych na gruszy, z tym że przebarwienie jest czerwone lub czerwono-brunatne.

Termin pobierania próbek

Próbki różnych organów nadziemnej części **gruszy i pigwy** powinny być pobrane do badań diagnostycznych możliwie najwcześniej po zauważeniu objawów chorobowych. Bardzo ważne jest prowadzenie lustracji sadów zraźnikowych, szkółek i mateczników w okresie wegetacji, możliwie co 7-10 dni. Jeśli podczas lustracji nie zaobserwowano objawów zarazy ogniowej, nie jest wymagane pobieranie próbek na obecność bakterii *E. amylovora*. W uzasadnionych przypadkach, zwłaszcza jeśli występują objawy podobne do zarazy ogniowej lub też choroba została wykryta w sąsiedztwie lustrwanej plantacji, konieczne jest pobranie próbek do badań laboratoryjnych.

Wybór tkanki/części rośliny do testowania

Bakterie izoluje się z pogranicza między pozornie zdrową a zmienioną chorobowo tkanką. W zasadzie bakterie nie żyją na/w tkance zmarłej.

Sposób pobierania próbek:

Próbki do badań powinny być pobierane (wycinane) w sposób aseptyczny, tzn. sterylnymi narzędziami, takimi jak nóż czy sekator, a następnie umieszczane w torebkach plastikowych zabezpieczających również przed wysychaniem. Jeśli okres między pobraniem próbki, a wykonaniem analizy diagnostycznej będzie dłuższy, np. 2-3 dni, to w torebce z próbką można umieścić tampon z waty nasączony wodą.

- każda próbka powinna być oznaczona (zaetykietowana) z podaniem daty i miejsca pobrania (pochodzenia),
- w przypadku znacznej odległości miejsca pobrania próbki od laboratorium oraz warunków otoczenia (temperatury powyżej 25°C) zaleca się jej umieszczenie w pojemniku z wkładem chłodzącym, jednak nie można doprowadzić do zamrożenia próbek,
- po dostarczeniu do laboratorium próbki należy je umieścić w lodówce (do 4-10°C),
- do pobranej próbki (próbek) należy dołączyć zlecenie na wykonanie badań laboratoryjnych, którego formularz można pobrać ze strony internetowej Wojewódzkiego inspektoratu Ochrony Roślin i Nasiennictwa (piorin.gov.pl). Ponadto należy sporządzić i przechowywać przez 3 lata kopię "Zlecenia" oraz pisemną informację zawierającą dodatkowe dane, o ile nie zostały podane w "Zleceniu":

Rodzaj uprawy (gatunek, odmiana, ew. typ, wiek roślin)	
Rodzaj pobranego materiału, np. pęd	
Plan (szkic) lub opis umożliwiający jednoznaczne odnalezienie roślin w terenie, z których pobrano próbkę	
Dodatkowe informacje: m.in. opis i nasilenie objawów, ewentualne występowanie innych podejrzanych objawów, w tym etiologicznych, a także rozpoznanych źródeł infekcji w pobliżu chorych roślin, np. dzikorosnących głógów czy jarzębin.	

Metody laboratoryjne wykrywania *E. amylovora* w próbce materiału roślinnego

1/ Metoda konwencjonalna: wybrane miejsce izolacji bakterii (pogranicze między chorą a pozornie zdrową tkanką) należy zdezynfekować, po czym wyciąć kawałki tkanki (kilka skrawków) o powierzchni około 0,5 cm² i umieścić je w sterylnej szalce Petriego zalewając około 1 ml sterylnej wody destylowanej lub roztworu fizjologicznego. Po dokładnym rozdrobnieniu skrawków powstały macerat należy przenieść na pożywkę agarową (agar odżywczy z sacharozą, King B) wykonując posiew redukcyjny w celu uzyskania pojedynczych kolonii bakterii. Po inkubacji w temperaturze ok 25°C przez 48 godzin należy przeanalizować cechy morfologiczne kolonii i przeprowadzić testy patogeniczności (reakcja nadwrażliwości na tytoniu oraz inokulacja zawiązków owoców gruszy), (Sobiczewski i in. 1998; DP13, 2016).

2/ Metody serologiczne: test aglutynacji, test ELISA, immunofluorescencja (Sobiczewski in. 1998; Lopez i in. 2006, 2010; DP 13, 2016, EPPO 2021).

3/ Metody biologii molekularnej: hybrydyzacja kwasów nukleinowych, łańcuchowa reakcja polimerazy (PCR) (Sobiczewski i in. 1998; Puławska i in. 1997, 2002, 2009; Llop i in. 1999 2000).

W przypadku, gdy planowany jest eksport materiału szkółkarskiego do krajów trzecich, należy spełnić wymagania fitosanitarne kraju, do którego materiał będzie wysyłany.

W przypadku, gdy planowane jest przemieszczanie materiału do strefy chronionej ustanowionej w Unii dla tego agrofaga (lista w załączniku III do Rozp. 2019/2072), należy spełnić szczegółowe wymagania określone w przepisach dot. stref chronionych (załącznik X do Rozp. 2019/2072).

Literatura

- DP 13: *Erwinia amylovora* ISPM 27 Diagnostic protocols for regulated pests. 2016. International Plant protection Convention, ISPM 27, Anex 13.
- EPPO (2021) *Erwinia amylovora*. EPPO datasheets on pests recommended for regulation. <https://gd.eppo.int>
- Llop, P., Bonaterra, A., Peñalver, J. & López, M.M. 2000. Development of a highly sensitive nested-PCR procedure using a single closed tube for detection of *Erwinia amylovora* in asymptomatic plant material. *Applied and Environmental Microbiology*, 66: 2071–2078.

Data publikacji (umieszczenia na stronie internetowej): 08.06.2022 r.

- Llop, P., Caruso, P., Cubero, J., Morente, C. & López, M.M. 1999. A simple extraction procedure for efficient routine detection of pathogenic bacteria in plant material by polymerase chain reaction. *Journal of Microbiological Methods*, 37: 23–31.
- López, M.M., Llop, P., Gorris, M.T., Keck, M., Peñalver, J., Donat, V. & Cambra, M. 2006. European protocol for diagnosis of *Erwinia amylovora*. *Acta Horticulturae*, 704: 99–103.
- López, M.M., Peñalver, J., Arilla, A., Morente, C., Dreo, T., Pirc, M., Poliakoff, F., Dousset, C., Visage, M., Achbani, E., Bergsma-Vlami, M., Drenova, N., Duffy, B., Marín, M., Meekes, E., Moumni, M., Obradovic, A., Palomo, J., Taylor, R., Stockwell, V. & Reisenzein, H. 2010. Ring test evaluation of techniques for *Erwinia amylovora* diagnosis and detections. ISHS 12th International Workshop on Fire Blight. Warsaw, Poland, 16–20 August 2010, abstract 18
- Puławska J, M. Maes, T. Deckers, P. Sobiczewski. 1997. The influence of pesticide contamination on detection of epiphytic *Erwinia amylovora* using PCR. *Med.Fac. Landbouww. Univ. Gent*, 62/3b: 959-962.
- Puławska J., P. Sobiczewski, S. Berczyński, H. Bagińska. 2002. Diagnostyka zarazy ogniowej (*Erwinia amylovora*) – metody stosowane w Polsce, a wymogi Unii Europejskiej. *Progress in Plant Protection/Postępy w Ochronie Roślin* vol. 42, 75-82.
- Puławska J., K.Kielak, P. Sobiczewski. 2009. Bioróżnorodność *Erwinia amylovora* – sprawcy zarazy ogniowej. *Postępy Mikrobiologii*, 48, 2: 133-141
- Sobiczewski P., S. Berczyński, H. Bagińska, M. Kordyla-Bronka, J. Puławska. 1998. Diagnostyka zarazy ogniowej (*Erwinia amylovora*) Burrill, Winslow et al. *Wyd. PIOR Główny Inspektorat, Warszawa oraz Instytut Sadownictwa i Kwiaciarnictwa, Skierniewice*, str. 42.
- Sobiczewski P., M. Schollenberger. 2002. Bakteryjne choroby roślin ogrodniczych. *PWRiL Warszawa*, 156 + 31 s.
- Sobiczewski P., P. Bielicki 2022. Nowy status sprawcy zarazy ogniowej. *MP Sad.4*, 40-47.



Więdnięcie i zbrunatnienie liści gruszy w pierwszym etapie rozwoju choroby



Charakterystycznie zwinięte do środka liście na porażonej gruszy



Zamarłe drzewko gruszy od infekcji po przyciętych pędach



Zamierający przewodnik gruszy od infekcji przez kwiaty



Silnie porażone drzewo gruszy przyjmuje wygląd jakby po traktowaniu miotaczem ognia



Kształt zgorzeli na zdrewniałych organach może przypominać elipsę o poszarpanych brzegach (pierwsze z lewej) lub klin skierowany podstawą do góry (z prawej)



Kształt zgorzeli może być także nieregularny



Porażone liście i pędy pigwy (z prawej odrost korzeniowy)

Opracował prof. dr hab. Piotr Sobiczewski, email: piotr.sobiczewski@inhort.pl

Data publikacji (umieszczenia na stronie internetowej): 08.06.2022 r.