

Diagnostyka¹ Diagnostic

Xanthomonas arboricola pv. *pruni*

Zakres

Standard ten opisuje protokół diagnostyczny dla *Xanthomonas arboricola* pv. *pruni*.

Zatwierdzenie i nowelizacja

Zatwierdzono 2005-09.

Wprowadzenie

Bakterioza drzew pestkowych powodowana przez *Xanthomonas arboricola* pv. *pruni* po raz pierwszy została potwierdzona na śliwie japońskiej w 1903r w Stanach Zjednoczonych (Michigan). Choroba ta obecnie notowana jest prawie na wszystkich kontynentach, tam gdzie uprawiane są drzewa pestkowe. *X. a. pruni* atakuje tylko gatunki należące do rodzaju *Prunus*, a w szczególności uprawy drzew owocowych. Bakteria ta jest najbardziej znana jako patogen śliwy, nektaryny i brzoskwini (Stefani *et al.*, 1989), ale była również notowana jako patogen moreli (Scortichini i Simeone, 1997), migdałowca (Young, 1977), jak również wiśni. Gatunki *Prunus* należące do grupy chińsko-japońskiej (*P. japonica* i *P. salicina*) są na ogół bardziej wrażliwe niż śliwy europejskie (Bazzi *et al.*, 1990; Bazzi i Mazzucchi, 1980, 1984; Topp *et al.*, 1989). Innymi roślinami żywicielskimi są: morela japońska (*P. mume*), chińska dzika brzoskwinia (*P. davidiana*), *P. buergeriana*, *P. crassipes* oraz *P. donarium*. Bakteria atakuje również ozdobne gatunki *Prunus*.

Tożsamość

Nazwa: *Xanthomonas arboricola* pv. *pruni* (Smith, 1903) Vauterin, Hoste, Kersters i Swing 1995.

Synonimy: *Xanthomonas campestris* pv. *pruni* (Smith, 1903) Dye, *Xanthomonas pruni* (Smith) Dowson.

Stanowisko taksonomiczne: Bakteria, Gracilicutes.

Kod komputerowy EPPO: XANTPR.

Kategoria fitosanitarna: Lista EPPO A2 numer 62, Załącznik UE numer II/A2.

¹ Ryciny w niniejszym standardzie oznaczone „Web Fig.” zostały opublikowane na stronie internetowej EPPO www.eppo.org.

Wykrywanie

Objawy chorobowe

Objawy bakteriozy drzew pestkowych można obserwować na liściach, owocach, pędach i gałęziach (EPPO, 1997).

Objawy na liściach

Na liściach brzoskwini infekcja początkowo pojawia się na spodniej stronie blaszki liściowej w postaci małych, jasnozielonych do żółtych okrągłych lub nieregularnych plamistości z jaśniejszym środkiem. Plamistości te szybko stają się widoczne na górnej powierzchni blaszki liściowej ponieważ powiększają się, stają się nieregularne i zmieniają kolor na ciemniejszy stając się ciemnopurpurowe, brązowe lub czarne. Tkanka bezpośrednio je otaczająca przebarwia się na kolor żółty. Powierzchnie liścia dotknięte chorobą wykruszają się, zwykle ma to miejsce po zmianie koloru na ciemniejszy. Powierzchnie te mogą również wykruszyć się przed zmianą koloru nadając liściom wygląd jakby przestrzelonych. Często pozostają ciemne pierścienie porażonej tkanki tworząc ślady przestrzelenia. Plamistości zwykle gromadzą się w rejonie wierzchołka liścia ponieważ bakteria skupia się w okolicy, gdzie zbierają się krople deszczu lub rosy. Wraz z plamistościami może pojawić się śluz bakteryjny. Silnie porażone liście stają się żółte i opadają. W przypadku porażenia brzoskwini odnotowano nietypowe objawy, gdzie pojawiają się szare plamistości na górnej powierzchni blaszki liściowej, a bakteria przenika duże powierzchnie liścia, powodując, że staje się on zielono-żółty i przeświecający. W przypadku drzew należących do odmian wrażliwych może mieć miejsce silna defoliacja powodując powstawanie pod drzewami dywanu z żółtych, chlorotycznych liści. W przypadku porażenia liści śliw początkowe objawy polegają na powstaniu kanciastych, wodnistych plam, które bardzo szybko stają się czerwobrązowe, a następnie ciemnobrązowe i nekrotyczne, podczas gdy chloroza jest minimalna i pojawia się dużo rzadziej niż w przypadku liści brzoskwini. Nekrotyczne plamistości często ulegają dziurawieniu co powoduje powstawanie efektu przestrzelenia. Objawy chorobowe na liściach migdałowca, moreli i wiśni są podobne do objawów występujących na brzoskwini lecz mają one mniejsze znaczenie.

Objawy bakteriozy drzew pestkowych występujące na liściach mogą być czasami mylone z uszkodzeniami powodowanymi przez choroby grzybowe lub preparaty miedziowe. Jednakże uszkodzenia powstałe w wyniku działania preparatów miedziowych są większe (średnica 2–6 mm) i mają często okrągły kształt.

Objawy na owocach

Na powierzchni owoców brzoskwini występują małe, okrągłe, brązowe plamistości. Plamistości te stają się wklęsłe, brzegi ich są często wodniste i otoczone jasnozielonymi obwódkami, które dają owocom marmurkowy wygląd. W wyniku naturalnego powiększania się owoców następuje zapadanie się i pęknięcie powstałych plam. Powstałe spęknięcia są często bardzo małe i trudne do zaobserwowania, ale w przypadku wystąpienia silnej infekcji młode owoce mogą mieć poważne uszkodzenia na dużej powierzchni. Po opadach deszczu może dojść do wycieków gumy z uszkodzeń bakteryjnych, które można łatwo pomylić z uszkodzeniami powodowanymi przez owady. Podobne objawy mogą występować na moreli i migdałowcu. W przypadku owoców śliwy objawy mogą być całkowicie odmienne; dla niektórych odmian są to duże, wklęsłe czarne uszkodzenia, podczas gdy dla innych odmian są to tylko małe uszkodzenia w postaci wgłębień. W przypadku wiśni wczesna infekcja owoców powoduje ich deformację, a bakterie można znaleźć od powierzchni skórki aż do pestki.

Ogólna zasada jest taka, że objawy na owocach pojawiają się w ciągu 3-5 tygodni po opadnięciu płatków i rozwijają się aż do momentu zmiany zabarwienia skórki, kiedy zaczyna się proces dojrzewania i niektóre parametry fizykochemiczne ulegają zmianie. Często objawy pojawiają

się po uszkodzeniach spowodowanych gradem.

Objawy na pędach

Na pędach brzoskwini, wiosenne zrakowacenia pojawiają się w częściach wierzchołkowych pędów, które przezimowały oraz na kielkach przed wypuszczeniem zielonych gałązek. Początkowo są to małe, wodniste, lekko ciemniejące, powierzchniowe pęcherze osiągające wymiary 1–10 cm, równoległe do osi podłużnej pędu mogące nawet opasać cały pęd. W takim przypadku wierzchołek pędu może zamierać, podczas gdy tkanka występująca bezpośrednio pod zamierającym fragmentem ma charakterystyczny ciemny kolor; uszkodzenia te nazywane są “czarnymi wierzchołkami”. Infekcja gałązek, która ma miejsce później w sezonie wegetacyjnym prowadzi do powstawania letnich zrakowaceń, które objawiają się jako wodniste, ciemnopurpurowe, soczewkowate, otaczające plamistości. Powstałe uszkodzenia później zasychają, ograniczają swoje rozmiary, stają się ciemne, wklęsłe o kształcie okrągłym do eliptycznego z wodnistą otoczką.

W przeciwieństwie do brzoskwini w przypadku pędów śliwy i moreli zrakowacenia mają charakter wieloletni i rozwój ich ma miejsce na pędach 2 i 3 letnich. Bakterie przenikają do wewnętrznej powierzchni kory, co powoduje powstawanie głębokich zrakowaceń, które deformują i prowadzą do zamierania gałązek. W celu uzyskania dalszych informacji zobacz: Dunegan (1932), Anderson (1956), Hayward i Waterston (1965), Moffett (1973), McIver (1973), Gasperini *et al.* (1984), Du Plessis (1988), Goodman i Hattingh (1988), Shepard (1994) i Ritchie (1995).

Wykrywanie bakterii w materiale roślinnym wykazującym objawy chorobowe

Izolacja

W przypadku wszystkich gatunków *Prunus*, bakterie mogą być izolowane z liści wykazujących objawy chorobowe w postaci wodnistych, nieregularnych plamistości lub z niedojrzałych owoców lub z pędów i gałęzi ze zrakowaceniami. Wykonanie izolacji z dojrzewających owoców jest kłopotliwe, a jeśli proces dojrzewania trwa izolacja żywych komórek patogena nie jest możliwa. Do badania należy pobrać kilka małych fragmentów tkanki (1–2 mm) z pogranicza uszkodzeń i zmiążyć je w moździerzu lub rozdrobnić w szalce Petriego, dodając kilka kropli sterylnej wody destylowanej lub sterylnego buforu PBS. Po zmiążdżeniu należy dodać 2-3 ml sterylnej wody destylowanej lub sterylnego buforu PBS i pozostawić zawiesinę na 1-2 minut w celu maceracji (dłuższa maceracja może wpłynąć na utlenienie próbki powodując utratę żywotności komórek bakterii). Uzyskaną zawiesinę należy posiać metodą rozcieńczeń płytkowych, nanosząc 10 – 30 μ l zawiesiny na podłoże YDC (agar drożdżowo-glukozowy z dodatkiem węgla wapnia) lub YPGA (agar drożdżowo-peptonowo-glukozowy) (Załącznik I). Płytki z podłożem YDC lub YPGA należy inkubować w temperaturze 27 ± 2 °C przez 2-3 dni. Kolonie bakterii *X. a. pruni* są wypukłe, gładkie, śluzowate i błyszczące: koloru jasnego, kremowożółtego z lekką tendencją do ciemnienia, zmieniające z wiekiem kolor na żółtopomarańczowy. W celu uzyskania czystej kultury do dalszej identyfikacji należy odszczepić typowe kolonie na szalkę z podłożem odżywczym - Nutrient Agar. Ostateczna diagnoza wymaga wykonania testu patogeniczności na liściach brzoskwini lub sadzonkach śliwy.

Na wymienionych powyżej podłożach podobne żółte kolonie mogą tworzyć inne rodzaje bakterii (np. *Pantoea agglomerans*). Bakteria *Pseudomonas syringae*, powodująca raka bakteryjnego drzew pestkowych nie produkuje jasnożółtych koloni na podłożu YDC lub YPGA, ale w przeciwieństwie do *X. a. pruni* produkuje fluoryzujący pigment na podłożu King B.

Wykrywanie bakterii w materiale roślinnym nie wykazującym objawów chorobowych

Bakteria *X. a. pruni* może przeżyć w sadach i szkółkach jako epifit na roślinach z rodzaju *Prunus*, skupiając się w pączkach i liściośladałach. Z tych miejsc bakteria może w czasie następnego sezonu wegetacyjnego przedostać się do rośliny żywicielskiej przed całkowitym zagojeniem blizn powstałych po liściach lub poprzez aparaty szparkowe. Materiał roślinny nie wykazujący objawów chorobowych może być analizowany przed wprowadzeniem do obrotu handlowego z wykorzystaniem metod stosowanych do badania i certyfikacji szkółkarskiego materiału rozmnożeniowego i wykorzystywanych w badaniach rutynowych (Zaccardelli *et al.*, 1995). Metody te zostały zwalidowane na roślinach brzoskwini i śliwy, ale nie na roślinach wiśni, migdałowca czy moreli, choć przypuszcza się, że w stosunku do tych gatunków roślin otrzymane wyniki byłyby również satysfakcjonujące.

Wielkość próbki

Próbki materiału roślinnego pochodzącego ze szkółek powinny składać się ze 100 fragmentów śpiących zrazów, a próbki pochodzące z sadów w okresie zimy powinny składać się ze 100 1-letnich pędów. Jeden fragment zrazu pochodzący z każdego drzewa lub pęd należy pokroić na 100 fragmentów i umieścić w torebce do homogenizacji. W przypadku badania pojedynczych dużych drzew (wykorzystywanych do pozyskiwania zrazów do szczepienia) należy pobrać 30 pędów z każdego drzewa, pokroić je i pobrać do badania 100 fragmentów.

Ekstrakcja

Do torebek do homogenizacji dodać 30 ml 0,05 M sterylnego buforu fosforanowego o pH=7,0 i miazdżyć przez 3 min w temperaturze pokojowej. Otrzymaną zawiesinę przefiltrować używając sterylnej gazy do probówek wirówkowych o pojemności 50 ml i wirować przez 5 minut z przyspieszeniem 480 g. Przenieść supernatant do nowej probówki wirówkowej i ponownie odwirować przez 10 minut z przyspieszeniem 12,000 g. Po odwirowaniu usunąć supernatant a osad zawiesić w 1 ml buforu fosforanowego w celu uzyskania ostatecznego stężenia. Do części zawiesiny (0,5 ml) dodać 50-70 µl sterylnego glicerolu i przechowywać w temperaturze -20 °C. Pozostałą część zawiesiny użyć do izolacji bezpośredniej i testu IF.

Izolacja bezpośrednia

Posiać na podłoże SP (agar peptonowo-sacharozowy) po 30 µl nie rozcieńczonej zawiesiny oraz jej dziesięciokrotne i stukrotne rozcieńczenia (Załącznik D), a następnie płytki z posiewem inkubować przez 3 dni w temperaturze 27 °C. Z kolonii przypominających *X. a. pruni* uzyskać czystą kulturę, na szalkach z podłożem YDC lub YPGA.

Immunofluorescencja (IF)

W celu wykonania testu barwienia koloni metodą innumofluorescencji pośredniej (IF) należy użyć nie rozcieńczonej zawiesiny oraz jej dziesięcio- i stu-krotne rozcieńczenia. Standardowy protokół opisany w UE (1998), zaleca użycie przeciwciał poliklonalnych z mianem surowicy nie niższym niż 1:2000. Test IF należy wykonać na świeżo przygotowanych ekstraktach próbek, a w przypadku konieczności wykonania testu IF na ekstraktach zawierających glicerol (przechowywanie w temperaturze -80 °C), należy usunąć glicerol poprzez dodanie do zawiesiny 1 ml 10 mM buforu PBS o pH =7,2 (8,0g NaCl; 0,2g KCl; 2,9g Na₂HPO₄ x 12H₂O; 0,2g KH₂PO₄; uzupełnić wodą destylowaną do 1 l), wirować przez 15 min z przyspieszeniem 7000 g, usunąć supernatant a osad zawiesić w 1 ml buforu PBS.

Podejrzane kolonie na płytkach agarowych należy oczyścić i zidentyfikować na podstawie ich morfologii, a następnie badać pod kątem ich zdolności do wywołania reakcji nadwrażliwości (HR) na strąkach fasoli (Klement, 1963) lub na liściach pomidora odmiany "Roma" (Lelliott i Stead, 1987), lub także wykonać test IF i/lub profil białek. Do chwili obecnej nie jest dostępny protokół dla reakcji PCR, zarówno do wykrywania jak i do identyfikacji czystej kultury.

Identyfikacja

Podejrzanie występowania *X. a. pruni* ma miejsce, gdy morfologia koloni wyhodowanych na podłożu oraz testy biochemiczne dają reakcje typowe dla tego patowaru. Uzyskaną czystą kulturę można zidentyfikować na podstawie profilu białek (SDS-PAGE), analizy estrów metyloowych kwasów tłuszczowych (FAME) lub reakcji REP-PCR. Ostateczne potwierdzenie wymaga wykonania testu patogeniczności na liściach sadzonek brzoskwini odmiany „Sunhigh” lub innej wrażliwej odmiany brzoskwini lub śliwy (Randhawa i Civerolo, 1985; Ritchie *et al.*, 1993).

Opis patogena

Gramujemna pałeczka, poruszająca się za pomocą jednej wici, o wymiarach 0,2–0,4 x 0,8–1,0 μm, bezwzględny tlenowiec z optymalną temperaturą wzrostu w granicach 24 –29°C. Wirulencja w stosunku do brzoskwini, śliwy, moreli, migdałowca i wiśni może być bardzo różna w zależności od szczepu i populacji. Infekcje krzyżowe pomiędzy różnymi gatunkami roślin żywicielskich są powszechne lecz nie zawsze możliwe.

Testy biochemiczne

Na podstawie Fahy i Persley (1983) oraz Schaad (1988): reakcja Grama (ujemna); obecność oksydazy (brak); metabolizm glukozy (oksydatywna); hydroliza eskuliny (pozytywna); upłynnianie żelatyny (pozytywna); trawienie białek (pozytywna); hydroliza skrobi (negatywna); produkcja ureazy (negatywna); miękka zgnilizna ziemniaka (wzrost żółtego śluzu); wzrost w bulionie drożdżowym w temperaturze 35 °C (pozytywna); wzrost w 2% NaCl (pozytywna); wzrost w 5% NaCl (negatywna).

Profil białek

Podejrzane kolonie *X. a. pruni* należy hodować na podłożu agarowym GYCA przez 48 godzin w temperaturze 28 °C , a następnie przeszczepić na takie samo podłoże agarowe i ponownie hodować przez następne 48 godzin w takiej samej temperaturze. Ekstrakcja białek, oczyszczenie, elektroforeza żelowa białek (SDS–PAGE) oraz interpretacja wyników elektroforezy zostały opisane w Vauterin *et al.* (1991). Analiza białek jest uznana za pozytywną, jeśli profil białek podejrzanej kultury jest identyczny jak profilu uzyskanego dla kontroli pozytywnej (Kerstens, 1990).

Analiza kwasów tłuszczowych (FAME)

Podejrzane kolonie *X. a. pruni* należy hodować na podłożu TSBA (trypticase soy agar) przez 48 godzin w temperaturze 28 °C, a następnie zastosować odpowiednią procedurę (FAME). Analiza kwasów tłuszczowych (FAME) jest pozytywna, kiedy profil podejrzanej kultury jest podobny do profilu kontroli pozytywnej (Sasser, 1990).

Testy patogeniczności

Test biologiczny na liściach

Zgodnie z metodą opracowaną na podstawie Randhawa i Civerolo (1985, pobrać do testu młode w pełni wykształcone liście (3–6-ty liść z wierzchołka) pochodzące z sadzonki brzoskwini odmiany „Sunhigh” lub jakiegokolwiek innej wrażliwej na bakterie *X. a. pruni* odmiany brzoskwini, uprawianej w warunkach szklarniowych. Liście krótko płukać pod bieżącą wodą wodociągową w celu usunięcia zabrudzenia i dezynfekować przez 40 – 60 s za pomocą 70% etanolu. Następnie opłukać powtórnie w sterylnej wodzie i natychmiast przystąpić do inokulacji. Przygotować zawiesinę bakterii o gęstości 10^7 kom/ml. Liście lub ich fragmenty skierować dolną stroną ku górze i umieścić na kilku warstwach sterylnej bibuły. Inokulum wstrzykiwać za pomocą strzykawki bez igły oraz stosując delikatne i stałe ciśnienie trzymając otwarty koniec strzykawki, aż pojawi się jakby nasiąknięta wodą powierzchnia mezofilu o średnicy 2-4-mm. Powtórzyć inokulację w 8–10 miejscach na powierzchni każdego z liści w odległości około 1 cm obok siebie. Delikatnie usunąć nadmiar inokulum z powierzchni liści za pomocą bibuły. Przygotować w taki sam sposób kontrolę negatywną używając sterylnej wody destylowanej (zamiast zawiesiny bakterii) oraz kontrolę pozytywną używając zawiesiny bakterii znanego szczepu *X. a. pruni* o gęstości 10^7 kom/ml. Wszystkie zainokulowane liście (próbkę badaną, kontrolę negatywną, kontrolę pozytywną) umieścić na podłożu – 0,5% agarze wodnym i inkubować przez dwa tygodnie w temperaturze 25°C w świetle fluorescencyjnym ($60\text{--}75 \mu\text{E} \times \text{s}^{-1} \times \text{m}^{-2}$) przy 16 godzinnym cyklu świetlnym.

W przypadku reakcji pozytywnej, po 6–9 dniach wszystkie zainokulowane miejsca powinny wykazywać zlewające się wodniste, brązowiejące i wykruszające się nekrotyczne plamistości, często otoczone szarawobiałą lub purpurową otoczką. Na starszych uszkodzeniach często może pojawić się śluz bakteryjny.

W przypadku wyizolowania bakterii *X. a. pruni* ze śliwy, test patogeniczności można z powodzeniem wykonać na wrażliwych odmianach śliwy, np. ‘Friar’, ‘Laroda’, ‘Frontier’, ‘Angeleno’, ‘Black Star’, ‘Shiro’ (Bazzi *et al.*, 1990; Simeone, 1990). Po inokulacji poszczególnych roślin żywicielskich obserwowano różnice dotyczące agresywności w przypadku niektórych szczepów (Du Plessis, 1988, Scortichini *et al.*, 1996).

Inokulacja roślin zawiesiną bakterii X. a. pruni

Rośliny wrażliwych odmian brzoskwini lub śliwy lub sadzonki (odmian brzoskwini: ‘Barrier’, ‘Catherine’, ‘Parade’, ‘Royal Glory’ lub ‘Reach Lady’, odmian śliwy: ‘Black Beauty’, ‘Black Diamond’, ‘Calita’ lub ‘Mariana’) można inokulować zgodnie z dwoma protokołami. Zgodnie z Randhawa i Civerolo (1985), za pomocą plastikowej strzykawki z igłą inokulować delikatnie młode liście rosnące na młodych pędach stosując stałe ciśnienie trzymając otwarty koniec strzykawki, aż pojawi się jakby nasiąknięta wodą powierzchnia mezofilu na spodniej stronie liścia. Zgodnie z Du Plessis (1988), rośliny należy utrzymywać w temperaturze 25–27 °C i wilgotności 95–100% przez 8 godzin przed inokulacją. Pierwszy młody lecz w pełni wykształcony liść z wierzchołka pędu należy zainokulować za pomocą oprysku używając w tym celu pistoletu połączonego z urządzeniem zaopatrzonym w sprężone powietrze. W przypadku obydwu protokołów do inokulacji używa się zawiesiny bakteryjnej o gęstości 10^7 kom/ml. Po inokulacji utrzymywać rośliny w warunkach szklarniowych w temperaturze około 25 °C i wysokiej wilgotności. Uszkodzenia mogą być odnotowane po okresie 1–4 tygodni od inokulacji.

Materiał odniesienia

ATCC 19312; CFBP 2535; ICMP 51; LMG 852; NCPPB 416.

Sprawozdawczość i dokumentacja

Wskazówki dotyczące sprawozdawczości i dokumentacji są dostępne w Standardzie EPPO PM7/– (w przygotowaniu).

Dodatkowe informacje

Informacje dodatkowe dotyczące tego organizmu można otrzymać od: Prof Dr E. M. Stefani, DiSTA – Patologia Vegetale, Università di Bologna, 40127 Bologna (Włochy).

Podziękowanie

Niniejszy protokół diagnostyczny został pierwotnie opracowany przez doktora P. Sobiczewskiego, Instytut Sadownictwa i Kwiaciarstwa, Skierniewice (PL).

Materiały źródłowe²

- Anderson HW (1956) *Diseases of Fruit Crops*, pp. 206–215. McGraw-Hill, New York (US).
- Bazzi C & Mazzucchi U (1980) [Epidemic of *Xanthomonas pruni* on plum.] *Informatore Fitopatologico* **30** (5), 11–17 (in Italian).
- Bazzi C & Mazzucchi U (1984) [Update on the most important bacterial diseases of fruit crops in the nursery.] *L'informatore Agrario* **34**, 51–62 (in Italian).
- Bazzi C, Stefani E & Mazzucchi U (1990) Plum susceptibility to *Xanthomonas campestris* pv. *pruni* in the Po Valley. *Proceedings of the 7th Conference on Plant Pathogenic Bacteria*, pp. 985–990. Budapest (HU).
- Du Plessis HJ (1988) Bacterial spot disease of stone fruits: overview of findings. *Deciduous-Fruit Grower* **38**, 128–132.
- Dunegan JC (1932) *The Bacterial Spot Disease of the Peach and Other Stone Fruits*. Technical Bulletin no. 273. US Department of Agriculture, Washington (US).
- EPPO/CABI (1997) *Xanthomonas arboricola* pv. *pruni*. In: *Quarantine Pests for Europe*, 2nd edn, pp. 1096–1100. CAB International, Wallingford (GB).
- EU (1998) Council Directive 98/57 EC of 20 July 1998 on the control of *Ralstonia solanacearum*. *Official Journal of the European Communities* L235, 1–39.
- Fahy PC & Persley GJ (1983) *Plant Bacterial Diseases. A Diagnostic Guide*. Academic Press, New York (US).
- Gasparini C, Bazzi C & Mazzucchi U (1984) Autumn inoculation of *Xanthomonas campestris* pv. *pruni* through leaf scars in plum trees in the Po valley. *Phytopathologia Mediterranea* **23**, 60–62.
- Goodman CA & Hattingh MJ (1988) Effect of plum and apricot bud origin, time cut and time budded on development of bacterial spot of stone fruit. *Phytophylactica* **20**, 133–134.
- Hayward AC (1960) A method for characterising *Pseudomonas solanacearum*. *Nature (London)* **186**, 405–406.
- Hayward AC & Waterston GM (1965) *Xanthomonas pruni*. *CMI Descriptions of Pathogenic Fungi and Bacteria* no. 50. CAB International, Wallingford (GB).
- Kerstens K (1990) Identification of bacteria through fatty acids analysis. In: *Methods in Phytobacteriology* (Ed. Klement, Z Rudolf, K & Sands, DC), pp. 191–198. Akadémiai Kiadó, Budapest (HU).

² Została zachowana oryginalna pisownia. (przyp. tłum.)

- Klement Z (1963) Method for the rapid detection of the pathogenicity of phytopathogenic *Pseudomonas*. *Nature* **199**, 200–300.
- Lelliott RA & Stead DE (1987) *Methods for the Diagnosis of Bacterial Diseases of Plants*. Blackwell, Oxford (GB).
- McIver IC (1973) Bacterial spot of stone fruit. *Agricultural Gazette of New South Wales* **84**, 211–213.
- Moffett NL (1973) Bacterial spot of stone fruit in Queensland. *Australian Journal of Biology Sciences* **26**, 171–179.
- Randhawa PS & Civerolo EL (1985) A detached-leaf bioassay for *Xanthomonas campestris* pv. *Pruni*. *Phytopathology* **75**, 1060–1063.
- Ritchie DF (1995) Bacterial spot, pp. 50–52. In: *Compendium of Stone Fruit Diseases*. APS Press, St Paul (US).
- Ritchie DF, Hammerschlag FA & Werner DJ (1993) Field evaluation of tissue culture-derived peach trees for susceptibility to bacterial spot (*Xanthomonas campestris* pv. *pruni*). *Acta Horticulturae* no. 336, 155–169.
- Sasser M (1990) Identification of bacteria through fatty acid analysis. In: *Methods in Phytobacteriology* (Ed. Klement, Z Rudolf, K & Sands, DC), pp. 199–204. Akadémiai Kiadó, Budapest (HU).
- Schaad NW (1988) *Laboratory Guide for Identification of Plant Pathogenic Bacteria*, 2nd edn, pp. 81–94. APS Press, St Paul (US).
- Scortichini M, Janse JD, Rossi MP & Derks JHJ (1996) Characterization of *Xanthomonas campestris* pv. *pruni* strains from different hosts by pathogenicity tests and analysis of whole-cell fatty acids and whole-cell proteins. *Journal of Phytopathology* **144**, 69–74.
- Scortichini M & Simeone AM (1997) [Review of the bacterial diseases of apricot.] *Rivista di Frutticoltura e di Ortofloricoltura* **59**, 51–57 (in Italian).
- Shepard DP (1994) Epiphytic persistence of *Xanthomonas campestris* pv. *pruni* on peach and plum. *Plant Disease* **78**, 627–629.
- Simeone AM (1990) [Observation on cultivar susceptibility to natural infections of *Xanthomonas pruni* in a plum collection.] *Rivista di Frutticoltura e di Ortofloricoltura* **54**, 61–63 (in Italian).
- Stefani E, Bazzi C, Mazzucchi U & Colussi A (1989) [*Xanthomonas campestris* pv. *pruni* in Friuli peach orchards.] *Informatore Fitopatologico* **39** (7–8), 60–63 (in Italian)

Załącznik I. Podłoża

Podłoże YDCA (Stolp i Starr, 1964): 10,0 g wyciągu drożdżowego; 20,0 g dekstrozy (glukoza); 20,0 g węglan wapnia (jasny proszek); 15,0 g agaru; uzupełnić do 1 litra wodą destylowaną.

Podłoże YPGA (Lelliott i Stead, 1987): 5,0 g wyciągu drożdżowego; 5,0g peptonu bakteriologicznego; 10,0g glukozy; 20,0g agaru; uzupełnić do 1 litra wodą destylowaną; ustalić pH 6,5-7,0.

Podłoże SPA (Hayward, 1960): 5,0g peptonu bakteriologicznego; 10,0g sacharozy; 0,05 g dwufosforanu potasu; 0,25 g siarczanu magnezu; 15 g agaru; uzupełnić do 1 litra wodą destylowaną; ustalić pH 6,8. Sterylizować poprzez autoklawowanie przez 15 min w temperaturze 121°C, ochłodzić do temperatury około 50 °C, a następnie dodać 10 ml L⁻¹ 1% sterylne roztworu cykloheksymidu (actidione).

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