

Metodyka pobierania prób materiału szkółkarskiego do oceny laboratoryjnej na obecność *Xanthomonas fragariae*

Rośliny testowane: **Truskawka – *Fragaria x ananassa* Duchesne L**

Xanthomonas fragariae wywołuje baterijną kanciastą plamistość liści truskawki. Rośliną żywicielską dla *X. fragariae* jest *Fragaria x ananassa*, jej rodzice *Fragaria chiloensis* i *Fragaria virginiana*, oraz różne dzikie truskawki jak np *Fragaria vesca*. Na liściach choroba objawia się początkowo w postaci małych, nieregularnych, uwodnionych, brunatno-czerwonych plam rozwijających się po spodniej stronie blaszki liściowej. Plamy mogą powiększać się i zlewać tworząc rozleglejsze nekrotyczne obszary, rozprzestrzeniające się także na górną stronę liścia. Z czasem na liściach pojawiają się kanciaste, duże nieregularne nekrozy i niekiedy ciemne uwodnione unerwienia liści. Plamy są zwykle błyszczące z powodu występowania na nich śluzu bakteryjnego. Z czasem wysychają i ulegają rozerwaniu, przez co porażony liść może mieć postrzępiony wygląd. Charakterystyczne przeświecające plamy na liściach, oglądane w świetle przechodzącym, są ważną cechą diagnostyczną choroby. Choroba występuje powszechnie w szkółkach wielu krajów, a w Europie jest przyczyną poważnych strat w produkcji truskawki (Bosshard i Schwind, 1997). *X. fragariae* łatwo ulega przenoszeniu na większe odległości wraz z zainfekowanymi roślinami nie wykazującymi objawów choroby. W obrębie szkółki, bakterie patogeniczne rozprzestrzeniają wraz z deszczem lub wodą z nawadniania typu deszczownia, a objawy pojawiają się w sprzyjających warunkach. Objawy mogą się również rozwijać w czasie przechowywania w niskiej temperaturze (Rat, 1993). Ciężkie infekcje mogą się rozprzestrzenić na koronę, gdzie na przekroju można obserwować uwodnione

plamy. Rośliny z zainfekowaną koroną mają mniejszy wigor, a w niektórych przypadkach zamierają.

Termin pobierania prób

Obserwacje roślin truskawki i pobieranie prób polowych należy prowadzić w miesiącach maj-wrzesień, gdy objawy choroby występują w największym nasileniu. W maju i czerwcu należy zwrócić uwagę na występowanie uwodnionych, brunatnoczerwonych plam rozwijających się na dolnej stronie blaszki liściowej. W późniejszych miesiącach należy zwracać uwagę na powiększające i zlewające się plamy, tworzące rozleglejsze obszary nekrotyczne, rozprzestrzeniające się także na górną stronę blaszki liściowej, a także na duże, nieregularne, kanciaste nekrozy i zabarwienie unerwienia liści, które staje się ciemne i uwodnione (Anonim, 2023). Objawy na liściach należy obserwować pod światło w poszukiwaniu charakterystycznych przeświecających plam o kanciastym kształcie. W sierpniu i wrześniu należy obserwować również występowanie wysychających, postrzępionych liści. Ciężkie infekcje mogą się rozprzestrzenić na koronę, gdzie na przekroju można obserwować uwodnione plamy. Rośliny z zainfekowaną koroną mają mniejszy wigor, a w niektórych przypadkach zamierają.

Wybór tkanki/części rośliny do testowania

W przypadku roślin wykazujących objawy chorobowe należy wybrać rośliny – liście i ogonki liściowe, z wczesnymi objawami (wodniste plamy na spodniej stronie liści) oraz korony. Alternatywnie mogą być pobrane liście ze starszymi, suchymi plamami.

Próby, które nie wykazują objawów można poddać badaniu indywidualnie lub w grupach do 50 roślin (ogonki liściowe i korony). Jeśli przeprowadzane są lustracje powinny one bazować na próbkach statystycznie reprezentatywnych

Pobrane próby należy umieszczać w odpowiednio oznakowanych torebkach foliowych. Zaleca się, aby próby przechowywać i transportować do laboratorium w niskiej temperaturze np. w tzw. lodówce turystycznej lub pojemniku styropianowym z wkładem chłodzącym. Nie należy dopuścić do zamrożenia prób. Próby można wysłać do laboratorium pocztą/kurierem, tak aby dotarły w ciągu 1-go dnia od wysyłki. Muszą być zabezpieczone przed wyschnięciem. Po dostarczeniu prób do

laboratorium, umieścić je w temperaturze (+4°C do +10°C) i przechowywać w warunkach chłodni maksymalnie przez okres 2-3 dni.

Pobrane próby przekazać do badań laboratoryjnych załączając zlecenie na wykonanie badań, którego formularz można pobrać ze strony internetowej Państwowej Inspekcji Ochrony Roślin i Nasiennictwa (piorin.gov.pl). Dodatkowo należy sporządzić i przechowywać przez 3 lata kopię "Zlecenia" oraz informację zawierającą dodatkowe dane, o ile nie zostały podane w "Zleceniu".

Data pobrania próby (dd mm rrrr)	
Dane producenta: • imię i nazwisko • adres kontaktowy • telefon • e-mail	
Adres plantacji	
Rodzaj uprawy (gatunek, odmiana, ew. typ, wiek roślin)	
Rodzaj pobranego materiału (na przykład: liście, kwiaty)	
Plan (szkic) lub opis umożliwiający jednoznaczne odnalezienie roślin w terenie, z których pobierano próby	
Dodatkowe informacje dotyczące m.in. występowania podejrzanych symptomów, chorób, szkodników, lub rozpoznanych źródeł infekcji w pobliżu badanych roślin	

Metody laboratoryjne wykrywania i identyfikacji bakterii *Xanthomonas fragariae*

Wg Protokołu diagnostycznego EPPO PM 7/65 (2)

Zależnie od tego, czy do laboratorium dostarczono próby z objawami czy bez, przygotowanie prób powinno być zgodne z wytycznymi w standardzie EPPO PM 7/65 (2).

Do wykrywania *X. fragariae* należy stosować co najmniej dwa testy spośród: i/izolacja bakterii na podłoże Wilbrink-N – jednak w związku z tym, że *X. fragariae* są wolno rosnącymi bakteriami jest to metoda obciążona dużym ryzykiem wyniku fałszywie negatywnego ; ii/ test immunofluorescencji; iii/ konwencjonalny PCR; iv/ real time PCR, v/ LAMP.

Literatura:

(2023) PM 7/65 (2) *Xanthomonas fragariae*. EPPO Bulletin, 53, 184–204. Available from: <https://doi.org/10.1111/epp.12916>

Bosshard E & Schwind M (1997) Detection of different bacterial and fungal pathogens in apparently healthy strawberry plants. In: Diagnosis and Identification of Plant Pathogens (Ed. H-W Dehne, et al.), pp. 37–41. Kluwer, Dordrecht (NL).

Pooler MR, Ritchie DF & Hartung JS (1996) Genetic relationships among strains of *Xanthomonas fragariae* based on random amplified polymorphic DNA PCR, repetitive extragenic palindromic PCR, and enterobacterial repetitive intergenic consensus PCR data and generation of multiplexed PCR primers useful for the identification of this phytopathogen. *Applied and Environmental Microbiology* **62**, 3121–3127.

Rat B (1993) *Xanthomonas fragariae*: causal agent of angular leaf spot of strawberry. In: *Xanthomonas* (Ed. Swings, JG & Civerolo, EL), pp. 69–70. Chapman & Hall, London (GB).

Stoger A & Ruppitsch W (2004) A rapid and sensitive method for the detection of *Xanthomonas fragariae*, causal agent of angular leafspot disease in strawberry plants. *Journal of Microbiological Methods* **58**, 281–284.

Objaśnienia skrótów użytych w tekście:

PCR = Polymerase Chain Reaction = łańcuchowa reakcja polimerazy

LAMP = Loop mediated isothermal amplification = izotermalna amplifikacja DNA za pośrednictwem pętli

Opracowanie: prof. dr hab. Joanna Puławska; e-mail: joanna.pulawska@inhort.pl