

## 709

ROZPORZĄDZENIE MINISTRA ROLNICTWA I ROZWOJU WSI<sup>1)</sup>

z dnia 13 kwietnia 2004 r.

**w sprawie szczegółowych sposobów postępowania przy zwalczaniu i zapobieganiu rozprzestrzenianiu się bakterii *Clavibacter michiganensis* ssp. *sepedonicus*<sup>2)</sup>**

Na podstawie art. 10 ust. 1 i art. 15 ust. 3 ustawy z dnia 18 grudnia 2003 r. o ochronie roślin (Dz. U. z 2004 r. Nr 11, poz. 94) zarządza się, co następuje:

§ 1. Rozporządzenie określa:

1) szczegółowe sposoby postępowania przy zwalczaniu i zapobieganiu rozprzestrzenianiu się bakterii *Clavibacter michiganensis* ssp. *sepedonicus*, powodującej chorobę zwaną bakteriozą pierścieniową ziemniaka, w celu zlokalizowania i określenia rozprzestrzenienia, niedopuszczenia do wystąpienia i rozprzestrzenienia oraz zwalczania i zniszczenia tej bakterii, w tym:

- a) metody zwalczania bakterii i zapobiegania jej rozprzestrzenianiu się,
- b) metody wykrywania i identyfikacji bakterii,
- c) sposób wyznaczania stref, w których powinny być stosowane środki w celu zwalczania lub zapobiegania rozprzestrzenianiu się bakterii,
- d) warunki prowadzenia produkcji, obrotu, przemieszczania, przechowania, nabywania lub zbywania roślin;

2) dokument potwierdzający, że w partii bulw ziemniaka wyprawdzanych z terytorium Rzeczypospolitej Polskiej nie stwierdzono występowania bakterii *Clavibacter michiganensis* ssp. *sepedonicus*.

§ 2. Użyte w rozporządzeniu określenia oznaczają:

1) sadzenie — każdą czynność mającą na celu umieszczenie roślin w sposób umożliwiający ich wzrost, reprodukcję lub rozmnożenie;

2) rośliny przeznaczone do sadzenia:

- a) rośliny już posadzone, które mają pozostać w podłożu uprawowym lub być przesadzone, lub

b) rośliny nieposadzone w chwili wprowadzania do obrotu lub przemieszczania, lecz przeznaczone do późniejszego sadzenia;

3) urzędowo kwalifikowane sadzeniaki ziemniaka — sadzeniaki ziemniaka uznane w urzędowej ocenie za elitarne lub kwalifikowane;

4) miejsce produkcji — wszelkie obiekty, w szczególności magazyny, przechowalnie, szklarnie, tunele foliowe lub pola znajdujące się w obrębie jednego gospodarstwa lub jego części lub kilku gospodarstw, stanowiące jedną zorganizowaną całość.

§ 3. 1. Kontrolę w celu sprawdzenia występowania bakterii *Clavibacter michiganensis* ssp. *sepedonicus*, zwaną dalej „urzędową kontrolą”, przeprowadza wojewódzki inspektor ochrony roślin i nasiennictwa, zwany dalej „wojewódzkim inspektorem”, na roślinach ziemniaka (*Solanum tuberosum* L.) znajdujących się w uprawie oraz na bulwach ziemniaka po zbiorach, w zakresach i terminach uwzględniających systemy produkcji roślin ziemniaka oraz biologię bakterii *Clavibacter michiganensis* ssp. *sepedonicus*, a także wiedzę naukową w tym zakresie.

2. Wojewódzki inspektor w każdym przypadku podejrzenia wystąpienia porażenia, w celu potwierdzenia lub wykluczenia podejrzeń:

- 1) pobiera próby bulw z partii ziemniaków, w szczególności bulw pochodzących z przechowalni, i poddaje je badaniom laboratoryjnym;
- 2) przeprowadza dodatkowo ocenę wizualną krojonych bulw ziemniaka.

3. Badania laboratoryjne, o których mowa w ust. 2 pkt 1, przeprowadza się z zastosowaniem metod diagnozowania, wykrywania i identyfikacji bakterii *Clavibacter michiganensis* ssp. *sepedonicus*, określonych w załączniku do rozporządzenia.

§ 4. W przypadku podejrzenia wystąpienia bakterii *Clavibacter michiganensis* ssp. *sepedonicus* na podstawie pozytywnego wyniku testu immunofluorescencyjnego (IF), wskazującego na możliwość wystąpienia tej bakterii, do czasu zakończenia następných etapów badania i uzyskania ostatecznego jego wyniku, zabezpiecza się i przechowuje:

- 1) wszystkie bulwy lub próby roślin ziemniaka, jeżeli jest to możliwe;
- 2) pozostały ekstrakt i preparaty IF.

§ 5. 1. W przypadku podejrzenia wystąpienia lub w przypadku potwierdzenia w czasie badań laboratoryjnych występowania bakterii *Clavibacter michiganensis*

<sup>1)</sup> Minister Rolnictwa i Rozwoju Wsi kieruje działem administracji rządowej — rolnictwo, na podstawie § 1 ust. 2 pkt 1 rozporządzenia Prezesa Rady Ministrów z dnia 29 marca 2002 r. w sprawie szczegółowego zakresu działania Ministra Rolnictwa i Rozwoju Wsi (Dz. U. Nr 32, poz. 305).

<sup>2)</sup> Przepisy niniejszego rozporządzenia wdrażają postanowienia

— Dyrektywy Rady 93/85/EEC z dnia 4 października 1993 r. w sprawie zwalczania bakteriozy pierścieniowej ziemniaka (Dz. Urz. WE, L 259 z 18.10.1993 r.).

Dane dotyczące ogłoszenia aktu prawa Unii Europejskiej, zamieszczone w niniejszym rozporządzeniu, z dniem użycia przez Rzeczpospolitą Polską członkostwa w Unii Europejskiej, dotyczą ogłoszenia tego aktu w Dzienniku Urzędowym Unii Europejskiej — wydanie specjalne.

ssp. *sepedonicus*, Główny Inspektor Ochrony Roślin i Nasiennictwa powiadamia o tym Komisję Europejską lub inne państwa członkowskie Unii Europejskiej.

2. W przypadku potwierdzenia w czasie badań laboratoryjnych występowania bakterii *Clavibacter michiganensis* ssp. *sepedonicus*, przez co najmniej miesiąc od dnia powiadomienia, o którym mowa w ust. 1, zabezpiecza się i przechowuje:

- 1) materiał wyszczególniony w § 4;
- 2) próbę porażonego materiału roślinnego oberżyny, zainokulowanego ekstraktem z porażonych bulw lub roślin ziemniaka;
- 3) wyizolowaną kulturę bakterii *Clavibacter michiganensis* ssp. *sepedonicus*.

§ 6. W przypadku pobrania prób bulw ziemniaka do badań laboratoryjnych w celu wykluczenia infekcji latentnej lub gdy wzrokowo widoczne są podejrzane objawy chorobowe, lub gdy uzyskano pozytywne wyniki testu IF lub innych testów, aż do zakończenia badań laboratoryjnych potwierdzających lub wykluczających występowanie bakterii *Clavibacter michiganensis* ssp. *sepedonicus*:

- 1) nie przemieszcza się roślin ziemniaka lub bulw pochodzących z upraw, partii lub przesyłek, z których pobrano próby, chyba że przemieszczenie to odbywa się pod nadzorem wojewódzkiego inspektora i jeżeli nie istnieje ryzyko rozprzestrzenienia się bakterii *Clavibacter michiganensis* ssp. *sepedonicus*;
- 2) bulwy ziemniaka pochodzące z partii, z których pobrano próby, nie mogą być przeznaczone do sadzenia i nie mogą być w czasie zbioru, transportu lub przechowywania mieszane z innymi partiami bulw ziemniaka;
- 3) wojewódzki inspektor:
  - a) podejmuje czynności mające na celu wykrycie źródła pochodzenia prawdopodobnego porażenia, w przypadku gdy wzrokowo widoczne są podejrzane objawy chorobowe lub gdy uzyskano pozytywne wyniki testu IF,
  - b) może wprowadzić inne niż określone w pkt 1 i 2 działania zapobiegające rozprzestrzenianiu się bakterii *Clavibacter michiganensis* ssp. *sepedonicus*, w szczególności może przeprowadzać urzędowe kontrole przemieszczania roślin lub bulw ziemniaka w obrębie lub poza obiekty gospodarstwa lub miejsca produkcji, związane z podejrzeniem wystąpienia tej bakterii.

§ 7. Jeżeli w badaniach laboratoryjnych, przeprowadzonych z zastosowaniem metod diagnozowania, wykrywania i identyfikacji bakterii *Clavibacter michiganensis* ssp. *sepedonicus*, określonych w załączniku do rozporządzenia, zostanie potwierdzona obecność bakterii *Clavibacter michiganensis* ssp. *sepedonicus* w próbce, wojewódzki inspektor:

- 1) uznaje za porażone bulwy lub rośliny ziemniaka, partię roślin lub przesyłkę, z której zostały pobrane próby do badania, oraz określa jako skażone maszyny, urządzenia, środki transportu, opakowania, przechowalnie lub ich części oraz wszelkie inne

przedmioty, które miały kontakt z porażonymi bulwami lub roślinami ziemniaka, a także, jeżeli jest to możliwe, wskazuje skażone obiekty, szklarnie, tunele foliowe, pola lub miejsca produkcji, z których pochodzą porażone bulwy lub rośliny;

- 2) ustala zasięg prawdopodobnego porażenia, zgodnie z § 8, biorąc pod uwagę: kontakt przed lub po zbiorze z porażonymi roślinami ziemniaka, kontakt ze skażonymi maszynami, urządzeniami, środkami transportu, opakowaniami, przechowalniami lub ich częściami oraz kontakt ze skażonymi obiektami, szklarniami, tunelami foliowymi, polami lub miejscami produkcji, o których mowa w pkt 1, a także powiązania produkcyjne ze skażonymi miejscami lub przedmiotami oraz określa prawdopodobnie porażone rośliny lub bulwy ziemniaka;
- 3) wyznacza strefę na podstawie: stwierdzonego porażenia i skażenia określonego w pkt 1, określonego zasięgu prawdopodobnego porażenia, zgodnie z pkt 2, oraz zasięgu możliwego rozprzestrzenienia się bakterii zgodnie z § 9, zwaną dalej „strefą zagrożenia”, w której podejmowane będą działania w celu zwalczania i zapobiegania rozprzestrzenieniu się bakterii *Clavibacter michiganensis* ssp. *sepedonicus*.

§ 8. Badania mające na celu ustalenie zasięgu prawdopodobnego porażenia bakterią *Clavibacter michiganensis* ssp. *sepedonicus* obejmują:

- 1) inne bulwy lub rośliny ziemniaka znajdujące się w miejscu produkcji określonym jako porażone;
- 2) miejsca produkcji, gospodarstwa lub obiekty, które miały jakikolwiek kontakt z bulwami lub roślinami ziemniaka określonymi jako porażone, wraz z miejscami produkcji, w których wspólnie użytkowany jest lub był sprzęt i urządzenia używane w cyklu produkcyjnym;
- 3) bulwy lub rośliny produkowane w miejscach wymienionych w pkt 2 lub występujące w tych miejscach produkcji w okresie, w którym bulwy lub rośliny ziemniaka uznane za porażone znajdowały się w tych miejscach;
- 4) miejsca przechowywania roślin lub bulw ziemniaka pochodzących z miejsc wymienionych w pkt 2;
- 5) maszyny, urządzenia, środki transportu, opakowania, przechowalnie lub ich części oraz inne przedmioty, które mogły mieć kontakt z bulwami lub roślinami ziemniaka określonymi jako porażone podczas ostatnich 12 miesięcy przed stwierdzeniem porażenia;
- 6) bulwy lub rośliny ziemniaka mające kontakt z przedmiotami, o których mowa w pkt 5, przed czyszczeniem i dezynfekcją tych przedmiotów oraz
- 7) bulwy lub rośliny ziemniaka pochodzące z tego samego rozmnożenia klonalnego co bulwy lub rośliny uznane za porażone, jeżeli badania laboratoryjne wskazują na możliwość porażenia.

§ 9. Badania mające na celu ustalenie zasięgu możliwego rozprzestrzenienia się bakterii *Clavibacter michiganensis* ssp. *sepedonicus* obejmują:

- 1) inne miejsca produkcji, gdzie uprawia się ziemniaki lub inne rośliny żywicielskie, sąsiadujące z miejscami produkcji uznanymi za porażone lub znajdującymi się w zasięgu prawdopodobnego porażenia;
- 2) wspólne miejsce wytwarzania rodów sadzeniaków ziemniaka.

§ 10. 1. W przypadku porażenia bulw lub roślin ziemniaka, wojewódzki inspektor przeprowadza badania laboratoryjne wegetatywnych (klonalnych) rozmnożeń rodów ziemniaka, w których wykryto porażenie, w sposób umożliwiający określenie pierwotnego źródła infekcji i zasięgu prawdopodobnego porażenia.

2. Na podstawie badań, o których mowa w ust. 1, wojewódzki inspektor określa porażenie oraz, jeżeli ma to zastosowanie, wyznacza strefę zagrożenia.

3. Dla celów doświadczalnych lub naukowych oraz dla prac nad selekcją odmian ziemniaka wojewódzki inspektor może odstąpić od działań określonych w § 7 pod warunkiem, że odstępstwo to nie zakłóci zwalczania bakterii *Clavibacter michiganensis* ssp. *sepedonicus* i nie stworzy ryzyka jej rozprzestrzenienia się.

§ 11. 1. Porażonych bulw lub roślin ziemniaka nie przeznaczają się do sadzenia i niszczy się je pod nadzorem wojewódzkiego inspektora.

2. Jeżeli nie istnieje ryzyko rozprzestrzenienia się bakterii *Clavibacter michiganensis* ssp. *sepedonicus*, porażone bulwy ziemniaka, pod nadzorem wojewódzkiego inspektora, mogą zostać przeznaczone:

- 1) do przerobu przemysłowego w zakładzie przetwórczym, posiadającym możliwości unieszkodliwiania resztek powstałych w procesie przetwarzania porażonych bulw ziemniaka i dezynfekcji miejsc oraz przedmiotów mających kontakt z porażonymi bulwami ziemniaka, pod warunkiem ich bezpośredniego i natychmiastowego dostarczenia do tego zakładu przetwórczego;
- 2) na konsumpcję lub paszę, po ich uprzednim ugotowaniu lub uparowaniu w gospodarstwie, z którego pochodzą.

§ 12. 1. Bulw lub roślin ziemniaków prawdopodobnie porażonych nie przeznaczają się do sadzenia.

2. Jeżeli nie istnieje ryzyko rozprzestrzenienia się bakterii *Clavibacter michiganensis* ssp. *sepedonicus*, pod nadzorem wojewódzkiego inspektora, bulwy i rośliny ziemniaka prawdopodobnie porażone mogą zostać przeznaczone na cele, o których mowa w § 11 ust. 2, lub do konsumpcji poza gospodarstwem, po ich uprzednim zapakowaniu i bezpośrednim dostarczeniu do odbiorcy, bez konieczności przepakowywania.

3. Jeżeli istnieje ryzyko rozprzestrzenienia się bakterii *Clavibacter michiganensis* ssp. *sepedonicus*, bulwy lub rośliny ziemniaka prawdopodobnie porażone niszczy się pod nadzorem wojewódzkiego inspektora.

§ 13. Środki transportu, maszyny, urządzenia, opakowania, przechowalnie lub ich części oraz inne przedmioty, określone jako porażone lub prawdopodobnie porażone, niszczy się lub oczyszcza i dezynfekuje, pod nadzorem wojewódzkiego inspektora, w sposób unie-

możliwiający rozprzestrzenianie się bakterii, tak aby mogły zostać uznane za nieporażone.

§ 14. 1. W porażonych miejscach produkcji:

1) na porażonym polu:

a) przez co najmniej trzy lata uprawy następujące po roku, w którym stwierdzono porażenie:

— niszczy się samosiewy ziemniaka i inne naturalnie występujące rośliny żywicielskie bakterii *Clavibacter michiganensis* ssp. *sepedonicus*,

— nie sadi się bulw, roślin lub nasion ziemniaka ani innych naturalnie występujących roślin żywicielskich tej bakterii, aż do uznania pola za wolne od samosiewów ziemniaka przez co najmniej 2 kolejne lata uprawy,

b) w pierwszym sezonie uprawy ziemniaka następującym po okresie, o którym mowa w lit. a, dopuszcza się sadzenie sadzeniaków ziemniaka urzędowo kwalifikowanych przez wojewódzkiego inspektora, z przeznaczeniem bulw pochodzących z tej uprawy do konsumpcji lub przerobu przemysłowego; uprawa i bulwy ziemniaka podlegają obowiązkowej kontroli wojewódzkiego inspektora, w tym także badaniom laboratoryjnym na obecność bakterii *Clavibacter michiganensis* ssp. *sepedonicus*,

c) w kolejnym sezonie uprawy ziemniaka, po zastosowaniu cyklu właściwego płodozmienu, dopuszcza się sadzenie sadzeniaków ziemniaka urzędowo kwalifikowanych przez wojewódzkiego inspektora, z przeznaczeniem na sadzeniaki ziemniaka, ziemniaki do konsumpcji lub do przerobu przemysłowego; uprawa i bulwy ziemniaka podlegają obowiązkowej kontroli wojewódzkiego inspektora, w tym także badaniom laboratoryjnym na obecność bakterii *Clavibacter michiganensis* ssp. *sepedonicus*, albo

2) na porażonym polu:

a) podczas czterech lat uprawy następujących po roku, w którym stwierdzono porażenie:

— niszczy się samosiewy ziemniaka i inne naturalnie występujące rośliny żywicielskie bakterii *Clavibacter michiganensis* ssp. *sepedonicus*,

— nie użytkuje się pola do celów rolniczych lub leśnych i przeznaczają się to pole na użytkowanie pastwiskowe, stosując częste niskie koszenie lub intensywny wypas,

b) w pierwszym sezonie uprawy ziemniaka następującym po okresie, o którym mowa w lit. a, dopuszcza się sadzenie sadzeniaków ziemniaka urzędowo kwalifikowanych przez wojewódzkiego inspektora, z przeznaczeniem bulw na sadzeniaki ziemniaka, ziemniaki do konsumpcji lub do przerobu przemysłowego; uprawa i bulwy ziemniaka podlegają obowiązkowej kontroli wojewódzkiego inspektora, w tym także badaniom laboratoryjnym na obecność bakterii *Clavibacter michiganensis* ssp. *sepedonicus*;

3) na polach innych niż porażone:

a) w roku uprawy następującym po roku, w którym stwierdzono porażenie:

— nie sadi się bulw, roślin i nasion ziemniaka ani innych naturalnie występujących roślin żywicielskich bakterii oraz niszczy się samosiewy ziemniaka lub

— dopuszcza się sadzenie sadzeniaków ziemniaka urzędowo kwalifikowanych przez wojewódzkiego inspektora, z przeznaczeniem bulw pochodzących z tej uprawy na ziemniaki do konsumpcji lub do przerobu przemysłowego; pod warunkiem, że wojewódzki inspektor stwierdzi, że nie istnieje ryzyko występowania samosiewów ziemniaka i innych naturalnie występujących roślin żywicielskich bakterii *Clavibacter michiganensis* ssp. *sepedonicus*,

b) przez co najmniej dwa lata uprawy następujące po okresie, o którym mowa w lit. a, dopuszcza się sadzenie sadzeniaków ziemniaka urzędowo kwalifikowanych przez wojewódzkiego inspektora, z przeznaczeniem bulw pochodzących z tej uprawy na sadzeniaki ziemniaka lub ziemniaki do konsumpcji, lub do przerobu przemysłowego,

c) w każdym roku uprawy, o których mowa w lit. a i b, niszczy się samosiewy ziemniaka i inne naturalnie występujące rośliny żywicielskie bakterii *Clavibacter michiganensis* ssp. *sepedonicus*, a uprawy podlegają obowiązkowej kontroli wojewódzkiego inspektora,

d) jeżeli w roku uprawy następującym po roku, w którym stwierdzono porażenie, sadzone były urzędowo kwalifikowane sadzeniaki ziemniaka z przeznaczeniem na ziemniaki do konsumpcji lub do przerobu przemysłowego, uprawa podlega obowiązkowej kontroli wojewódzkiego inspektora w terminach pozwalających na wykrycie bakterii *Clavibacter michiganensis* ssp. *sepedonicus*, w ramach której, w szczególności, przeprowadza się badania laboratoryjne samosiewów ziemniaka.

2. Pod nadzorem wojewódzkiego inspektora czyści się i dezynfekuje wszystkie urządzenia, maszyny, środki transportu i przechowalnie lub ich części oraz inne przedmioty w sposób uniemożliwiający rozprzestrzenienie się bakterii *Clavibacter michiganensis* ssp. *sepedonicus*:

1) bezpośrednio po stwierdzeniu porażenia oraz

2) w każdym następnym roku uprawy, włącznie z pierwszym sezonem, w którym uprawa ziemniaka jest dozwolona na porażonych polach.

3. W systemie produkcji, w którym możliwa jest całkowita wymiana podłoża:

1) nie sadi się bulw, roślin i nasion ziemniaka, chyba że obiekt został poddany urzędowo zatwierdzonym zabiegom w celu wyeliminowania bakterii *Clavibacter michiganensis* ssp. *sepedonicus* i usunięcia wszelkich bulw lub innego materiału roślin psiankowatych, łącznie z całkowitą wymianą pod-

łoża oraz oczyszczeniem i dezynfekcją tego obiektu i całego jego wyposażenia;

2) po dokonaniu zabiegów, o których mowa w pkt 1, dopuszcza się produkcję ziemniaka z urzędowo kwalifikowanych sadzeniaków, minibulw lub mikroroślin ziemniaka wyprodukowanych pod nadzorem wojewódzkiego inspektora, po uznaniu, że obiekt jest wolny od bakterii *Clavibacter michiganensis* ssp. *sepedonicus*.

§ 15. 1. W obrębie strefy zagrożenia, oprócz wymagań określonych w § 14, bezpośrednio po stwierdzeniu porażenia i przez następne co najmniej trzy sezony uprawy:

1) miejsca produkcji lub gospodarstwa, w których uprawia się, przechowuje lub przemieszcza bulwy ziemniaka oraz wykorzystuje maszyny, urządzenia, narzędzia i środki transportu związane z produkcją ziemniaka, podlegają kontroli wojewódzkiego inspektora;

2) w razie potrzeby czyści się i dezynfekuje maszyny, urządzenia, narzędzia, środki transportu, opakowania i przechowalnie w gospodarstwach, o których mowa w pkt 1, pod nadzorem wojewódzkiego inspektora, w sposób uniemożliwiający rozprzestrzenienie się bakterii *Clavibacter michiganensis* ssp. *sepedonicus*;

3) dopuszcza się sadzenie wyłącznie urzędowo kwalifikowanych sadzeniaków ziemniaka;

4) oddzielnie zbiera się, przemieszcza i przechowuje sadzeniaki ziemniaka oraz ziemniaki do konsumpcji lub przerobu przemysłowego na terenie gospodarstw w obrębie wyznaczonej strefy zagrożenia;

5) wojewódzki inspektor przeprowadza urzędowe kontrole.

2. W obrębie wyznaczonej strefy zagrożenia w razie potrzeby, wojewódzki inspektor podejmuje działania zmierzające do wymiany wszelkiego materiału sadzeniakowego ziemniaka.

§ 16. 1. Sadzeniaki ziemniaka powinny spełniać wymagania specjalne określone w przepisach wydanych na podstawie art. 20 ust. 1 ustawy z dnia 18 grudnia 2003 r. o ochronie roślin oraz pochodzić w prostej linii z materiału poddanego urzędowej ocenie i uznanego za wolny od bakterii *Clavibacter michiganensis* ssp. *sepedonicus* na podstawie badań laboratoryjnych przeprowadzonych przez wojewódzkiego inspektora.

2. Badania, o których mowa w ust. 1, przeprowadza się:

1) w przypadkach gdy porażenie dotyczy produkcji ziemniaka sadzeniaka — na roślinach początkowego rozmnożenia klonalnego;

2) w innych przypadkach — na roślinach z początkowego rozmnożenia klonalnego albo na reprezentatywnych próbach materiału bazowego ziemniaka sadzeniaka lub wcześniejszych rozmnożeń.

§ 17. 1. Bulwy ziemniaków wyprodukowanych na terytorium Rzeczypospolitej Polskiej mogą być prze-

mieszczane z przeznaczeniem do państw członkowskich, jeżeli zostały zaopatrzone w zaświadczenie wydane przez wojewódzkiego inspektora po przeprowadzeniu badań laboratoryjnych stwierdzających, że w partii tych bulw nie stwierdzono występowania bakterii *Clavibacter michiganensis* ssp. *sepedonicus*.

2. Zaświadczenie jest wystawiane nie wcześniej niż 14 dni przed dniem wyprowadzenia ziemniaków z terytorium Rzeczypospolitej Polskiej.

§ 18. Rozporządzenie wchodzi w życie z dniem ogłoszenia.

Minister Rolnictwa i Rozwoju Wsi: *W. Olejniczak*

Załącznik do rozporządzenia Ministra Rolnictwa i Rozwoju Wsi z dnia 13 kwietnia 2004 r. (poz. 709)

## I. Metody diagnozowania, wykrywania i identyfikacji bakterii *Clavibacter michiganensis* ssp. *sepedonicus*

### 1. Pobieranie tkanki z części przystolonowych bulwy

Standardowa próba składa się z co najmniej 200 bulw pobranych z partii bulw ziemniaka o masie 25 ton, jednakże badanie można również wykonać dla mniejszych prób:

- 1) myje się 200 bulw pod bieżącą wodą; za pomocą regularnie dezynfekowanego skalpela lub skrobaczki do ziemniaków usuwa się skórkę wokół piętki każdej bulwy; dezynfekcję narzędzi przeprowadza się przez ich zanurzenie w 70 % alkoholu i ich opalenie;
- 2) z części przystolonowej każdej bulwy pobiera się niewielki fragment tkanki, obejmujący wiązki przewodzące, ograniczając ilość tkanki innej niż przewodząca do minimum, następnie tkankę poddaje się badaniom w ciągu 24 godzin, określonych w ust. 3 lub przechowuje się w temperaturze minus 20 °C do dwóch tygodni w sposób określony w ust. 3.

### 2. Badanie makroskopowe na obecność objawów chorobowych

Po pobraniu tkanki z części przystolonowej każdą bulwę kroji się w poprzek i bada na obecność objawów

<sup>1)</sup> Objawami obserwowanymi najwcześniej, głównie w pobliżu części przystolonowej, jest lekka szklistość lub przejrzystość tkanek, bez rozmiękczenia tkanki otaczającej wiązki przewodzące. Pierścień wiązek przewodzących w części przystolonowej może być nieznacznie ciemniejszy niż normalnie. Pierwszym, łatwym do rozpoznania objawem jest przebarwienie pierścienia wiązek przewodzących na żółtawo oraz wydostawanie się z nich serowatej masy po lekkim ściśnięciu bulwy. Wyciek ten zawiera miliony bakterii. W tym stadium wiązki przewodzące mogą ulec przebarwieniu na brązowo. Początkowo objawy te mogą być ograniczone do części pierścienia, niekoniecznie w pobliżu części przystolonowej, i mogą rozszerzać się stopniowo na cały pierścień. W miarę rozwoju infekcji dochodzi do zniszczenia wiązek przewodzących; tkanki bulwy kory pierwotnej mogą oddzielać się od miększu rdzeniowego. W zaawansowanym stadium infekcji na powierzchni bulwy pojawiają się spęknięcia, które często mają czerwonawobrazowe brzegi. Objawy mogą być maskowane przez wtórne patogeny bakteryjne czy grzybowe, stąd odróżnienie zaawansowanego stadium bakteriozy pierścieniowej od gnicia powodowanego przez inne czynniki może być trudne, a nawet niemożliwe.

bakteriozy pierścieniowej<sup>1)</sup>. W tym celu ściska się bulwę i sprawdza, czy z wiązek przewodzących nie wydostają się zmacerowane tkanki.

### 3. Przygotowanie prób do testu Grama, testu immunofluorescencji (IF) oraz testu oberżynowego

- 1) tkankę pobraną z części przystolonowej bulw homogenizuje się w środku nietoksycznym dla bakterii *Clavibacter michiganensis* ssp. *sepedonicus* (na przykład 0,05 M bufor fosforanowy /PBS/ o pH 7,0), w temperaturze poniżej 30 °C; zaleca się dodanie nietoksycznego środka rozdrabniającego; może być również niezbędne dodanie nietoksycznego środka zapobiegającego powstawaniu piany, o którym mowa w części II ust. 1; nie można dopuścić do nadmiernej maceracji;
- 2) zmacerowaną tkankę:
  - a) odwirowuje się z zastosowaniem parametru: 180 g/10 minut; uzyskany supernatant odwirowuje się z zastosowaniem parametru: 4000 g/10 minut, następnie zlewa się i usuwa supernatant albo
  - b) odstawia się na 30 minut w celu osadzenia się resztek roślinnych; zlewa się supernatant bez naruszania osadu, a następnie przefiltrowuje przez bibułę filtracyjną (Whatman nr 1) umieszczoną na filtrze szklanym (nr 2 = 40–100 µm), z zastosowaniem wodnej pompy próżniowej; filtrat zbiera się do probówki wirówkowej, a następnie przepłukuje sterylnym buforem PBS, tak aby uzyskać maksymalnie 35 ml filtratu, który odwirowuje się z zastosowaniem parametru 4000 g/20 minut;
- 3) osad zawiesza się w sterylnym buforze fosforanowym 0,01 M o pH 7,2, o którym mowa w części II ust. 2, w taki sposób, aby uzyskać całkowitą objętość około 1 ml, a następnie dzieli się na dwie równe części, jedną z nich pozostawia jako materiał referencyjny, zamrażając w temperaturze –20 °C lub liofilizując; pozostałą część dzieli się na połowę; jedną używa się do testu IF i barwienia Grama, drugą do testu oberżynowego;
- 4) wszystkie pozytywne kontrole bakterii *Clavibacter michiganensis* ssp. *sepedonicus* i próby traktuje się oddzielnie w celu uniknięcia kontaminacji; ma to zastosowanie w odniesieniu do preparatów IF i testu oberżynowego; w czasie wykonywania te-

stu IF i testu oberzynowego należy oddzielać od siebie kontrole pozytywne i badane próby w celu uniknięcia kontaminacji.

#### 4. Test Grama

- 1) przygotowuje się preparaty Grama ze wszystkich rozcieńczeń osadu, o których mowa w ust. 5 pkt 2, i ze wszystkich przeciętych bulw, o których mowa w ust. 2, które na przekroju wykazują szklistość, zgniliznę czy inne podejrzane objawy; materiał do analiz pobiera się z brzegu porażonych tkanek;
- 2) przygotowuje się preparaty Grama ze znanych kultur bakterii *Clavibacter michiganensis* ssp. *sepedonicus* oraz, w miarę możliwości, z naturalnie porażonych tkanek, o których mowa w ust. 5 pkt 1;
- 3) określa się, które próby zawierają typowe, Gram dodatnie, maczugowate komórki; komórki bakterii *Clavibacter michiganensis* ssp. *sepedonicus* mają na ogół długość 0,8 do 1,2  $\mu\text{m}$  i szerokość 0,4—0,6  $\mu\text{m}^2$ ; procedura barwienia jest określona w części 2 ust. 3.

<sup>2)</sup> W preparatach z naturalnie zainfekowanych tkanek lub świeżo wyizolowanych kultur często dominują zaokrąglone pałeczki, zwykle nieznacznie mniejsze niż komórki ze starszych kultur wyhodowanych na agarze. Na większości podłoży hodowlanych komórki bakterii *Clavibacter michiganensis* ssp. *sepedonicus* są pleomorficznymi, maczugowatymi pałeczkami i mogą wykazywać zmienność w reakcji Grama. Komórki występują pojedynczo, układają się w pary z charakterystycznym wygięciem, co ma związek z ich podziałem, czasami tworzą nieregularne grupy przypominające palisady lub chińskie litery.

#### 5. Test IF

1) w teście IF używa się przeciwciał na znany szczep bakterii *Clavibacter michiganensis* ssp. *sepedonicus* — ATCC 33113 (NCPBP 2137) lub NCPBP 2140, o mianie powyżej 1:600; w preparacie z badaną próbą uwzględnia się kontrolę PBS w celu sprawdzenia, czy koniugat izotiocyjanianu fluoresceiny przeciw immunoglobulinom króliczym (FITC) nie łączy się niespecyficznie z komórkami bakterii; jako kontrolę pozytywną na oddzielnym szkiełku stosuje się kulturę bakterii *Clavibacter michiganensis* ssp. *sepedonicus* (ATCC 33113 /NCPBP 2137/NCPBP 2140) oraz w miarę możliwości umieszcza się naturalnie zainfekowaną tkankę (zachowaną w formie zliofilizowanej lub zamrożoną w temperaturze  $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$ ), zgodnie ze schematem 2;

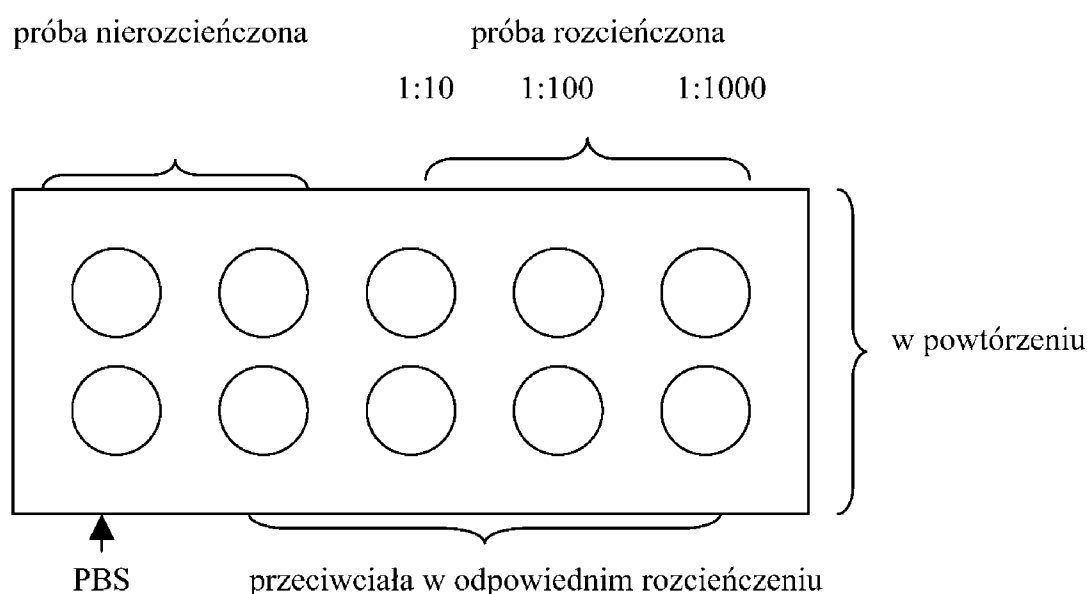
2) sposób wykonania badania:

a) przygotowuje się trzy seryjne dziesięciokrotne rozcieńczenia (1:10, 1:100 i 1:1000) osadu w wodzie destylowanej (schemat 1),

b) na okienka wielopunktowego szkiełka mikroskopowego nanosi się za pomocą pipety odmierzoną standardową objętość każdego rozcieńczenia osadu lub zawiesiny bakterii *Clavibacter michiganensis* ssp. *sepedonicus* (średnio  $10^6$  komórek/ml), wystarczającą do pokrycia okienka (średnio 25  $\mu\text{l}$ ),

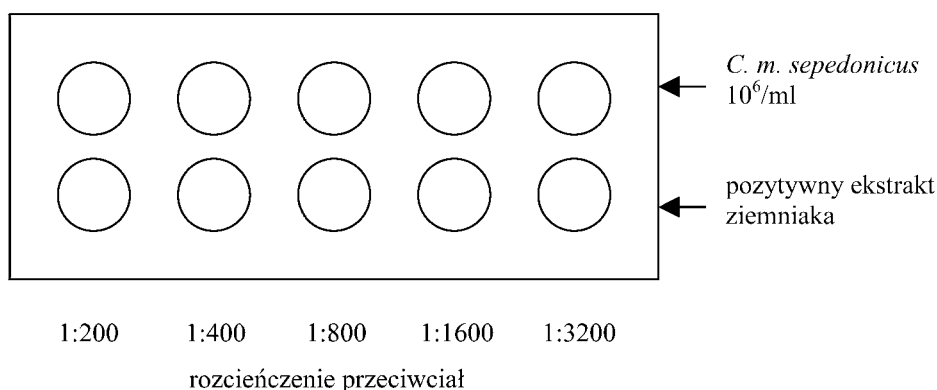
Schemat 1

Preparaty z próby i kontrola PBS



## Schemat 2

## Preparat z kontrolą pozytywną



- c) preparat suszy się w temperaturze około 37 °C, a następnie utrwalą z użyciem etanolu lub przez opalenie,
- d) okienka pokrywa się przeciwciałami na bakterię *Clavibacter michiganensis* ssp. *sepedonicus* rozcieńczonymi w 0,01 M buforze PBS o pH 7,2, o którym mowa w części II ust. 2, jak pokazano na schemacie 1; używa się PBS jako kontrolę FITC; rozcieńczenie robocze przeciwciał stanowi zwykle połowę miana; w przypadku użycia innych rozcieńczeń przeciwciał, dla każdego rozcieńczenia przygotowuje się oddzielne preparaty,
- e) preparat inkubuje się w wilgotnej komorze w temperaturze pokojowej przez 30 minut,
- f) po inkubacji preparat ostrożnie spłukuje się 0,01 M buforem PBS o pH 7,2, a następnie moczy się trzy razy po 5 minut w 0,01 M buforze PBS o pH 7,2,
- g) ostrożnie usuwa się nadmiar wilgoci,
- h) każde okienko preparatu pokrywa się koniugatem FITC w takim rozcieńczeniu, jakie było stosowane do określania miana, i inkubuje się w ciemnej, wilgotnej komorze przez 30 minut w temperaturze pokojowej,
- i) preparat spłukuje się i moczy, tak jak w lit. f,
- j) na każde okienko nanosi się średnio od 5 do 10  $\mu$ l 0,1 M buforu fosforanowego z gliceryną o pH 7,6, o którym mowa w części II ust 2 (lub podobnego utrwalacza o pH nie niższym niż 7,6) i przykrywa szkiełkiem nakrywkowym,
- k) przygotowany preparat przegląda się w mikroskopie zaopatrzonym w źródło światła epifluorescencyjnego i filtry przeznaczone do pracy z FITC; stosuje się powiększenie 400 do 1000; okienka w powtórzeniach przegląda się w poprzek dwóch średnic pod kątem prostym oraz wokół obwodu okienka.

Poszukuje się fluoryzujących komórek w kontrolach pozytywnych i określa się miano przeciwciał. Na-

stępnie poszukuje się fluoryzujących komórek w okienku kontrolnym FITC/PBS i, jeżeli się ich nie stwierdzi, przechodzi się do przeglądania okienek z badaną próbą. W minimum 10 polach mikroskopu określa się średnią liczbę morfologicznie typowych, fluoryzujących komórek w polu widzenia i oblicza się ich liczbę w mililitrze nierozcieńczonego osadu według wzoru określonego w części II ust. 4.

Przy ocenie preparatów bierze się pod uwagę możliwość wystąpienia reakcji krzyżowych. W osadzie ziemniaka mogą występować populacje fluoryzujących komórek o nietypowej dla bakterii *Clavibacter michiganensis* ssp. *sepedonicus* morfologii oraz bakterie saprofityczne dające reakcje krzyżowe, o wymiarach i morfologii podobnych do bakterii *Clavibacter michiganensis* ssp. *sepedonicus*, dlatego też bierze się pod uwagę tylko fluoryzujące komórki o typowych wymiarach i morfologii. Ze względu na możliwość występowania reakcji krzyżowych, próby, w przypadku których uzyskano pozytywne wyniki testu IF, poddaje się powtórным badaniom z zastosowaniem innych przeciwciał.

Techniczna granica wykrywalności określona dla tego testu zawiera się w przedziale  $10^3$ - $10^4$  komórek/ml nierozcieńczonego osadu. Próby, w których stwierdza się ilość typowych fluorescencyjnych komórek na granicy wykrywalności, są zwykle wolne od *Clavibacter michiganensis* ssp. *sepedonicus*, ale mogą być poddane testowi oberzynowemu.

Wynik testu IF traktuje się jako negatywny w przypadku prób, w których nie stwierdza się morfologicznie typowych fluoryzujących komórek. Próby takie uznaje się za „nieporażone” przez bakterie *Clavibacter michiganensis* ssp. *sepedonicus*. Test oberzynowy nie jest wymagany.

Wynik testu IF traktuje się jako pozytywny w przypadku prób, w których obecne są morfologicznie typowe, fluoryzujące komórki.

Próby, w przypadku których uzyskuje się pozytywny wynik testu IF z zastosowaniem obydwu rodzajów przeciwciał, uznaje się za „potencjalnie porażone”

przez bakterie *Clavibacter michiganensis* ssp. *sepedonicus*.

W przypadku wszystkich prób uznanych za „potencjalnie porażone” wykonuje się test oberżynowy.

## 6. Test oberżynowy

Sposób uprawy oberżyny określony jest w części II ust. 5.

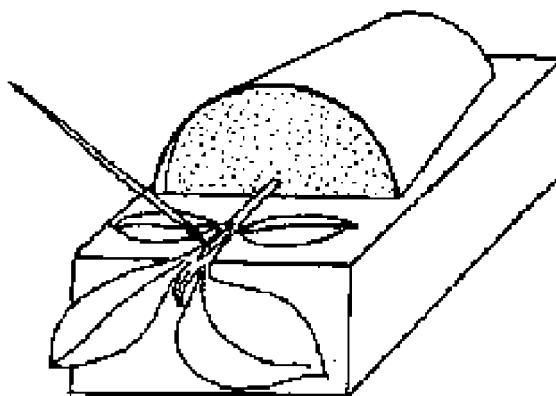
Test oberżynowy przeprowadza się w następujący sposób:

- 1) osadem, który otrzymano w sposób określony w ust 3 pkt 3, inokuluje się co najmniej 25 roślin oberżyny w stadium trzeciego liścia uzyskanych

w sposób określony w części II ust. 5, za pomocą jednej z metod, o których mowa w ust. 6 pkt 2, 3 i 4;

- 2) inokulacji przez nacięcie na łodydze — pierwszy sposób:

- a) każdą doniczkę umieszcza się poziomo w bloczku z polistyrenu (w przypadku doniczki o średnicy 10 cm odpowiedni jest bloczek z polistyrenu z wydrążonym z jednej strony miejscem o głębokości 5 cm, szerokości 10 cm i długości 15 cm), w sposób przedstawiony na schemacie 3; pomiędzy łodygą a bloczkiem, dla każdej próby, umieszcza się pasek sterylnej folii aluminiowej; roślinę można zabezpieczyć za pomocą gumowej opaski nałożonej wokół bloczka,



Schemat 3

- b) pomiędzy liścieniami i pierwszym liściem, wykonuje się za pomocą skalpela podłużne lub lekko ukośne nacięcie o długości 0,5—1,0 cm i głębokości średnio 3/4 średnicy łodygi,
  - c) nacięcie rozchyła się za pomocą skalpela i wprowadza do niego inokulum cienkim pędzelkiem zanurzonym w osadzie. Pozostały osad rozdziela się pomiędzy rośliny oberżyny,
  - d) powstałą ranę zabezpiecza się 2 ml sterylnej wazeliny naniesionej za pomocą strzykawki;
- 3) inokulacja przez nacięcie na łodydze — drugi sposób:
    - a) trzymając roślinę pomiędzy dwoma palcami, w miejscu pomiędzy liścieniami i pierwszym liściem nanosi się kroplę (średnio od 5 do 10  $\mu$ l) zawiesiny osadu,
    - b) za pomocą sterylnej skalpela wykonuje się podłużne (pod kątem około 5 °) nacięcie, o długości 1,0 cm i głębokości średnio 2/3 grubości łodygi, rozpoczynając od miejsca naniesienia kropli osadu,
    - c) powstałą ranę zabezpiecza się sterylną wazeliną ze strzykawki;
  - 4) inokulacja za pomocą strzykawki — trzeci sposób:
    - a) nie podlewa się roślin oberżyny przez jeden dzień przed inokulacją w celu obniżenia ciśnienia turgorowego,
    - b) łodygi oberżyny powyżej liścieni inokuluje się za pomocą strzykawki z igłą do iniekcji podskórnej (nie mniejszej niż 23 G); osad rozdziela się pomiędzy rośliny oberżyny;
  - 5) inokuluje się 25 roślin oberżyny kulturą bakterii zidentyfikowaną wcześniej jako kultura bakterii *Clavibacter michiganensis* ssp. *sepedonicus* i, w miarę możliwości, naturalnie zainfekowaną tkanką ziemniaka, o której mowa w ust. 5 pkt 1, za pomocą tej samej metody inokulacji;
  - 6) inokuluje się 25 roślin sterylnym 0,05 M buforem PBS za pomocą tej samej metody inokulacji;
  - 7) rośliny inkubuje się w odpowiednich warunkach, o których mowa w części II ust. 5, przez 40 dni; po 8 dniach obserwuje się rośliny w celu stwierdzenia



nia, czy nie występują na nich objawy choroby<sup>3)</sup> oraz notuje się liczbę roślin wykazującą objawy;

8) przygotowuje się preparaty Grama, o których mowa w ust. 4, dla wszystkich partii oberżyny wykazujących objawy, wykonując przekroje przez tkankę zwiędłego liścia lub łodygi rośliny, oraz dokonuje się izolacji na odpowiednie podłoże odżywcze, o którym mowa w ust. 7; liście i łodygi oberżyny dezynfekuje się powierzchniowo przez zwilżenie ich 70 % etanolem;

9) przy ocenie roślin testowych bierze się pod uwagę możliwość wystąpienia infekcji latentnej, szczególnie gdy uprawa nie jest prowadzona w optymalnych warunkach, nawet po 40-dniowej inkubacji. Infekcje takie mogą prowadzić do zahamowania wzrostu i braku wigoru inokulowanych roślin; jeżeli wynik testu IF uznany jest za pozytywny, koniecznym może być przeprowadzenie dodatkowych badań, dlatego też należy dokonać porównania tempa wzrostu wszystkich badanych roślin oberżyny z roślinami kontrolnymi inokulowanymi sterylnym 0,05 M PBS oraz monitorowanie warunków środowiska szklarni; dalszą ocenę prowadzi się w następujący sposób:

a) odcina się łodygi powyżej miejsca inokulacji i usuwa się liście,

b) łodygi maceruje się w 0,05 M buforze PBS o pH 7,0 w sposób określony w ust. 3 pkt 1 i 2,

c) połowę osadu używa się do wykonania testu Grama i testu IF,

d) drugą połowę osadu używa się do przeprowadzenia dodatkowego testu oberżynowego, zgodnie z ust. 6, jeżeli uzyskano wyniki pozytywne testu Grama lub testu IF; stosuje się kontrolę pozytywną, którą stanowi zidentyfikowaną wcześniej kulturę bakterii *Clavibacter michiganensis* ssp. *sepedonicus*, oraz kontrolę negatywną w postaci sterylnego 0,05 M buforu PBS;

jeżeli w kolejnych testach nie są obserwowane objawy, próbę uznaje się jako negatywną.

## 7. Izolacja bakterii *Clavibacter michiganensis* ssp. *sepedonicus*

Ostateczną diagnozę stawia się wyłącznie po przeprowadzeniu identyfikacji wyizolowanych kultur bakterii *Clavibacter michiganensis* ssp. *sepedonicus*, o której mowa w ust. 8. Bakterię *Clavibacter michiganensis* ssp. *sepedonicus* można wyizolować z tkanek wykazujących objawy chorobowe. Bezpośrednia izolacja bakterii *Clavibacter michiganensis* ssp. *sepedonicus* z osadu uzyskanego z tkanki ziemniaka, o którym mowa w ust. 3 pkt 3, nie jest zalecana.

Rośliny oberżyny stanowią swoiste podłoże umożliwiające namnożenie się bakterii *Clavibacter michiganensis* ssp. *sepedonicus*, jak również są najlepszą testową rośliną żywicielską. Bakterię izoluje się ze wszystkich bulw ziemniaka i roślin oberżyny wykazujących objawy, o których mowa w ust. 4 i 6. Macerację łodyg oberżyny, o ile jest to konieczne, wykonuje się zgodnie z ust. 3 i 6 pkt 9:

1) zawieszinę posiewa się na jedno z następujących podłoży, określonych w części II ust. 6:

— Nutrient dextrose agar (agar odżywczy z glukozą) (tylko do przeszczepiania),

— Yeast peptone glucose agar (agar drożdżowo-peptonowo-glukozowy),

— Nutrient yeast dextrose agar (agar odżywczy drożdżowo-glukozowy),

— Yeast extract mineral salts agar (agar z wyciągiem drożdżowym wzbogacony solami mineralnymi).

Szalki inkubuje się w temperaturze 21 °C do 20 dni, a następnie obserwuje się, czy na podłożu obecne są kolonie bakterii o morfologii typowej dla bakterii *Clavibacter michiganensis* ssp. *sepedonicus*.<sup>4)</sup> Następnie bakterię *Clavibacter michiganensis* ssp. *sepedonicus* przeszczepia się w celu uzyskania czystej kultury.

## 8. Identyfikacja wyizolowanych kultur bakterii

Ze zdrowych lub porażonych ziemniaków i oberżyny można wyizolować wiele Gram dodatnich, maczugowatych bakterii, wytwarzających kolonie podobne do tych produkowanych przez bakterie *Clavibacter michiganensis* ssp. *sepedonicus*. Z tego względu dokonuje się identyfikacji bakterii *Clavibacter michiganensis* ssp. *sepedonicus* w oparciu o następujące testy:

1) test IF;

2) test oberżynowy;

<sup>4)</sup> Bakteria *Clavibacter michiganensis* ssp. *sepedonicus* jest organizmem wolnorosnącym. Typowe kolonie są kremowobiałe lub barwy kości stoniowej, okrągłe, gładkie, wzniesione, śluzowato-płynne, całobrzegie i zwykle mają średnicę 1 do 3 mm.

<sup>3)</sup> Bakteria *Clavibacter michiganensis* ssp. *sepedonicus* powoduje wędnięcie liści oberżyny, które może rozpocząć się wiotczeniem brzegów lub przestrzeni między nerwami. Zwiędłe tkanki mogą być początkowo ciemnozielone lub plamiste, lecz jaśnieją, zanim ulegną nekrozie. Wędnące tkanki między nerwami często sprawiają wrażenie natłuszczonych i uwodnionych. Tkanki nekrotyczne mają często jasnożółty brzeg. Rośliny nie zawsze zamierają; im dłuższy okres poprzedzający wystąpienie objawów, tym większa szansa na przeżycie. Rośliny mogą pokonać infekcję. Podatne, młode rośliny oberżyny są bardziej wrażliwe na niższe koncentracje bakterii *Clavibacter michiganensis* ssp. *sepedonicus* niż rośliny starsze, stąd konieczność stosowania do badań roślin w stadium trzeciego liścia lub nieco młodszych. Sprawcą wędnięcia mogą być również populacje innych bakterii lub grzybów zasiedlających tkanki bulwy. Do nich należą *Erwinia carotovora* subsp. *carotovora* i *E. carotovora* subsp. *atroseptica*, *Phoma exigua* var *foveata*, jak również duże populacje bakterii saprofitycznych. Tego typu wędnięcie można odróżnić od wędnięcia powodowanego przez bakterię *Clavibacter michiganensis* ssp. *sepedonicus*, ponieważ w pierwszym przypadku gwałtownie wędną całe liście lub całe rośliny.

3) testy biochemiczne i fizjologiczne, o których mowa w części II ust. 7:

- a) test oksydacyjno-fermentacyjny (O/F),
- b) test na obecność oksydazy,
- c) wzrost w temperaturze 37 °C,
- d) produkcja ureazy,
- e) hydroliza eskuliny,
- f) hydroliza skrobi,
- g) tolerancja w stosunku do 7 % NaCl,
- h) produkcja indolu,
- i) test na obecność katalazy,
- j) produkcja H<sub>2</sub>S,
- k) wykorzystanie cytrynianu,
- l) hydroliza żelatyny,
- m) wytwarzanie kwasu z: glicerolu, laktozy, ramnozy i salicyny,
- n) barwienie Grama.

W każdym teście uwzględnia się zidentyfikowaną wcześniej kulturę bakterii *Clavibacter michiganensis* ssp. *sepedonicus*. W testach biochemicznych i fizjologicznych wykorzystuje się kultury wyhodowane na agarze odżywczym. Cechy morfologiczne bakterii ocenia się na podstawie kultur wyrostych na agarze z glukozą.

Test IF wykonuje się z wykorzystaniem zawiesiny bakterii o stężeniu 10<sup>6</sup> komórek/ml. Wartość miana przeciwciał powinna być zbliżone do miana określonego w badaniu i użyciem zidentyfikowanej kultury bakterii *Clavibacter michiganensis* ssp. *sepedonicus*. Test oberzynowy wykonuje się z wykorzystaniem zawiesiny bakterii o stężeniu 10<sup>7</sup> komórek/ml. Do testu używa się 10 roślin dla każdej próby, stosując znaną kulturę bakterii *Clavibacter michiganensis* ssp. *sepedonicus* oraz wodę sterylną jako kontrolę pozytywną i negatywną.

W przypadku czystych kultur typowe objawy więdnienia uzyskuje się w ciągu 20 dni, lecz rośliny niewykazujące objawów po upływie tego czasu inkubuje się do końca 30-dniowego okresu w temperaturze optymalnej dla uprawy oberzyny, lecz nieprzekraczającej 30 °C. Jeżeli po 30 dniach objawy nie wystąpią, kultura nie może być uznana za patogeniczną formę bakterii *Clavibacter michiganensis* ssp. *sepedonicus*.

Test	Bakteria <i>Clavibacter michiganensis</i> ssp. <i>sepedonicus</i>
O/F	obojętna lub słabo utleniająca
oksydaza	—
katalaza	+
redukcja azotanów	—
aktywność ureazy	—
produkcja H <sub>2</sub> S	—
produkcja indolu	—
wykorzystanie cytrynianu	—
hydroliza skrobi	— lub słaba
wzrost w temperaturze 37 °C	—
wzrost w obecności 7 % NaCl	—
hydroliza żelatyny	—
hydroliza eskuliny	+
produkcja kwasu z:	
— glicerolu	—
— laktozy	— lub słaba
— ramnozy	—
— salicyny	—

## II. Odczynniki, podłoża i testy stosowane przy diagnozowaniu, wykrywaniu i identyfikacji bakterii *Clavibacter michiganensis* ssp. *sepedonicus*

### 1. Skład płynu do maceracji

D C silicone antifoam MS A compound (Hopkins & Williams Ltd, nr kat. 9964 — 25, Chadwell Heath, Essex, England) — środek przeciwpieniący	10 ml
Lubrol W w płatkach (ICI Ltd)	0,5 g
pirofosforan czterosodowy	1 g
0,05 M bufor fosforanowy, pH 7,0	1 litr

### 2. Bufory

1) 0,05 M bufor fosforanowy o pH 7,0 stosowany do maceracji tkanek ziemniaka, o której mowa w części I ust. 3 pkt 1

Na <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub>	4,26 g
KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>	2,72 g
NaCl	8,00 g
woda destylowana	— uzupełnia się do 1 litra

2) **0,01 M bufor fosforanowy o pH 7,2** stosowany do rozcieńczania przeciwciał i płukania preparatów w metodzie IF

$\text{Na}_2\text{HPO}_4 \times 12 \text{ H}_2\text{O}$	2,70 g
$\text{NaH}_2\text{PO}_4 \times 2 \text{ H}_2\text{O}$	0,40 g
NaCl	8,00 g
woda destylowana	uzupełnia się do 1 litra

3) **0,1 M bufor fosforanowy z gliceryną o pH 7,6** stosowany do zamykania preparatów, utrwała efekt fluorescencji

$\text{Na}_2\text{HPO}_4 \times 12 \text{ H}_2\text{O}$	3,20 g
$\text{NaH}_2\text{PO}_4 \times 2 \text{ H}_2\text{O}$	0,15 g
glicerol	50 ml
woda destylowana	100 ml

### 3. Test Grama (modyfikacja Huckera)

#### 1) Roztwór fioletu krystalicznego

2 g fioletu krystalicznego rozpuszcza się w 20 ml 95 % etanolu

0,8 g kwaśnego węglanu sodu rozpuszcza się w 80 ml wody destylowanej

Miesza się obydwie roztwory.

#### 2) Płyn Lugola

jod	1 g
jodek potasu	2 g
woda destylowana	300 ml

Substancje stałe rozdrabnia się razem w moździerzu. Dodaje się wodę i miesza w zamkniętym naczyniu do rozpuszczenia.

#### 3) Roztwór barwnika kontrastowego — safraniny

Roztwór podstawowy:

safranina O	2,5 g
95 % etanol	100 ml

Miesza się oba roztwory i przechowuje. W celu uzyskania roztworu roboczego, mieszaninę rozcieńcza się w stosunku 1:10.

#### 4) Procedura barwienia:

- przygotowuje się rozmaz, suszy się go powietrznie i utrwała termicznie,
- preparat zalewa się fioletem krystalicznym na 1 minutę,
- krótko przepłukuje się wodą z kranu,
- zalewa się płynem Lugola na 1 minutę,
- przepłukuje się wodą z kranu i osusza bibułą,
- preparat odbarwia się 95 % etanolem dodawanym kroplami aż do momentu, gdy rozmaz

przestanie uwalniać barwnik, lub zanurza się w alkoholu na 30 sekund lekko poruszając preparatem,

g) przepłukuje się wodą z kranu i osusza bibułą,

h) zalewa się roztworem safraniny na 10 sekund,

i) preparat przepłukuje się wodą z kranu i osusza bibułą.

Bakterie Gram dodatnie barwią się na kolor niebieskofioletowy, bakterie Gram ujemne na różowoczerwony.

### 4. Określanie populacji komórek pozytywnych w teście immunofluorescencji

Powierzchnia (S) okienka na szkiełku wielopunktowym

$$S = \frac{\pi D^2}{4} \quad (1)$$

gdzie:

D = średnica okienka.

Powierzchnia (s) pola widzenia obiektywu

$$S = \frac{\pi d^2}{4} \quad (2)$$

gdzie:

d = średnica pola widzenia.

d określa się na podstawie bezpośredniego pomiaru lub według następującego wzoru:

$$s = \frac{\pi i^2}{G^2 \cdot K^2 \cdot 4} \quad (3)$$

gdzie:

i = współczynnik pola (zależy od typu okularu i zawiera się w granicach od 8 do 24),

K = współczynnik tubusa (1 lub 1,25)

G = powiększenie 100x, 40x obiektywu,

na podstawie (2) 
$$d = \sqrt{\frac{4s}{\pi}}$$

na podstawie (3) 
$$d = \sqrt{\frac{4 \cdot \frac{\pi i^2}{G^2 K^2 \cdot 4}}{\pi}} = \frac{i}{GK} \quad (4)$$

Liczy się typowe fluoryzujące komórki w polu widzenia (c).

Określa się liczbę typowych fluoryzujących komórek w okienku (C).

$$C = c \frac{S}{s}$$

Określa się liczbę typowych fluoryzujących komórek w ml osadu (N)

$$N = C \cdot \frac{1000}{y} \cdot F$$

gdzie:

y = objętość osadu naniesionego na okienko,

F = współczynnik rozcieńczenia osadu.

### 5. Uprawa oberżyny

Nasiona oberżyny (*Solanum melongena* odmiana Black Beauty) wysiewa się do pasteryzowanego kompostu. Siewki z w pełni rozwiniętymi liścieniami (10—14-dniowe) przesadza się do pasteryzowanego kompostu w doniczkach. Do badań używa się oberżynę w stadium trzeciego liścia, gdy dwa, lecz nie więcej niż trzy liście, są w pełni rozwinięte. Oberżynę hoduje się w szklarni w następujących warunkach środowiska:

— długość dnia: 14 godzin lub naturalna długość dnia w przypadku dnia dłuższego;

— temperatura: dzień: 21—24 °C, noc: 15 °C.

Bakteria *Clavibacter michiganensis* ssp. *sepedonicus* nie rośnie w temperaturze powyżej 30 °C. Jeżeli temperatura nocą nie spada do 15 °C, może wystąpić uszkodzenie chromatoforów, co uwidoczni się w postaci srebrzystej nekrozy. Uszkodzeniom korzeni przez larwy ziemiówek zapobiega się przez zastosowanie odpowiedniego insektycydu.

### 6. Podłoża do hodowli i izolacji bakterii *Clavibacter michiganensis* ssp. *sepedonicus*

#### 1) Nutrient agar (NA) — agar odżywczy

Difco Bacto Nutrient Agar rozpuszcza się w wodzie destylowanej według proporcji podanych przez producenta, a następnie sterylizuje w autoklawie w temperaturze 121 °C przez 15 minut.

#### 2) Nutrient dextrose agar (NDA) — agar odżywczy z glukozą

Pożywkę agarową Difco Bacto Nutrient Agar zawierającą 1 % D(+) glukozy (jednowodna), po przygotowaniu według zaleceń producenta, sterylizuje się w autoklawie w temperaturze 115 °C przez 20 minut.

#### 3) Yeast peptone glucose agar (YPGA) — agar drożdżowo-peptonowo-glukozowy

Difco Bacto Yeast Extract (nr 0127) (wyciąg drożdżowy)	5 g
Difco Bacto Peptone (nr 0118)	5 g
D(+)-glukoza (jednowodna)	10 g
Difco Bacto Purified Agar (nr 0560) (agar oczyszczony)	15 g
woda destylowana	1 litr

Pożywkę w porcjach półlitrowych sterylizuje się w autoklawie w temperaturze 115 °C przez 20 minut.

#### 4) Yeast extract mineral salts medium (YGM) — pożywka z wyciągiem drożdżowym wzbogaconą solami mineralnymi

Difco Bacto Yeast Extract (wyciąg drożdżowy)	2,00 g
D(+)-glukoza (jednowodna)	2,50 g
K <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub>	0,25 g
KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>	0,25 g
MgSO <sub>4</sub> × 7H <sub>2</sub> O	0,10 g
MnSO <sub>4</sub> × H <sub>2</sub> O	0,015 g
NaCl	0,05 g
FeSO <sub>4</sub> × 7H <sub>2</sub> O	0,005 g
Difco Bacto Purified Agar (agar oczyszczony)	18,0 g
woda destylowana	1 litr

Pożywkę w porcjach półlitrowych sterylizuje się w autoklawie w temperaturze 115 °C przez 20 minut.

### 7. Testy biochemiczne i fizjologiczne do identyfikacji bakterii *Clavibacter michiganensis* ssp. *sepedonicus*

Wszystkie podłoża inkubuje się w temperaturze 21 °C i przegląda się po 6 dniach. Jeżeli nie obserwuje się wzrostu bakterii, inkubuje się podłoża dalej do 20 dni.

#### 1) Test oksydacyjno-fermentacyjny test O/F

Pożywka podstawowa:	
KCl	0,2 g
MgSO <sub>4</sub> × 7H <sub>2</sub> O	0,2 g
NH <sub>4</sub> H <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>	1,0 g
Difco bacto pepton	1,0 g
Difco Bacto Purified Agar (agar oczyszczony)	3,0 g
D(+) glukoza (jednowodna)	10,0 g
błękit bromotymolowy	0,03 g
woda destylowana	1 litr

Miesza się składniki i ustala pH na poziomie 7,0—7,2 za pomocą 1N KOH. Rozdziela się po 5 ml i 10 ml do probówek bakteryjnych o wymiarach 16 mm x 100 mm (objętość 12 ml). Probówki z pożywką sterylizuje się w autoklawie w temperaturze 115 °C przez 10 minut. Każdą kulturą inokuluje się podłoże w 5 ml i 10 ml probówkach metodą nakłucia. Do probówki 10 ml dodaje się aseptycznie 1—2 ml sterylnej, ciekłej parafiny, a następnie inkubuje się.

Odczyt wyniku:

Probówka	Kolor	Interpretacja
otwarta	żółty	metabolizm
zamknięta	żółty	fermentacyjny
otwarta	żółty	metabolizm
zamknięta	niebieskozielony	oksydacyjny
otwarta	zielonkawy	metabolizm
zamknięta	niebieskozielony	oksydacyjny lub obojętny

**2) Test na obecność oksydazy**

Odczynnik Kovacs stanowi 1 % roztwór wodny dwuhydrochloru tetrametylparafenylenodwuminy (BDH nr 30386) w wodzie destylowanej.

Odczynnik ten sporządza się na bieżące potrzeby w objętościach 1 ml lub przechowuje się go w ciemnej, szklanej butelce w temperaturze 5 °C przez 1—4 tygodni. Kroplę odczynnika nanosi się na bibułę filtracyjną w czystej płytce Petriego. Jednocześnie pobiera się badaną kulturę z agaru odżywczego za pomocą platynowej ezy.

Reakcję pozytywną stwierdza się na podstawie wystąpienia purpurowego zabarwienia w ciągu 10 sekund. Reakcja taka uzyskana w ciągu 10—30 sekund daje wynik słabo dodatni.

Przy przeprowadzaniu testu należy stosować platynową eżę i kulturę z agaru odżywczego, gdyż śladowe ilości żelaza lub duża zawartość cukru w podłożu wzrostowym może wpływać na fałszywie pozytywne wyniki.

**3) Produkcja kwasu z laktozy, ramnozy, salicyny, glicerolu**

Przygotowuje się podłoże O/F Hugh i Leifsona bez glukozy, a następnie rozlewa do probówek po 5 ml. Probówki wraz z podłożem sterylizuje się w autoklawie w temperaturze 115 °C przez 10 minut. Do płynnego podłoża podstawowego o temperaturze 45 °C dodaje się, aseptycznie przez filtr, 0,5 ml 10 % roztworu wodnego glicerolu lub laktozy lub ramnozy lub salicyny. Ostrożnie miesza się.

Reakcję pozytywną stwierdza się na podstawie zmiany zabarwienia z niebieskozielonego na żółte, wskazującego na produkcję kwasu.

**4) Test na obecność katalazy**

Kroplę nadtlenu wodoru (30 objętości) umieszcza się na czystym szkiełku przedmiotowym i miesza z kulturą bakterii za pomocą platynowej ezy.

Reakcję pozytywną stwierdza się na podstawie wydzielanych pęcherzyków gazu, wskazujących na obecność katalazy.

**5) Aktywność reduktazy azotanowej i denitryfikacja**

Podłoże hodowlane:

KNO <sub>3</sub> (bez azotynu)	1 g
Difco bacto yeast extract	1 g
K <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub>	5 g
woda destylowana	1 litr

Rozlewa się po 10 ml do butelek o pojemności 20 ml, a następnie sterylizuje w autoklawie w temperaturze 121 °C przez 15 minut.

Odczynnik A:

H <sub>2</sub> SO <sub>4</sub>	8 g
5 N kwas octowy	1 litr

Odczynnik B:

naftyloamina	5 g
5 N kwas octowy	1 litr

Podłoże azotanowe inokuluje się w dwóch powtórzeniach, a następnie bada po 10 i 20 dniach przez dodanie 1 kropli płynu Lugola, 0,5 ml odczynnika A i 0,5 ml odczynnika B. Jeżeli podłoże nie zmieni barwy na czerwona, dodaje się około 50 mg sproszkowanego cynku i obserwuje reakcję barwną.

Reakcja pozytywna	Reakcja barwna	
	stadium 1	stadium 2
brak redukcji azotanów	bezbarwna	czerwona
redukcja azotanów do azotynów (tylko reduktaza azotanowa)	czerwona	—
redukcja azotanów poniżej azotynów (denitryfikacja — reduktaza azotanowa i azotynowa)	bezbarwna	bezbarwna

**6) Produkcja ureazy**

Podłoże podstawowe:

Oxoid urea agar base (CM53)	2,4 g
woda destylowana	95 ml

Podłoże podstawowe sterylizuje się w autoklawie w temperaturze 115 °C przez 20 minut, następnie schładza do temperatury 50 °C, dodaje się, aseptycznie przez filtr, 5 ml 40 % roztworu wodnego mocznika (Oxoid SR20) i dokładnie miesza się.

Pożywkę rozlewa się po 6 ml do sterylnych probówek (16 x 100 mm) i pozostawia do zastygnięcia w postaci skosów.

Reakcję pozytywną, w przypadku aktywności ureazy, stwierdza się na podstawie zmiany barwy

podłoża z żółtopomarańczowej na barwę wiśniowoczerwoną lub karmazynoworóżową.

**7) Wykorzystanie cytrynianu**

Citrate agar base (Merck 2503)	23 g
woda destylowana	1 litr

Wymienione składniki miesza się i rozpuszcza przez podgrzanie, a następnie rozlewa po 6 ml, tak jak w przypadku podłoża z mocznikiem. Pożywkę sterylizuje się w autoklawie w temperaturze 121 °C przez 15 minut i pozostawia do zastygnięcia w postaci skosów.

Reakcję pozytywną stwierdza się na podstawie zmiany zabarwienia podłoża z pomarańczowego na czerwone.

**8) Wytwarzanie siarkowodoru**

Podłoże:

Difco bacto tryptone (nr 0123)	10 g
K <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub>	1 g
NaCl	5 g
woda destylowana	1 litr

Składniki rozpuszcza się i rozlewa po 6 ml do probówek o wymiarach 16 x 100 ml, a następnie sterylizuje w autoklawie w temperaturze 115 °C przez 10 minut. Podłoże zaszczenia się badaną kulturą bakterii, a z brzegu probówki zawiesza się aseptycznie papierek nasycony octanem ołowiowym i mocuje się za pomocą korka. Inkubuje się do 20 dni.

Reakcję pozytywną, będącą dowodem na produkcję H<sub>2</sub>S z tryptonu, stwierdza się na podstawie przebarwienia papierka testowego na kolor czarnobrazowy.

**9) Wytwarzanie indolu**

Podłoże przygotowuje się tak, jak w teście na wytwarzanie H<sub>2</sub>S.

Usuwa się papierek nasycony octanem ołowiu, dodaje 1–2 ml eteru dwuetylowego i delikatnie wstrząsa. Odstawia się probówkę w celu rozdzielania warstw (5 minut), a następnie dodaje 0,5 ml odczynnika Kovacs, wprowadzając do wnętrza przechylonej probówki.

Reakcją pozytywną, świadczącą o obecności indolu, jest pojawienie się czerwonej barwy w żółtej warstwie pomiędzy eterem i frakcjami wodnymi.

**10) Wzrost w temperaturze 37 °C**

Podłoże:

Difco bacto nutrient broth (nr 0003)	8 g
woda destylowana	1 litr

Miesza się składniki, rozpuszcza i rozlewa do probówek po 6 ml, a następnie sterylizuje się w autoklawie w temperaturze 121 °C przez 15 minut. Probówkę wraz z podłożem inokuluje się badaną kulturą bakterii i inkubuje w temperaturze 37 °C.

Reakcję pozytywną stwierdza się na podstawie wzrostu bakterii.

**11) Wzrost w obecności 7 % chlorku sodu**

Podłoże:

Difco bacto nutrient broth	8 g
NaCl	70 g
woda destylowana	1 litr

Składniki miesza się, rozpuszcza i rozlewa do probówek po 6 ml. Następnie sterylizuje w autoklawie w temperaturze 121 °C przez 15 minut.

Reakcję pozytywną stwierdza się na podstawie wzrostu bakterii.

**12) Hydroliza żelatyny**

Podłoże:

Difco bacto gelatine (nr 0143)	120 g
woda destylowana	1 litr

Składniki miesza się, rozpuszcza przez podgrzanie i rozlewa do probówek po 6 ml. Następnie sterylizuje się w autoklawie w temperaturze 121 °C przez 15 minut.

Reakcję pozytywną stwierdza się na podstawie rozpuszczonej żelatyny, nawet w przypadku utrzymywania jej w temperaturze 5 °C przez 30 minut.

**13) Hydroliza skrobi**

Podłoże:

Difco Bacto Nutrient Agar (płynny agar odżywczy)	1 litr
Difco bacto soluble starch (nr 0178) (skrobia rozpuszczalna)	2 g

Składniki miesza się, sterylizuje w autoklawie w temperaturze 115 °C przez 10 minut, a następnie rozlewa do płytek. Płytki inokuluje się punktowo badaną kulturą bakterii. Po uzyskaniu obfitego wzrostu bakterii (inkubuje 10 do 20 dni), usuwa się częściowo bakterie z pożywki i płytkę zalewa się płynem Lugola.

Reakcję pozytywną stwierdza się na podstawie wystąpienia strefy przejaśnienia wokół kolonii bakterii i zabarwieniu pozostałej części pożywki na purpurowo.

**14) Aktywność hydrolazy eskuliny**

Podłoże:

Difco Bacto Peptone	10 g
Eskulina	1 g
cytrynian żelazowy (Merck 3862)	0,05 g
cytrynian sodowy	1 g
woda destylowana	1 litr

Składniki miesza się i rozlewa do probówek po 6 ml, a następnie sterylizuje w autoklawie w temperaturze 115 °C przez 10 minut. Pożywka jest przezroczysta, wykazuje jednak niebieskawą fluorescencję.

Reakcję pozytywną, będącą dowodem na hydrolizę eskuliny, stwierdza się na podstawie brązowego zabarwienia połączonego z zanikiem fluorescencji. Zjawisko to można sprawdzić stosując lampę ultravioletową.