

Organisation Européenne et Méditerranéenne pour la Protection des Plantes  
Europejska i Śródziemnomorska Organizacja Ochrony Roślin

## **Normes OEPP Standardy EPPO**

Protokoły diagnostyczne  
dla agrofagów podlegających przepisom  
Protocoles de diagnostic pour les organismes réglementés

PM 7/22



Organisation Européenne et Méditerranéenne pour la Protection des Plantes  
1, rue Le Nôtre, 75016 Paris, France

## **Zatwierdzenie**

Standardy są zatwierdzone przez Radę EPPO. Na każdym ze standardów umieszczona jest data zatwierdzenia. W znaczeniu Artykułu II IPPC, Standardy EPPO są uznane za Regionalne Standardy dla członków EPPO.

## **Przegląd**

Standardy EPPO podlegają okresowej recenzji i poprawkom. Data następnej recenzji tego Standardu została uzgodniona na spotkaniu grupy roboczej EPPO dotyczącym działań fitosanitarnych.

## **Nowelizacja**

Jeśli zaistnieje konieczność, zostaną wprowadzone ponumerowane i datowane zmiany nowelizacyjne. Na każdym ze standardów (jeśli to konieczne) umieszczone są daty nowelizacji.

## **Dystrybucja**

Dystrybucja Standardów EPPO do władz państw członkowskich odbywa się poprzez Sekretariat EPPO. Egzemplarze są dostępne dla każdej zainteresowanej osoby pod warunkiem wystąpienia z prośbą do Sekretariatu EPPO.

## **Zakres**

Protokoły diagnostyczne EPPO dotyczące agrofagów podlegających przepisom są przeznaczone do użytku dla Państwowych Organizacji Ochrony Roślin (NPPO) jako ciał odpowiedzialnych za stosowanie działań fitosanitarnych w celu wykrycia i zidentyfikowania agrofagów podlegających przepisom w EPPO i/lub liście Unii Europejskiej.

W 1998 EPPO rozpoczęła nowy program przygotowywania protokołów diagnostycznych dla agrofagów podlegających przepisom w regionie EPPO (włączając kraje Unii Europejskiej). Pracą kieruje Panel Diagnostyczny EPPO oraz inne specjalistyczne Panele. Celem programu jest utworzenie dla każdego agrofaga podlegającego przepisom zatwierdzonego międzynarodowego protokołu diagnostycznego. Protokoły bazują na wieloletnich doświadczeniach ekspertów EPPO. Pierwsze projekty są przygotowywane przez wyznaczonego eksperta – autora(ów). Są one napisane zgodnie z „ogólnym formatem i zawartością protokołu diagnostycznego”, zatwierdzone przez Panel Diagnostyczny, dostosowane odpowiednio do poszczególnych agrofagów, jeśli to konieczne. Główną rolą protokołu jest wskazanie szczegółowych sposobów wykrywania lub identyfikacji, które zostały uznane za lepsze (niezawodność, łatwość w użyciu itd.) od innych metod. Inne metody mogą być również wymienione, wskazując na ich wady i zalety. Jeśli jest wykorzystywana jakaś metoda nie wymieniona w protokole należy to wytłumaczyć.

We wszystkich EPPO Standardach dotyczących diagnostyki mają zastosowanie następujące ogólne warunki:

- testy laboratoryjne mogą wymagać użycia odczynników lub urządzeń, które stanowią określone zagrożenie. We wszystkich przypadkach należy ściśle stosować lokalne procedury dotyczące bezpieczeństwa
- użyte w standardach EPPO nazwy odczynników lub wyposażenia nie znaczą wykluczenia innych odczynników czy wyposażenia, które również mogą być przydatne
- procedury laboratoryjne przedstawione w protokołach mogą być dostosowane do standardów poszczególnych laboratoriów, pod warunkiem, że są one odpowiednio zwalidowane lub, że zostały włączone stosowne kontrole pozytywne i negatywne.

## **Materiały źródłowe<sup>1</sup>**

- EPPO/CABI (1996) Agrofagi kwarantannowe Europy, Wydanie II. CAB International, Wallingford (Wielka Brytania). [EPPO/CABI (1996) Quarantine Pests for Europe, 2nd end. CAB International, Wallingford (GB).]
- EU (2000) Dyrektywa Rady 2000/29/EC z 8 Maja 2000 r. dotycząca środków zapobiegających wprowadzeniu na teren Wspólnoty organizmów szkodliwych dla roślin lub produktów roślinnych i ich rozprzestrzenieniu w obrębie Wspólnoty, Official Journal of the European Communities L169, 1 –112. [EU (2000) Council Directive 2000/29/EC of 8 May 2000 on protective measures against the introduction into the Community of organisms harmful to plants or plant products and against their spread within the Community. Official Journal of the European Communities L169, 1–112.]
- FAO (1997) Międzynarodowa Konwencja Ochrony Roślin (tekst nowy, poprawiony). FAO, Rzym (Włochy). FAO (1997) [International Plant Protection Convention (new revised text). FAO, Rome (IT).]
- IPPC (1993) Zasady kwarantanny roślin w odniesieniu do handlu międzynarodowego ISPM nr 1. Sekretariat IPPC, FAO, Rzym (Włochy). [IPPC (1993) Principles of plant quarantine as related to international trade ISPM no. 1. IPPC Secretariat, FAO, Rome (IT).]
- IPPC (2002) Słownik terminów fitosanitarnych ISPM nr 5. Sekretariat IPPC, FAO, Rzym (Włochy). [IPPC (2002) Glossary of phytosanitary terms. ISPM no. 5. IPPC Secretariat, FAO, Rome (IT).]
- OEPP/ EPPO (2003) Standardy EPPO PM 1/2(12): EPPO Lista A1 i A2 agrofagów podlegających obowiązkowi zwalczania. Standardy EPPO PM1 Ogólne środki fitosanitarne, 5 –17. OEPP/ EPPO, Paryż. [OEPP/EPPO (2003) EPPO Standards PM 1/2 (12): EPPO A1 and A2 lists of quarantine pests. EPPO Standards PM1 General phytosanitary measures, 5–17. OEPP/EPPO, Paris.]

## **Definicje**

Agrofag podlegający przepisom: agrofag kwarantannowy lub agrofag niekwarantannowy podlegający przepisom.

Agrofag kwarantannowy: agrofag o potencjalnym znaczeniu ekonomicznym dla zagrożonego obszaru, ale jeszcze nie występujący na tym obszarze lub obecny, ale nie rozprzestrzeniony szeroko i podlegający urzędowemu zwalczaniu.

## **Zarys wymagań**

Protokoły diagnostyczne EPPO dotyczące agrofagów podlegających przepisom dostarczają wszystkich niezbędnych informacji dotyczących określonego agrofaga w celu jego wykrycia i prawidłowej identyfikacji dokonanej przez eksperta (np. specjalisty w dziedzinie entomologii, mikologii, wirusologii, bakteriologii itp.). Każdy protokół rozpoczyna się krótką ogólną informacją dotyczącą agrofaga (jego występowania, stosunku do innych organizmów, zakresu żywicieli, uszkodzeń powodowanych na żywicielach, rozmieszczenia geograficznego oraz jego tożsamości) a następnie opisuje szczegóły dotyczące wykrywania, identyfikacji, porównania z podobnymi gatunkami, wymagane w celu przeprowadzenia prawidłowej diagnozy, zawiera wykaz instytucji lub osób gdzie można uzyskać więcej informacji i opinii na temat określonego organizmu, (na temat diagnozy, wykrywania/ metody ekstrakcji, metod testowych).

---

<sup>1</sup> W nawiasach kwadratowych podana oryginalna pisownia. (przyp. tłum.)

## Standardy EPPO z tej serii

Do tej pory zostało zatwierdzonych i opublikowanych dziewiętnaście standardów i protokołów diagnostycznych EPPO. Każdy ze standardów jest ponumerowany w następujący sposób PM 7 / 4 (1), co oznacza, że jest to standard EPPO dotyczący środków fitosanitarnych (PM), numer serii 7 (Protokoły Diagnostyczne), w tym przypadku – standard numer 4, wersja pierwsza. Istnieją następujące standardy:

- PM 7/1(1) *Ceratocystis fagacearum*. *Bulletin OEPP/EPPO Bulletin* **31**, 41–44
- PM 7/2(1) *Tobacco ringspot nepovirus*. *Bulletin OEPP/EPPO Bulletin* **31**, 45–51
- PM 7/3(1) *Thrips palmi*. *Bulletin OEPP/EPPO Bulletin* **31** 53–60
- PM 7/4(1) *Bursaphelenchus xylophilus*. *Bulletin OEPP/EPPO Bulletin* **31**, 61–69
- PM 7/5(1) *Nacobbus aberrans*. *Bulletin OEPP/EPPO Bulletin* **31**, 71–77
- PM 7/6(1) *Chrysanthemum stunt pospiviroid*. *Bulletin OEPP/EPPO Bulletin* **32**, 245–253
- PM 7/7(1) *Aleurocanthus spiniferus*. *Bulletin OEPP/EPPO Bulletin* **32**, 255–259
- PM 7/8 (1) *Aleurocanthus woglumi*. *Bulletin OEPP/EPPO Bulletin* **32**, 261–265
- PM 7/9(1) *Cacoecimorpha pronubana*. *Bulletin OEPP/EPPO Bulletin* **32**, 267–275
- PM 7/10(1) *Cacyreus marshalli*. *Bulletin OEPP/EPPO Bulletin* **32**, 277–279
- PM 7/11(1) *Frankliniella occidentalis*. *Bulletin OEPP/EPPO Bulletin* **32**, 281–292
- PM 7/12(1) *Parasaissetia nigra*. *Bulletin OEPP/EPPO Bulletin* **32**, 293–298
- PM 7/13(1) *Trogoderma granarium*. *Bulletin OEPP/EPPO Bulletin* **32**, 299–310
- PM 7/14(1) *Ceratocystis fimbriata* f. sp. *platani*. *Bulletin OEPP/EPPO Bulletin* **33**, 249–256
- PM 7/15(1) *Ciborinia camelliae*. *Bulletin OEPP/EPPO Bulletin* **33**, 257–264
- PM 7/16(1) *Fusarium oxysporum* f. sp. *albedinis*. *Bulletin OEPP/EPPO Bulletin* **33**, 265–270
- PM 7/17(1) *Guignardia citricarpa*. *Bulletin OEPP/EPPO Bulletin* **33**, 271–280
- PM 7/18(1) *Monilinia fructicola*. *Bulletin OEPP/EPPO Bulletin* **33**, 281–288
- PM 7/19(1) *Helicoverpa armigera*. *Bulletin OEPP/EPPO Bulletin* **33**, 289–296

Niektóre z istniejących Standardów są wynikiem różnych projektów i konsultacji dotyczących procedur. Są wynikiem projektu Komisji Unii Europejskiej DIAGPRO (nr SMT 4-CT 98-2252). Projekt ten obejmował cztery wyznaczone laboratoria (w Anglii, Holandii, Szkocji, Hiszpanii) i 50 laboratoriów porównawczych z wielu krajów europejskich (w obrębie i spoza Unii Europejskiej), które były zaangażowane w badania porównawcze projektu protokołu. Projekt DIAGPRO został utworzony na bazie pełnej wiedzy równoległych działań Grupy Roboczej EPPO dotyczącej Przepisów Fitosanitarnych w projektach protokołów diagnostycznych i obejmującej agrofagi podlegające przepisom, które z tego powodu nie zostały włączone do programu EPPO. Protokoły DIAGPRO zostały zatwierdzone przez Radę EPPO jako Standardy EPPO z serii PM 7. W przyszłości będą one przeznaczone do poprawy przez procedury EPPO w tym samym czasie jak inne z tej samej serii.

**Protokoły diagnostyczne dotyczące agrofagów podlegających przepisom<sup>2</sup>**  
**Protocoles de diagnostic pour les organismes réglementés**

***Xanthomonas arboricola* pv. *corylina***

**Zakres**

Standard opisuje protokół diagnostyczny dla *Xanthomonas arboricola* pv. *corylina*

**Zatwierdzanie i nowelizacja**

Zatwierdzony w 2003-09.

**Wprowadzenie**

Bakterioza orzecha laskowego opisana została po raz pierwszy w USA (Oregon) w 1913 roku na *Corylus maxima*. Następnie, ta sama choroba zanotowana została również na *C. avellana*, najważniejszym produkcyjnym gatunku orzecha laskowego, w następujących krajach europejskich: we Włoszech, Francji, Holandii, Rosji (południowa), Serbii i Montenegro, Szwajcarii, Turcji i Zjednoczonym Królestwie (EPPO/CABI, 1997). Poza Europą, choroba była notowana na *C. avellana* w Algierii, USA (Oregon, Washington), Kanadzie (British Columbia), Chile, Australii (Victoria, Wschodnia Australia). Powoduje uszkodzenia także na *C. pontica* i *C. colurna*. Bakteria posiada ograniczony zakres roślin żywicielskich, porażając tylko *Corylus* spp. Największe straty widoczne są w uprawach *C. avellana* w 1–4 letnich sadach, gdzie notuje się do 10% śmiertelność roślin.

**Tożsamość**

**Nazwa:** *Xanthomonas arboricola* pv. *corylina* (Miller *et al.*) Vauterin *et al.*

**Synonim:** *Xanthomonas campestris* pv. *corylina* (Miller *et al.*) Dye

**Stanowisko taksonomiczne:** Bakterie, Gracilicutes, Proteobacteria

**Komputerowy kod EPPO:** XANTCY

**Kategoria fitosanitarna:** lista A2 EPPO numer 134

**Wykrywanie**

Brak jest technik diagnostycznych (np. ELISA, IFAS, PCR) specjalnie przeznaczonych do rutynowego wykrywania *X. a. corylina*. Nie są produkowane standaryzowane przeciwciała, nie ma też

---

<sup>2</sup> Ryciny w niniejszym standardzie oznaczone „Web Fig.” zostały opublikowane na stronie internetowej EPPO [www.eppo.org](http://www.eppo.org).

selektywnych lub półselektywnych podłoży, które mogłyby pomóc w procedurze izolacji bakterii. Wskutek tego, szybkie wykrywanie patogenu nie jest możliwe, a procedura diagnostyczna nadal polega na obserwacji objawów chorobowych, badaniu mikroskopowym tkanek wykazujących objawy chorobowe, izolacji z roślin przy zastosowaniu zwykłych podłoży dla ksantomonad, testu? patogeniczności i testach potwierdzających.

### **Objawy chorobowe**

Objawy mogą być obserwowane zarówno w szkółkach, jak i w polu (Web Fig.1). Wiosną w szkółkach, na gałązkach starszych niż roczne dostrzega się zamieranie pąków i nekrozy wierzchołków pędów. Później, pędy obumierają całkowicie. Jeżeli patogen nie opasuje pędu całkowicie, może powodować zrakowacenia o długości od 10 –25 cm. Liście wykazują tłuste wielokątne przebarwienia, które mogą następnie zlewać się ze sobą. W polu, wiosną i latem często obserwowane jest zamieranie pąków i powstawanie nowych bocznych pędów, oraz podłużne zrakowacenia. Owoce wykazują typowe objawy 'black heel' i brązowienie. Później okrywa łupiny wykazuje tłuste uszkodzenia. Organami orzecha laskowego wykazującymi objawy więdnienia bakteryjnego są: liście (drobne nieregularne nekrotyczne uszkodzenia), łupina (okrągłe lub wydłużone czarne nekrotyczne uszkodzenia), okrywa łupiny (oleiste lub nekrotyczne okrągłe plamki o średnicy od 2 do 4 mm), gałązki boczne (częściowe lub całkowite zamieranie, wzdłużne zrakowacenia rozwijające się od pąków), konary (wzdłużne zrakowacenia), odrost (wzdłużne zrakowacenia).

### **Badanie mikroskopowe**

Małe fragmenty (1-2 mm) tkanki roślinnej wykazującej objawy chorobowe bakteriozy (np. oleiste lub nekrotyczne plamki na liściach lub na okrywie łupiny) są cięte i umieszczane w kropli sterylnej soli fizjologicznej (SPS; 0.85% NaCl w wodzie destylowanej) na szkiełku mikroskopowym, przykrywane szkiełkiem nakrywkowym i poddawane badaniu mikroskopowemu w mikroskopie kontrastowo-fazowym. Obserwacja licznych komórek bakteryjnych dyfundujących z tkanki roślinnej wskazuje na wstępną infekcję bakteryjną.

### **Izolacja**

Izolacja patogenu z liści wykazujących objawy chorobowe jest często trudna. Fragmenty tkanki (1–2 mm x 2– 4 mm) pobrane z brzegu uszkodzeń miażdży się w sterylnym moździerzu zawierającym 3 ml SPS. Po 15 min, 100 µl wodnej zawiesiny rozprowadza się na podłożu GYCA (glukoza 10.0 g; wyciąg drożdżowy 5.0 g; węglan wapnia 30.0 g; agar 20.0 g; woda destylowana do 1.0 l) lub na podłożu YPGA (wyciąg drożdżowy 5.0 g; pepton bakteriologiczny 5.0 g; glukoza 10.0 g; agar 20.0 g, woda destylowana do 1.0 l; pH 6.5 –7.0), preferowane do YDC dla izolacji podstawowej. Płytki inkubowane są w 25 –27 °C przez 3 – 4 dni. Śluzowate, żółto zabarwione kolonie o średnicy 2–3 mm z okrągłym brzegiem są wybierane do testu patogeniczności i testów potwierdzających.

W przypadku materiału rozmnożeniowego nie wykazującego objawów chorobowych nie ma metod standaryzowanych. Pąki dające schronienie patogenowi podczas zimy, jak również podczas sezonu wegetacyjnego (Gardan & Devaux, 1987) są przypuszczalnie najlepszym kandydatem organów do wybrania miejsca obecności bakterii. Taka sama jak powyżej procedura izolacji i podłoża hodowlane mogą zostać zastosowane z wykorzystaniem 1-3 pąków na moździerz.

## Identyfikacja

Tabela 1 przedstawia biochemiczną charakterystykę *X. a. corylina* pomocną w identyfikacji izolatów. W celu uzyskania wzrostu na podłożu SQ (Lee et al., 1992), izolaty są posiewane na podłożu SQ (succinic acid disodium salt 10.0 g; kwas chinowy 5.0 g; K<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> 1.5 g; (NH<sub>4</sub>)<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> 1.0 g; agar 15.0 g; woda destylowana do 1 l; pH 7.2–7.5). po autoklawowaniu dodaje się 7.5 ml autoklawowanego roztworu 20% MgSO<sub>4</sub>·7H<sub>2</sub>O. Płytki inkubuje się 4 - 6 dni w temperaturze w 28 °C, dyfuzja ciemnozielonego pigmentu wokół posianych kolonii świadczy o pozytywnym wyniku reakcji.

**Tabela 1** Biochemiczna charakterystyka *Xanthomonas arboricola* pv. *corylina*

Cecha	Wynik	Cecha	Wynik
L- arabinoza	+	Hydroliza eskuliny	+
D-arabinoza	+	Hydroliza skrobi	+
glukoza	+	Wzrost w 35° C	+
galaktoza	+	Test nadwrażliwości na tytoniu (po 48h).	+
mannoza	+	Wzrost na podłożu SQ	+
sacharoza	+	Obecność oksydazy	-
maltoza	+		
trehaloza	+		
celobioza	+		
glicerol	+		
L-ksyloza	-		
D-ksyloza	-		
ramnoza	-		
laktoza	-		
rafinoza	-		
adonitol	-		
mannitol	-		
inulina	-		
sorbitol	-		
dulcytol	-		
erytrytol	-		

## Test patogeniczności

Inokulacja pąków od października do czerwca jest najbardziej odpowiednią metodą do potwierdzenia patogeniczności izolatów podejrzanych o przynależność do *X. a. corylina* (Gardan & Devaux, 1987). Bakterie hodowane przez 48 h na podłożu GYCA zawieszane są w SPS do uzyskania gęstości optycznej odpowiadającej 1 x 10<sup>8</sup> jtk na mililitr. Pąki nakłuwane są sterylną igłą, i 10 g/L zawiesiny bakteryjnej wprowadzane jest przez zranienie. Rozwój objawów może zmieniać się w ciągu miesiąca od inokulacji. Jednakże, wystąpienia nekrotycznych uszkodzeń można się spodziewać od 14 dnia do jednego miesiąca po inokulacji. Kontrola pozytywna (np. szczep patogeniczny) powinna być dołączona do testu. Inokulacja przez zranienia wzdłuż gałązek jest mniej pomyślna.

## Materiały odniesienia

Szczep *X. a. corylina*, typ NCPPB 935, wyizolowany w Oregonie (US) z *C. maxima*, wykazuje słabą patogeniczność *C. avellana* i odchylenie fenotypowe i genotypowe od innych szczepów *X. a. corylina* uzyskanych z *C. avellana* (Scortichini et al., 2002). W celu porównania zaleca się używanie szczepu NCPPB 2896, wyizolowanego z *C. avellana* i wykazującego typowe charakterystyczne dla patogenu cechy.

## Możliwość pomyłki z podobnymi gatunkami

*X. a. corylina* jest genetycznie podobny, ale patogenicznie różny od innych patowarów *X. arboricola*: *celebensis*, *fragariae*, *juglandis*, *poinsetticola* typu C, *populi* i *pruni*. Porównanie z tego rodzaju patowarami w celu wykrywania jest jedynie orientacyjne.

## Wymagania dla pozytywnej diagnozy

Procedura wykrywania i identyfikacji opisana w tym protokole jest następująca. Obecność bakterii *X. a. corylina* podejrzewa się, gdy morfologia kultury bakteryjnej i testy potwierdzające są typowe dla patowaru. Ostateczne potwierdzenie wymaga wykonania testu patogeniczności na odmianie *C. avellana* na drodze sztucznej inokulacji.

## Raport z badania

Sprawozdanie z wykonania protokołu powinno zawierać:

- wyniki otrzymane zgodnie z zalecaną procedurą
- informacje i dokumentację dotyczącą pochodzenia zainfekowanego materiału
- opis objawów chorobowych i jeżeli są dostępne jawne próby
- tabele z wynikami przeprowadzonych testów i wyniki porównań ze szczepem referencyjnym
- stosowne komentarze co do pewności lub niepewności identyfikacji.

## Informacje dodatkowe

Dodatkowe informacje na temat organizmu można uzyskać od: M. Scortichini, Istituto Sperimentale per la Frutticoltura, Via di Fioranello, 52.1-00040 Ciampino Aeroporto (Roma), Italy. Tel. +39 0679348147; Fax +39 0679340158; E-mail: mscortichini@hotmail.com.

## Podziękowania

Protokół został napisany w oryginale przez: M. Scortichini, Istituto Sperimentale per la Frutticoltura, Ciampino Aeroporto (Roma) (IT).

## Materiały źródłowe<sup>3</sup>

- EPPO/CABI (1997) *Quarantine Pests for Europe*, 2nd edn. CAB International, Wallingford (GB).
- Gardan L & Devaux M (1987) La bactériose du noisetier (*Xanthomonas campestris* pv. *corylina*): biologie de la bactérie. *Bulletin OEPP/EPPO Bulletin* **17**, 241 – 250.
- Lee YA, Hildebrand DC & Schroth MN (1992) Use of quinate metabolism as a phenotypic property to identify members of *Xanthomonas campestris* DNA homology group 6. *Phytopathology* **82**, 971 – 973.
- Scortichini M, Rossi MP & Marchesi U (2002) Genetic, phenotypic and pathogenic diversity of *Xanthomonas arboricola* pv. *corylina* strains, question the representative nature of the type strain. *Plant Pathology* **51**, 374 – 381.

---

<sup>3</sup> Została zachowana oryginalna pisownia. (przyp. tłum.)



**Ryc. 1.** Typowe plamki powodowane przez *Xanthomonas arboricola* pv. *corylina* na łupinie orzecha laskowego.



<b>Tłumaczenie z jęz. angielskiego:</b>	<b>Sprawdził:</b>	<b>Zatwierdził:</b>
Monika Kordyla-Bronka (GIORiN CL)	Anna Kołodziejaska (GIORiN CL)	Janina Butrymowicz (GIORiN CL)
15.10.2009		