

## 775

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 *Ralstonia solanacearum*<sup>2)</sup>**

Na podstawie art. 10 ust. 1 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 szczegółowe sposoby postępowania przy zwalczaniu i zapobieganiu rozprzestrzenianiu się bakterii *Ralstonia solanacearum*, powodującej chorobę zwaną śluzakiem, w celu jej zlokalizowania i określenia rozprzestrzenienia, niedopuszczenia do jej wystąpienia i rozprzestrzenienia oraz zwalczania i zniszczenia tej bakterii, w tym:

- 1) metody zwalczania i zapobiegania rozprzestrzenianiu się;
- 2) metody wykrywania i identyfikacji;
- 3) sposób wyznaczania stref, w których powinny być stosowane środki w celu zwalczania lub zapobiegania rozprzestrzenianiu się bakterii;
- 4) warunki prowadzenia produkcji, obrotu, przemieszczania, przechowania, nabywania lub zbywania roślin.

§ 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 w obrębie kilku gospodarstw, stanowiące jedną zorganizowaną całość;
- 5) sadzeniaki ziemniaka — ziemniaki przeznaczone do sadzenia, pochodzące w linii prostej z materiału uzyskanego według urzędowo zatwierdzonego programu, w którym materiał uznano za wolny od organizmów szkodliwych w wyniku badań urzędowych lub nadzorowanych z urzędu, wykonanych z zastosowaniem metody określonej w załączniku do rozporządzenia.

§ 3. Kontroli mającej na celu sprawdzenie występowania bakterii *Ralstonia solanacearum*, zwanej dalej „kontrolą urzędową”, podlegają:

- 1) rośliny ziemniaka (*Solanum tuberosum*), w tym bulwy, z wyjątkiem nasion;
- 2) rośliny pomidora (*Lycopersicon esculentum*), z wyjątkiem owoców i nasion;
- 3) miejsca produkcji roślin, o których mowa w pkt 1 i 2, jeżeli istnieje ryzyko rozprzestrzeniania się bakterii *Ralstonia solanacearum*;
- 4) inne rośliny żywicielskie wraz z dziko rosnącymi roślinami psiankowatymi;
- 5) wody powierzchniowe wykorzystywane do nawadniania lub oprysków roślin wymienionych w pkt 1 i 2;
- 6) płynne resztki powstające w czasie procesów przemysłowych lub w miejscach pakowania roślin, o których mowa w pkt 1 i 2, wykorzystywane do nawadniania lub oprysków tych roślin;
- 7) podłoża uprawowe, gleba i resztki stałe powstające w czasie procesów przemysłowych lub w miejscach pakowania roślin, jeżeli istnieje ryzyko rozprzestrzeniania się bakterii *Ralstonia solanacearum*.

§ 4. 1. Kontrole urzędowe wojewódzki inspektor ochrony roślin i nasiennictwa, zwany dalej „wojewódzkim inspektorem”, przeprowadza w zakresach i terminach uwzględniających systemy produkcji roślin ziemniaka, pomidora lub innych roślin żywicielskich bakterii *Ralstonia solanacearum* oraz biologię tej bakterii, a także wiedzę naukową w tym zakresie.

<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 98/57/EEC z dnia 20 lipca 1998 r. w sprawie zwalczania *Ralstonia solanacearum* (Smith) Yabuuchi et. al. (Dz. Urz. WE L 235, z 21.08.1998 r.).

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

2. Kontrole urzędowe obejmują, w przypadku:

1) ziemniaka:

- a) wizualną inspekcję uprawy roślin,
  - b) pobieranie prób, zarówno ziemniaków sadze- niaków, jak i innych ziemniaków, w czasie sezo- nu uprawy lub w przechowalni,
  - c) ocenę makroskopową bulw po ich przekrojeniu,
  - d) badanie laboratoryjne ziemniaków sadzenia- ków, z zastosowaniem metodyki określonej w załączniku do rozporządzenia;
- 2) pomidora — przynajmniej wizualną inspekcję ro- ślin, które są przeznaczone do sadzenia przez pod- mioty zawodowo trudniące się uprawą pomido- rów;
- 3) innych roślin żywicielskich bakterii *Ralstonia sola- nacearum* oraz podłoży, wody i resztek powstają- cych w czasie procesów przemysłowych lub w miejscach pakowania roślin ziemniaka lub po- midora, lub innych roślin żywicielskich:
- a) wizualną inspekcję roślin,
  - b) pobieranie i badanie prób.

§ 5. W przypadku podejrzenia wystąpienia bakterii *Ralstonia solanacearum*, wojewódzki inspektor prze- prowadzi badanie laboratoryjne:

- 1) roślin ziemniaka i pomidora — z zastosowaniem metodyki określonej w załączniku do rozporządze- nia;
- 2) innych roślin żywicielskich oraz wód powierzch- niowych, płynnych i stałych resztek powstających w czasie procesów przemysłowych lub w miej- scach pakowania roślin ziemniaka, pomidora i in- nych roślin żywicielskich, a także podłoży uprawo- wych i gleby — z zastosowaniem uznanych metod badawczych.

§ 6. Do czasu zakończenia badań laboratoryjnych mających na celu potwierdzenie lub wykluczenie po- rażenia roślin przez bakterię *Ralstonia solanacearum*, zabezpiecza się i przechowuje:

- 1) partię materiału roślinnego lub jej część, z której pobrano próbę, w oryginalnym opakowaniu wraz z etykietą;
- 2) pozostałą część próby, o której mowa w pkt 1, je- żeli to możliwe;
- 3) pozostały ekstrakt i dodatkowy materiał przygoto- wany do wstępnych badań umożliwiających po- stawienie wstępnej diagnozy;
- 4) całą dokumentację dotyczącą pobrania próby i ba- dań.

§ 7. 1. W przypadku podejrzenia wystąpienia lub w przypadku potwierdzenia w czasie badań laborato- ryjnych występowania bakterii *Ralstonia solanace-*

*arum*, Główny Inspektor Ochrony Roślin i Nasiennic- twa powiadamia o tym Komisję Europejską i inne pań- stwa członkowskie Unii Europejskiej.

2. W przypadku potwierdzenia w czasie badań la- boratoryjnych występowania bakterii *Ralstonia sola- nacearum*, przez co najmniej miesiąc od dnia powia- domienia, o którym mowa w ust. 1, zabezpiecza się i przechowuje:

- 1) cały materiał dotyczący pobrania próby i badań wraz z dokumentacją, o których mowa w § 6;
- 2) próbę porażonego materiału roślinnego pomidora lub oierzyny, zainokulowanego ekstraktem z bulw lub roślin, jeżeli to możliwe;
- 3) wyizolowaną kulturę bakterii *Ralstonia solana- cearum*.

§ 8. W przypadku pobrania prób do badań labora- toryjnych lub w przypadku podejrzenia wystąpienia porażenia przez bakterię *Ralstonia solanacearum*, je- żeli widoczne są objawy choroby, o których mowa w załączniku do rozporządzenia w części II, wywoły- wanej przez tę bakterię, i otrzymano pozytywny wynik po przeprowadzeniu wstępnych badań określonych w załączniku do rozporządzenia w części I w ust. 1 i w części II albo jeżeli objawy choroby nie są widocz- ne, a otrzymano pozytywny wynik po przeprowadze- niu badań określonych w załączniku do rozporządze- nia w części I w ust. 2 i w części III, do czasu uzyskania wyników potwierdzających lub wykluczających obec- ność bakterii *Ralstonia solanacearum*:

- 1) nie przemieszcza się roślin lub bulw pochodzą- cych ze wszystkich upraw, partii roślin lub przesy- łek, z których pobrano próby, chyba że przemiesz- czanie to odbywa się pod nadzorem wojewódzkie- go inspektora i jeżeli nie istnieje ryzyko rozprze- strzenia się bakterii *Ralstonia solanacearum*;
- 2) rośliny pochodzące z upraw, partii roślin lub prze- syłek, z których pobrano próby, nie mogą być przeznaczone do sadzenia i nie mogą być w czasie zbioru, transportu lub przechowywania, mieszane z innymi partiami roślin;
- 3) wojewódzki inspektor:
  - a) podejmuje czynności mające na celu wykrycie źródła pochodzenia prawdopodobnego poraże- nia,
  - b) może wprowadzić inne, niż określone w pkt 1 i 2, działania zapobiegające rozprzestrzenianiu się bakterii *Ralstonia solanacearum*.

§ 9. Jeżeli w badaniach laboratoryjnych, przepro- wadzonych z zastosowaniem metodyki określonej w załączniku do rozporządzenia, zostanie potwierdzo- na obecność bakterii *Ralstonia solanacearum* w pró- bie, wojewódzki inspektor:

- 1) w przypadku roślin ziemniaka, w tym bulw ziem- niaka, lub roślin pomidora:

- a) ustala zasięg i pierwotne źródła porażenia, zgodnie z § 10, oraz przeprowadza badania co najmniej wszystkich rozmnożeń klonalnych sadzeniaków ziemniaka,
  - b) uznaje za porażone rośliny, przesyłkę lub partię roślin ziemniaka lub pomidora, z których pobierane były próby,
  - c) uznaje za skażone maszyny, urządzenia, pojazdy, pojemniki, magazyny lub ich części, materiały używane do pakowania i inne przedmioty, które miały kontakt z porażonymi roślinami ziemniaka lub pomidora,
  - d) uznaje za porażone pola, miejsca uprawy pod osłonami i miejsca produkcji, w których rosły lub odbywały się zbiory porażonych roślin ziemniaka lub pomidora, jeżeli ma to zastosowanie,
  - e) ustala zasięg prawdopodobnego porażenia, zgodnie z § 11, biorąc pod uwagę: kontakt z porażonymi roślinami ziemniaka lub pomidora przed zbiorami lub po zbiorach, kontakt ze skażonymi maszynami, urządzeniami, pojazdami, pojemnikami, magazynami lub ich częściami, materiałami używanymi do pakowania, o których mowa w lit. c, oraz kontakt z porażonym polem, miejscem uprawy pod osłonami lub miejscem produkcji, o których mowa w lit. d, a także powiązania produkcyjne, nawadnianie lub spryskiwanie, lub pokrewieństwo klonalne,
  - f) ustala zasięg możliwego rozprzestrzeniania się bakterii *Ralstonia solanacearum*, zgodnie z § 12,
  - g) na podstawie stwierdzonego porażenia i skażenia, określonego zasięgu prawdopodobnego porażenia i możliwego rozprzestrzeniania się bakterii wyznacza strefę, w której podejmowane będą działania w celu zwalczania i zapobiegania rozprzestrzenianiu się bakterii *Ralstonia solanacearum*, zwaną dalej „strefą zagrożenia”;
- 2) w przypadku upraw innych roślin żywicielskich, jeżeli uprawa roślin ziemniaka lub pomidora została uznana za zagrożoną:
    - a) ustala zasięg i pierwotne źródła porażenia oraz przeprowadza testy na co najmniej wszystkich rozmnożeniach klonalnych sadzeniaków ziemniaka,
    - b) określa jako porażone przez bakterię *Ralstonia solanacearum* te rośliny żywicielskie, z których pobrano próby,
    - c) określa prawdopodobne porażenie i skażenie oraz wyznacza strefę zagrożenia, biorąc pod uwagę powiązania produkcyjne roślin ziemniaka lub pomidora;
  - 3) w przypadku wód powierzchniowych lub płynnych resztek powstających w czasie procesów przemysłowych lub w miejscach pakowania roślin ziemniaka lub pomidora oraz związanych z nimi dziko rosnących roślin żywicielskich z rodziny psiankowatych, jeżeli istnieje zagrożenie dla produkcji roślin ziemniaka lub pomidora w związku z nawadnianiem, opryskiwaniem lub zalewaniem wodami powierzchniowymi:
    - a) ustala zasięg porażenia po przeprowadzeniu urzędowego badania prób tych wód, resztek płynnych lub dziko rosnących roślin żywicielskich z rodziny psiankowatych, jeżeli one występują,
    - b) określa jako skażone wody powierzchniowe, z których pobrano próby, na podstawie wyników badania, o którym mowa w lit. a,
    - c) określa prawdopodobne porażenie i skażenie oraz wyznacza strefę zagrożenia.
- § 10. Badania mające na celu ustalenie zasięgu i pierwotnego źródła porażenia obejmują:
- 1) miejsca produkcji, w których:
    - a) są lub były uprawiane rośliny ziemniaka pochodzące z tego samego rozmnożenia klonalnego, co rośliny ziemniaka uznane za porażone przez bakterię *Ralstonia solanacearum*,
    - b) są lub były uprawiane rośliny pomidora pochodzące z tego samego źródła, co rośliny pomidora uznane za porażone przez bakterię *Ralstonia solanacearum*,
    - c) są lub były uprawiane rośliny ziemniaka lub pomidora, które zostały poddane urzędowemu nadzorowi, ze względu na podejrzenie wystąpienia bakterii *Ralstonia solanacearum*,
    - d) są lub były uprawiane rośliny ziemniaka pochodzące z tego samego rozmnożenia klonalnego, co rośliny ziemniaka uprawiane w miejscach produkcji uznanych za porażone przez bakterię *Ralstonia solanacearum*,
    - e) są lub były uprawiane rośliny ziemniaka lub pomidora, a miejsce ich uprawy położone jest lub było w sąsiedztwie porażonych miejsc produkcji, wraz z miejscami produkcji, w których wspólnie użytkowany jest lub był sprzęt i urządzenia używane w produkcji,
    - f) do nawadniania lub opryskiwania używa się wód powierzchniowych pochodzących:
      - z jakiegokolwiek źródła, które zostało uznane za skażone lub podejrzanе o skażenie bakterią *Ralstonia solanacearum*,
      - ze źródła użytkowanego także w miejscach produkcji uznanych za porażone lub podejrzanе o porażenie bakterią *Ralstonia solanacearum*,
    - g) pola są lub były zalewane przez wody powierzchniowe uznane za skażone lub podejrzanе o skażenie przez bakterię *Ralstonia solanacearum*;
  - 2) wody powierzchniowe używane do nawadniania lub opryskiwania lub, które zalewają pola lub miejsca produkcji, uznane za porażone albo podejrzanе o porażenie bakterią *Ralstonia solanacearum*.

§ 11. Badania mające na celu ustalenie zasięgu prawdopodobnego porażenia obejmują:

- 1) inne rośliny ziemniaka lub pomidora, uprawiane w miejscu produkcji określonym jako porażone;
- 2) miejsca produkcji, które miały jakikolwiek kontakt z roślinami ziemniaka lub pomidora określonymi jako porażone, wraz z miejscami produkcji, w których wspólnie użytkowany jest lub był sprzęt i urządzenia używane w cyklu produkcyjnym;
- 3) rośliny ziemniaka lub pomidora produkowane w miejscach produkcji, o których mowa w pkt 2;
- 4) rośliny ziemniaka lub pomidora znajdujące się w miejscach produkcji, o których mowa w pkt 1 lub 2, w okresie, w którym rośliny ziemniaka lub pomidora, uznane za porażone, znajdowały się w miejscach produkcji określonych jako porażone;
- 5) miejsca przechowywania roślin ziemniaka lub pomidora pochodzących z miejsc produkcji wymienionych w pkt 1—4;
- 6) maszyny, urządzenia, pojazdy, pojemniki, magazyny lub ich części, materiały używane do pakowania i inne przedmioty, które mogły mieć kontakt z roślinami ziemniaka lub pomidora uznanymi za porażone;
- 7) rośliny ziemniaka lub pomidora przechowywane lub mające kontakt z jakimikolwiek obiektami lub przedmiotami, o których mowa w pkt 6, przed ich wyczyszczeniem i zdezynfekowaniem;
- 8) rośliny, w tym bulwy ziemniaka, określone zgodnie § 9 pkt 1 lit. a, pochodzące z tego samego rozmnożenia klonalnego lub rośliny pomidora pochodzące z tego samego źródła, co rośliny ziemniaka lub pomidora uznane za porażone, jeżeli istnieje prawdopodobieństwo porażenia ze względu na pokrewieństwo klonalne, pomimo uzyskania negatywnych wyników badań;
- 9) miejsca produkcji roślin ziemniaka lub pomidora, o których mowa w pkt 8;
- 10) miejsca produkcji roślin ziemniaka lub pomidora, w których do nawadniania i opryskiwania używana była woda uznana za skażoną;
- 11) rośliny ziemniaka lub pomidora produkowane na polach zalewanych wodami powierzchniowymi uznanymi za skażone.

§ 12. Badania mające na celu ustalenie zasięgu możliwego rozprzestrzeniania się bakterii *Ralstonia solanacearum* obejmują:

- 1) w przypadkach gdy rośliny ziemniaka lub pomidora zostały uznane za porażone — miejsca produkcji, w których:
  - a) są lub były uprawiane rośliny ziemniaka lub pomidora, znajdujące się w sąsiedztwie miejsc produkcji uznanych za porażone,

- b) stosowana jest lub była wspólna produkcja i używany jest lub był ten sam materiał wyjściowy sadzeniaka ziemniaka,
- c) do nawadniania lub opryskiwania roślin ziemniaka lub pomidora używa się wód powierzchniowych, które pochodzą z miejsca produkcji uznanego za porażone, lub jeżeli istnieje ryzyko, że wody te spłynęły lub zalewały te miejsca;

2) w przypadkach gdy wody powierzchniowe zostały uznane za skażone:

- a) miejsca produkcji roślin ziemniaka lub pomidora, znajdujące się w sąsiedztwie zbiornika wód powierzchniowych uznanych za skażone lub zagrożone zalaniem przez takie wody,
- b) jakikolwiek odosobniony zbiornik irygacyjny połączony z wodami powierzchniowymi uznanymi za skażone.

§ 13. 1. Rośliny ziemniaka lub pomidora uznane za porażone nie mogą być sadzone.

2. Rośliny, o których mowa w ust. 1, pod nadzorem wojewódzkiego inspektora powinny być:

- 1) spalone lub
- 2) zużyte do skarmiania zwierząt, po uprzednim przeprowadzeniu zabiegu termicznego, wykluczającego ryzyko przeżycia bakterii *Ralstonia solanacearum*, lub
- 3) głęboko zakopanie w miejscu, w którym nie istnieje ryzyko ich przenikania do obszarów rolniczych lub ryzyko kontaktu ze źródłem wody, która może zostać użyta do nawadniania obszarów rolniczych, lub
- 4) przeznaczone do przerobu przemysłowego, po bezpośrednim i natychmiastowym dostarczeniu ich do zakładu przetwórczego, spełniającego warunki określone w § 15, lub
- 5) poddane innym działaniom, niż wymienione w pkt 1—4, jeżeli nie istnieje ryzyko rozprzestrzeniania się bakterii *Ralstonia solanacearum*.

§ 14. 1. Rośliny ziemniaka lub pomidora uznane za prawdopodobnie porażone lub rośliny ziemniaka oraz pomidora, dla których zostało zidentyfikowane ryzyko porażenia, oraz produkowane w miejscach produkcji uznanych za prawdopodobnie porażone nie mogą być sadzone.

2. Rośliny, o których mowa w ust. 1, pod nadzorem wojewódzkiego inspektora powinny być:

- 1) w przypadku bulw ziemniaka:
  - a) przeznaczone do konsumpcji, pakowane w miejscach, w których istnieją odpowiednie warunki usuwania resztek, gotowe i przeznaczone do bezpośredniego dostarczenia i użycia bez przepakowywania, lub

- b) przeznaczone do przerobu przemysłowego po bezpośrednim i natychmiastowym dostarczeniu ich do zakładu przetwórczego, o którym mowa w § 13 ust. 2 pkt 4, lub
  - c) zużyte lub usunięte w sposób określony przez wojewódzkiego inspektora, jeżeli nie istnieje ryzyko rozprzestrzeniania się bakterii *Ralstonia solanacearum*;
- 2) w przypadku innych części roślin ziemniaka lub pomidora, wraz z resztkami łodyg i liści:
- a) zniszczone lub
  - b) zużyte lub usunięte w sposób określony przez wojewódzkiego inspektora, jeżeli nie istnieje ryzyko rozprzestrzeniania się bakterii *Ralstonia solanacearum*.

§ 15. W zakładach przetwórczych i w miejscach pakowania roślin ziemniaka lub pomidora:

- 1) resztki roślin ziemniaka lub pomidora oraz inne stałe resztki niszczy się przez:
- a) głębokie zakopanie w miejscu, w którym nie istnieje ryzyko ich przenikania do obszarów rolniczych lub ryzyko kontaktu ze źródłem wody, która może zostać użyta do nawadniania obszarów rolniczych; resztki powinny być przewiezione bezpośrednio do tego miejsca w warunkach wykluczających ryzyko ich rozniesienia się, lub
  - b) spalenie;
- 2) resztki płynne, zawierające zawieszony cząstki stałe, poddaje się filtrowaniu lub procesowi osiadania w celu usunięcia tych cząstek, a cząstki niszczy się w sposób określony w pkt 1 lit. a; następnie resztki płynne:
- a) podgrzewa się do temperatury minimum 70 °C przez co najmniej 30 minut lub
  - b) niszczy się w sposób zatwierdzony przez wojewódzkiego inspektora, tak aby nie istniało ryzyko kontaktu tych resztek z obszarami rolniczymi lub ryzyko kontaktu ze źródłem wody, która może zostać użyta do nawadniania obszarów rolniczych.

§ 16. Środki transportu, maszyny, urządzenia, pojazdy, pojemniki, magazyny lub ich części, materiały używane do pakowania i inne przedmioty, które zostały uznane za skażone albo za prawdopodobnie skażone, pod nadzorem wojewódzkiego inspektora niszczy się albo odkaża przez oczyszczenie lub dezynfekcję w taki sposób, aby:

- 1) uniemożliwić rozprzestrzenienie się bakterii *Ralstonia solanacearum*;
- 2) po zabiegach mogły być uznane za nieskażone.

§ 17. 1. W obrębie wyznaczonej strefy zagrożenia podejmuje się następujące działania:

- 1) w miejscach produkcji określonych jako porażone, na polu lub w miejscu uprawy pod osłonami uznanym za porażone:

- a) przez okres co najmniej czterech lat uprawy następujących po stwierdzeniu porażenia:
    - niszczy się samosiewy ziemniaka lub pomidora oraz innych roślin żywicielskich bakterii *Ralstonia solanacearum*, z uwzględnieniem chwastów z rodziny psiankowatych,
    - zakazuje się sadzenia: bulw lub roślin ziemniaka, roślin i nasion pomidora, innych roślin żywicielskich, roślin rodzaju *Brassica*, dla których stwierdzono ryzyko przeżywania bakterii *Ralstonia solanacearum*, oraz innych roślin, w przypadku których stwierdzono ryzyko rozprzestrzeniania się tej bakterii,
  - b) dopuszcza się sadzenie urzędowo kwalifikowanych sadzeniaków ziemniaka, z przeznaczeniem wyłącznie na ziemniaki inne niż sadzeniaki, w pierwszym sezonie uprawy ziemniaka lub pomidora, następującym po okresie czteroletnim, o którym mowa w lit. a, jeżeli przez co najmniej dwa kolejne ostatnie lata uprawy przed posadzeniem stwierdzano, że pole jest wolne od samosiewów ziemniaka i pomidora oraz innych roślin żywicielskich, z uwzględnieniem chwastów z rodziny psiankowatych; uprawa podlega kontroli przeprowadzanej przez wojewódzkiego inspektora, który po zbiorach, w ramach przeprowadzanej kontroli, pobiera również próby bulw ziemniaka do badań laboratoryjnych,
  - c) w sezonie uprawy ziemniaka lub pomidora następującym po sezonie, o którym mowa w lit. b, i po odpowiednim cyklu zmianowania, do produkcji sadzeniaków ziemniaka i ziemniaków innych niż sadzeniaki, używa się urzędowo kwalifikowanych sadzeniaków ziemniaka; uprawa podlega kontroli przeprowadzanej przez wojewódzkiego inspektora, który po zbiorach, w ramach przeprowadzanej kontroli, pobiera również próby bulw ziemniaka do badań laboratoryjnych, albo
- 2) w miejscach produkcji uznanych za porażone, na polu lub w miejscu uprawy pod osłonami uznanym za porażone:
- a) przez okres pięciu lat uprawy następujących po stwierdzeniu porażenia niszczy się samosiewy ziemniaka lub pomidora oraz innych roślin żywicielskich bakterii *Ralstonia solanacearum*, z uwzględnieniem chwastów z rodziny psiankowatych,
  - b) przez pierwsze trzy lata uprawy pole należy:
    - pozostawić odłogiem lub obsiać zbożem albo
    - przeznaczyć na stałe pastwisko z częstym niskim koszeniem lub pod intensywny wypas, albo
    - przeznaczyć na produkcję nasienną traw,
- a przez następne dwa lata przeznaczyć na uprawę roślin niebędących żywicielami bakterii *Ralstonia solanacearum*, dla których nie stwierdzono ryzyka jej przeżywania lub rozprzestrzeniania się,

- c) w pierwszym sezonie uprawy ziemniaka lub pomidora następującym po okresie pięcioletnim, o którym mowa w lit. b, do produkcji sadze- niaków ziemniaka i ziemniaków innych niż sadze- niaki, używa się urzędowo kwalifikowanych sa- dzeniaków ziemniaka; uprawa podlega kontroli przeprowadzanej przez wojewódzkiego inspek- tora, który po zbiorach pobiera również próby bulw ziemniaka do badań laboratoryjnych;
- 3) na innych polach:
- a) w roku uprawy następującym po stwierdzeniu porażenia:
- nie sadi się bulw lub roślin ziemniaka, jak również innych roślin żywicielskich,
  - niszczy się samosiewy ziemniaka lub pomi- dora oraz innych roślin żywicielskich, z uwzględnieniem chwastów z rodziny psiankowatych, lub
  - dopuszcza się sadzenie urzędowo kwalifiko- wanych sadzeniaków ziemniaka z przezna- czeniem na ziemniaki konsumpcyjne lub przemysłowe pod warunkiem, że nie istnieje ryzyko występowania samosiewów ziemni- aka lub pomidora oraz innych roślin żywiciel- skich bakterii *Ralstonia solanacearum*, z uwzględnieniem chwastów z rodziny psiankowatych; uprawa podlega kontroli przeprowadzanej przez wojewódzkiego ins- pektora, który pobiera również próby bulw ziemniaka i próby samosiewów ziemniaka do badań laboratoryjnych,
- b) w pierwszym roku uprawy następującym po roku, o którym mowa w lit. a, do produkcji sa- dzeniaków ziemniaka i ziemniaków innych niż sadzeniaki, używa się urzędowo kwalifikowa- nych sadzeniaków ziemniaka,
- c) w co najmniej drugim roku uprawy następują- cym po roku, o którym mowa w lit. a, do pro- dukcji sadzeniaków ziemniaka i ziemniaków in- nych niż sadzeniaki, używa się urzędowo kvali- fikowanych sadzeniaków ziemniaka lub sadze- niaków ziemniaka wyprodukowanych pod nad- zorem wojewódzkiego inspektora z urzędowo kwalifikowanych sadzeniaków ziemniaka,
- d) w każdym roku uprawy, o których mowa w lit. a—c, niszczy się samosiewy ziemniaka lub pomidora oraz innych roślin żywicielskich bakterii *Ralstonia solanacearum*, z uwzględnie- niem chwastów z rodziny psiankowatych; upra- wa przeznaczona na sadzeniaki ziemniaka pod- lega kontroli przeprowadzanej przez wojewódz- kiego inspektora, który po zbiorach pobiera również próby bulw ziemniaka do badań labo- ratoryjnych;
- 4) bezpośrednio po stwierdzeniu porażenia oraz w każdym następnym roku uprawy, aż do pierw- szego sezonu włącznie, w którym na polach uzna- nych za porażone dopuszcza się uprawę ziemni- aków lub pomidorów:
- a) maszyny i miejsca przechowywania roślin, pro- duktów roślinnych lub przedmiotów w miejscu produkcji, wykorzystywane do produkcji ziem- niaka lub pomidora, czyści się i dezynfekuje w sposób uniemożliwiający rozprzestrzenianie się bakterii *Ralstonia solanacearum*,
- b) wojewódzki inspektor przeprowadza kontrolę programów nawadniania i opryskiwania, jeżeli istnieje ryzyko rozprzestrzeniania się bakterii *Ralstonia solanacearum*;
- 5) w miejscu uprawy pod osłonami uznanym za po- rażone, w którym możliwa jest całkowita wymiana gleby lub podłoża:
- a) nie uprawia się bulw i roślin ziemniaka, roślin i nasion pomidora oraz innych roślin żywiciel- skich bakterii *Ralstonia solanacearum*, do czasu stwierdzenia przez wojewódzkiego inspektora, że w wyniku przeprowadzonych zabiegów, w tym co najmniej usunięcia wszelkiego mate- riału roślin żywicielskich, całkowitej wymiany podłoża oraz oczyszczenia lub zdezynfekowania miejsca uprawy i całego wyposażenia, wyelimi- nowano tę bakterię,
- b) dopuszcza się produkcję ziemniaka z urzędowo kwalifikowanych sadzeniaków ziemniaka, mini- bulw lub mikroroślin, uzyskanych pod urzędo- wym nadzorem,
- c) wojewódzki inspektor prowadzi kontrolę pro- gramów nawadniania i opryskiwania, w celu za- pobieżenia rozprzestrzenianiu się bakterii *Ral- stonia solanacearum*.
2. W obrębie strefy zagrożenia, oprócz wymagań określonych w ust. 1:
- 1) w przypadku gdy strefa zagrożenia została wyzna- czona zgodnie z § 9 pkt 1 lit. g, bezpośrednio po stwierdzeniu porażenia i przez okres co najmniej trzech lat uprawy po stwierdzeniu porażenia:
- a) wojewódzki inspektor sprawuje nadzór nad miejscami uprawy, przechowywania i miejsca- mi mającymi kontakt z bulwami ziemniaka lub pomidorami, wraz z miejscami, w których wspólnie użytkowane są maszyny do produkcji ziemniaka lub pomidora,
- b) prowadzi się czyszczenie lub dezynfekcję ma- szyn i miejsc przechowywania w sposób unie- możliwiający rozprzestrzenianie się bakterii *Ral- stonia solanacearum*,
- c) w przypadku upraw ziemniaka, dopuszcza się sadzenie wyłącznie urzędowo kwalifikowanych sadzeniaków ziemniaka lub sadzeniaków ziem- niaka wyprodukowanych pod nadzorem woje- wódzkiego inspektora z urzędowo kwalifikowa- nych sadzeniaków ziemniaka; uprawa podlega kontroli przeprowadzanej przez wojewódzkiego inspektora, który po zbiorach pobiera do badań laboratoryjnych próby bulw ziemniaka sadze- niaka z miejsc produkcji prawdopodobnie pora- żonych,

- d) oddziela się czynności związane ze zbiorem, przechowywaniem, przemieszczaniem i pakowaniem zebranych sadzeniaków ziemniaka od takich czynności wykonywanych przy ziemniakach innych niż sadzeniaki, na terenie wszystkich miejsc w obrębie strefy zagrożenia,
- e) wojewódzki inspektor przeprowadza kontrole urzędowe;
- 2) w przypadku gdy wody powierzchniowe zostały uznane za skażone lub za drogę możliwego rozprzestrzenienia się bakterii *Ralstonia solanacearum*, wojewódzki inspektor, bezpośrednio po stwierdzeniu skażenia i przez okres co najmniej trzech lat uprawy po stwierdzeniu skażenia, przeprowadza:
- a) coroczne kontrole obejmujące pobieranie do badań laboratoryjnych prób wód powierzchniowych i roślin żywicielskich z rodziny psiankowatych, rosnących w sąsiedztwie tych wód, w terminach umożliwiającym wykrycie bakterii *Ralstonia solanacearum*,
- b) kontrolę programów nawadniania i opryskiwania, w tym w zakresie zakazu stosowania wody uznanej za skażoną do nawadniania lub opryskiwania roślin ziemniaka lub pomidora oraz innych roślin żywicielskich,
- c) kontrole usuwania resztek stałych powstających w czasie procesów przemysłowych lub w miejscach pakowania, w których wykorzystywane są rośliny ziemniaka lub pomidora — w przypadku stwierdzenia skażenia resztek płynnych;
- 3) wojewódzki inspektor podejmuje działania zmierzające do wymiany sadzeniaków ziemniaka.
- § 18. 1. W przypadku stwierdzenia obecności bakterii *Ralstonia solanacearum* w ziemniakach wyprodukowanych na terytorium Rzeczypospolitej Polskiej, wojewódzki inspektor przeprowadza badania:
- 1) dotyczące wcześniejszych rozmnożeń ziemniaka wraz z początkowym rozmnożeniem klonalnym i rozmnożeń klonalnych materiałów bazowych sadzeniaków ziemniaka lub
- 2) wszystkich rozmnożeń klonalnych materiałów bazowych lub wcześniejszych rozmnożeń wraz z początkowym rozmnożeniem klonalnym, jeżeli nie stwierdzono żadnego pokrewieństwa klonów.
2. W przypadkach innych niż określone w ust. 1, wojewódzki inspektor przeprowadza badania na każdej roślinie pochodzącej z początkowego rozmnożenia klonalnego wstępnej selekcji lub na reprezentatywnej próbie pobranej z materiałów bazowych sadzeniaków ziemniaka lub z materiałów pochodzących z wcześniejszych rozmnożeń.
- § 19. 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. 775)

## METODYKA DIAGNOZOWANIA, WYKRYWANIA I IDENTYFIKACJI BAKTERII *Ralstonia solanacearum*

### I. Zakres stosowania metodyki

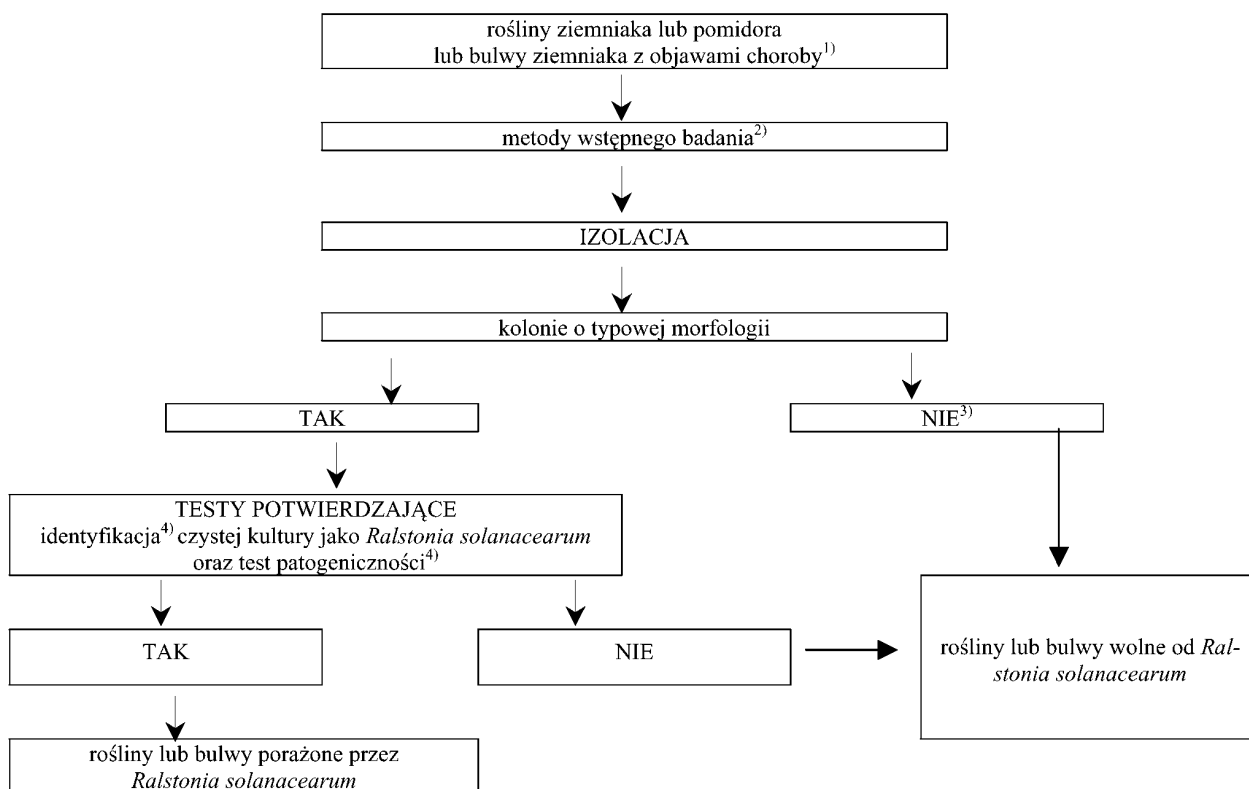
Metodyka obejmuje:

- 1) diagnozowanie śluzaka w bulwach ziemniaka oraz w roślinach ziemniaka i pomidora;
- 2) wykrywanie i identyfikację bakterii *Ralstonia solanacearum* w próbach bulw ziemniaka.

### 1. Diagnozowanie śluzaka w bulwach ziemniaka oraz w roślinach ziemniaka i pomidora

Metodyka ma zastosowanie do bulw ziemniaka oraz roślin ziemniaka i pomidora z charakterystycznymi objawami chorobowymi lub podejrzanych o porażenie przez bakterię *Ralstonia solanacearum*. Metodyka obejmuje szybkie badania umożliwiające postawienie wstępnej diagnozy, zwane dalej „metodami wstępnego badania”, izolację patogena z porażonych wiązek przewodzących na podłoża diagnostyczne, a w przypadku uzyskania wyników pozytywnych — identyfikację kultury jako bakterii *Ralstonia solanacearum*.

Diagram postępowania diagnostycznego:



Objaśnienia do diagramu:

<sup>1)</sup> opis objawów zamieszczono w części II ust. 1.

<sup>2)</sup> metodami wstępnego badania są:

- test na obecność wycieków z wiązek przewodzących łodygi (część II ust. 2),
- test na obecność granulek poly-β-hydroksymaślanu (część II ust. 2),
- test IF (część III ust. 2),
- test ELISA (część III ust. 3),
- test PCR (część III ust. 4),

<sup>3)</sup> izolacja bakterii z materiału roślinnego z typowymi objawami metodą rozcieńczeń płytkowych jest prosta, jednakże w przypadku zaawansowanych stadiów infekcji hodowla może się nie udać; bakterie saprofityczne występujące w chorej tkance mogą przerastać bakterię *Ralstonia solanacearum* lub hamować jej wzrost na podłożu hodowlanym; jeżeli wynik izolacji jest negatywny, a objawy chorobowe są typowe, izolację należy powtórzyć; zalecaną jest metoda posiewu na podłoża selektywne,

<sup>4)</sup> wiarygodną identyfikację czystej kultury bakterii *Ralstonia solanacearum* można przeprowadzić w oparciu o testy wymienione w części II ust. 4 pkt 1 w połączeniu z testem patogeniczności (części II ust. 4 pkt 3); oznaczanie szczepu nie jest obowiązkowe, lecz zalecane w każdym nowym przypadku wykrycia bakterii *Ralstonia solanacearum*.

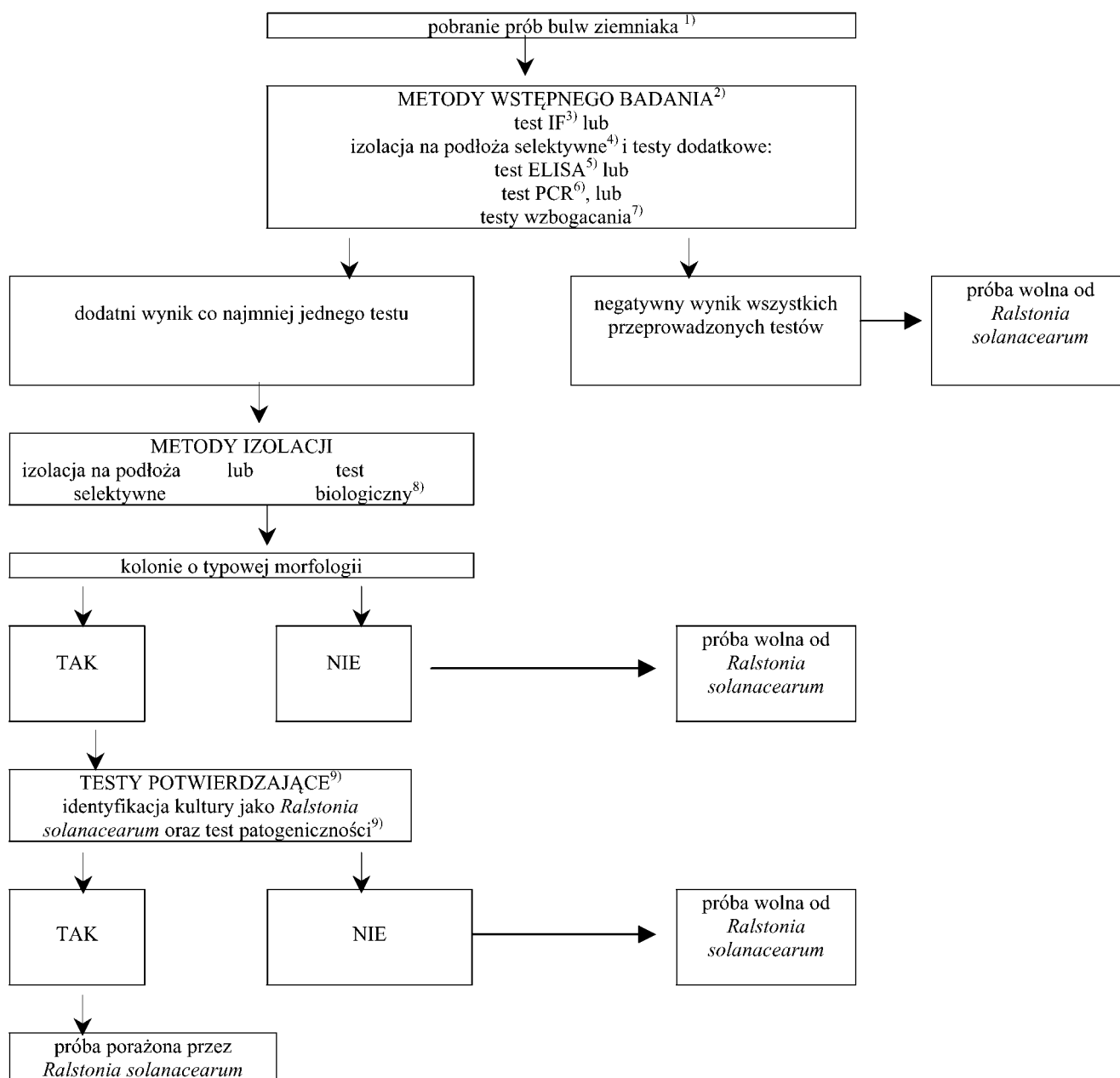


## 2. Wykrywanie i identyfikacja bakterii *Ralstonia solanacearum* w próbach bulw ziemniaka

Metodyka ma zastosowanie do wykrywania infekcji latentnej w bulwach ziemniaka za pomocą jednej lub kilku metod szybkiego badania. Pozytywne wy-

niki badań uzyskanych z zastosowaniem tych metod są potwierdzane przez izolację bakterii *Ralstonia solanacearum*, a następnie, w przypadku izolacji typowych kolonii, identyfikację czystej kultury bakterii *Ralstonia solanacearum*.

Diagram postępowania diagnostycznego:



Objaśnienia do diagramu:

- 1) 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,
- 2) jeżeli pojedynczy test jest niewystarczająco czuły lub zbyt mało wiarygodny do wykrycia bakterii *Ralstonia solanacearum* w próbce, zaleca się przeprowadzenie więcej niż jednego testu. Testy powinny opierać się na różnych zasadach biologicznych,
- 3) test immunofluorescencji (IF) jest powszechnie przyjętą metodą wstępnego badania; w odniesieniu do parametrów określonych w tej metodzie jest to test czuły (zakres czułości  $10^3$ – $10^4$  komórek/ml osadu ekstraktu ziemniaka); czynnikiem krytycznym decydującym o wiarygodności wyniku testu jest jakość przeciwciał; należy używać wyłącznie przeciwciał o wysokim mianie (minimum 2000 dla przeciwciał wyjściowych), a wszystkie testy muszą być wykonywane z przeciwciałami w zakresie miana lub z zastosowaniem pierwszego rozcieńczenia poniżej miana; zalecana jest metoda pośrednia;

metodę bezpośrednią można stosować, jeśli poziom wykrywalności i specyficzności tej metody jest równoważny z poziomem metody pośredniej; test IF umożliwia dokonanie oceny morfologii zabarwionych komórek i intensywności fluorescencji; na tej podstawie określa się specyficzność reakcji; w teście IF dość powszechne są reakcje krzyżowe z serologicznie spokrewnionymi bakteriami glebowymi lub bakteriami obecnymi w tkankach ziemniaka o morfologii komórki zbliżonej do bakterii *Ralstonia solanacearum*; w przypadkach podejrzenia o wystąpienie reakcji krzyżowych należy przeprowadzić badanie dodatkową metodą opartą na innej zasadzie biologicznej; w takich przypadkach zalecana jest izolacja na podłożu selektywne,

- 4) metoda izolacji bakterii *Ralstonia solanacearum* na podłożu selektywne SMSA jest metodą wstępnego badania o wysokiej czułości i selektywności; wyniki izolacji uzyskuje się w ciągu 3—6 dni od przygotowania próby; wyhodowane bakterie można łatwo zidentyfikować; należy ostrożnie pobierać tkankę z części przystolonowej bulwy w celu uniknięcia zanieczyszczenia próby obecnymi w bulwach ziemniaka bakteriami wtórnymi, które „rywalizują” z bakterią *Ralstonia solanacearum* na podłożu i mogą niekorzystnie wpływać na rozwój tej bakterii; ze względu na niekorzystny wpływ składników podłoża na badany organizm niektóre szczepy mogą rosnąć słabo; metoda izolacji może być stosowana jako pojedyncza metoda wstępnego badania w przypadku, gdy uzyskano negatywny wynik badania i nie ma podejrzeń o zahamowanie wzrostu bakterii *Ralstonia solanacearum* przez inne bakterie; w przypadku negatywnego wyniku badania, ale gdy występuje podejrzenie o zahamowanie wzrostu bakterii *Ralstonia solanacearum* przez inne bakterie, próbę poddaje się dalszym badaniom z zastosowaniem innej metody, w celu potwierdzenia lub odrzucenia diagnozy; w takim przypadku zalecaną metodą jest test IF,
- 5) test ELISA ma zakres czułości  $10^4$ — $10^5$  komórek/ml osadu ekstraktu ziemniaka i częściej uzyskuje się w nim wyniki fałszywie pozytywne (reakcje krzyżowe) i fałszywie negatywne (hamujący wpływ cząsteczek fenolowych pochodzących z ekstraktu ziemniaka), dlatego test ELISA nie może być stosowany jako test pojedynczy,
- 6) test PCR jest bardzo czułym testem; reakcja może być jednak zakłócana przez składniki roślinne obecne w ekstrakcie z roślin czy bulw (inhibitory), co wpływa na uzyskanie fałszywie negatywnych wyników; negatywny wpływ inhibitorów można zmniejszyć przez rozcieńczenie próbki, mając na uwadze, że jednocześnie ulega rozcieńczeniu populacja bakterii *Ralstonia solanacearum*; wszystkie etapy przygotowania próby i badania należy przeprowadzać z dużą ostrożnością w celu uniknięcia kontaminacji, która może przyczynić się do uzyskania wyników fałszywie pozytywnych; wyniki fałszywie pozytywne mogą również wynikać z homologii sekwencji innych organizmów; z tych powodów test PCR nie może być stosowany jako test pojedynczy,
- 7) test wzbogacania polega na inkubacji prób ekstraktu ziemniaka w półselektywnym bulionie odżywczym (np. zmodyfikowany bulion SMSA) i pozwala na namnożenie bakterii *Ralstonia solanacearum*; obecność bakterii *Ralstonia solanacearum* można stwierdzić za pomocą testów: IF, ELISA i PCR; nie zaleca się wykonywania bezpośredniego posiewu z bulionu odżywczego; test ten nie może być wykorzystywany jako pojedyncza metoda wstępnego badania,
- 8) test biologiczny może być stosowany do izolacji bakterii *Ralstonia solanacearum* z ekstraktu ziemniaka drogą selektywnego wzbogacania w roślinie żywicielskiej i można go wykonać na roślinach pomidora lub oierzyny; niezbędne jest zapewnienie korzystnych dla rozwoju bakterii *Ralstonia solanacearum* warunków środowiska,
- 9) identyfikacji czystej kultury bakterii *Ralstonia solanacearum* dokonuje się za pomocą co najmniej jednego z testów wskazanych w części II ust. 4 pkt 1, w połączeniu z testem patogeniczności wskazanym w części II ust. 4 pkt 3; oznaczanie szczepu nie jest obowiązkowe, lecz zalecane w każdym nowym przypadku wykrycia bakterii.

## II. Diagnostowanie śluzaka w bulwach ziemniaka oraz w roślinach ziemniaka i pomidora

### 1. Objawy śluzaka

#### 1.1. Objawy na ziemniaku

Na roślinach ziemniaka we wczesnym stadium infekcji obserwuje się więdnienie liści ku wierzchołkowi łodygi w ciągu dnia, gdy panuje wysoka temperatura. Objawy te zanikają nocą. Więdnięcie szybko staje się nieodwracalne i prowadzi do śmierci rośliny. Wiązki przewodzące więdnącej rośliny, widoczne na przekroju poprzecznym przez łodygę, mogą przebarwiać się na brązowo, a z przeciętej powierzchni wycieka samoistnie lub po ściśnięciu łodygi mleczny śluz. Po umieszczeniu przeciętej łodygi w wodzie w pozycji pionowej, z wiązek przewodzących wydostają się smużki śluzu.

W bulwach ziemniaka, po poprzecznym ich przekrojeniu w pobliżu części przystolonowej, we wczesnym stadium infekcji występują szklistożółte do jasnobrązowych przebarwienia pierścienia wiązek przewodzących, z których po kilku minutach wydostaje się, samoistnie lub po lekkim ściśnięciu palcami, jasnokremowy śluz widoczny na przeciętej powierzchni. Na-

stępnie, brązowe przebarwienia wiązek stają się wyraźniejsze, a nekroza może rozszerzać się na tkankę parenchymatyczną. W zaawansowanych stadiach infekcja rozprzestrzenia się z części przystolonowej i oczek na zewnątrz, wskutek czego na powierzchni bulwy mogą występować czerwonebrązowe, lekko zapadnięte ranki, a na nich mogą pojawiać się wycieki bakteryjne, do których przylegają grudki ziemi.

#### 1.2. Objawy na roślinach pomidora

Pierwszym widocznym objawem jest zwiotczały wygląd najmłodszych liści. W sprzyjających warunkach środowiska (temperatura gleby około 25 °C, duża wilgotność) w ciągu kilku dni dochodzi do epinastii i jednostronnego lub całkowitego więdnięcia rośliny, a następnie jej zamierania. W mniej sprzyjających warunkach (temperatura gleby poniżej 21 °C) na łodydze może rozwijać się wiele korzeni przybyszowych. Czasami widoczne są tłuste smugi przebiegające wzdłuż łodygi, które wskazują na obecność nekroz w obrębie wiązek przewodzących. Po przekrojeniu łodygi w poprzek, ze zbrązowiałych wiązek przewodzących wyciekają krople śluzu bakteryjnego barwy białej lub żółtawej.

## 2. Metody wstępnego badania

W celu postawienia wstępnej diagnozy stosuje się jeden lub kilka z niżej wymienionych testów:

- 1) test na obecność wycieków z łodygi:
  - a) wędnącą łodygę ziemniaka przecina się nieco powyżej poziomu gleby,
  - b) odcięty fragment łodygi umieszcza się przeciętą powierzchnią w zlewce z wodą,
  - c) po chwili z wiązek przewodzących samoistnie wydostają się smużki śluzu bakteryjnego;
- 2) test na wykrywanie granulek poly- $\beta$ -hydroksymaślanu (PHB):
  - a) granulki PHB w komórkach bakterii *Ralstonia solanacearum* stają się widoczne po zabarwieniu błękitem nilu A albo sudanem czarnym B,
  - b) wykonuje się rozmaz ze śluzu lub zawiesiny tkanki na szkiełku mikroskopowym albo przygotowuje się preparat z 48. godzinnej kultury bakterii *Ralstonia solanacearum* na podłożu YPGA lub SPA, o którym mowa w części IV ust. 1,
  - c) przygotowuje się kontrolę pozytywną w postaci rozmazu ze szczepu należącego do biowaru 2/rasa 3 oraz, w przypadku gdy to stosowne, kontrolę negatywną w postaci rozmazu z niespokrewnionego szczepu,
  - d) preparat suszy się, a następnie kilkakrotnie szybko przesuwając spodnią powierzchnią nad płomieniem palnika w celu utrwalenia rozmazu;
- 3) test z błękitem nilu:
  - a) utrwalony rozmaz zalewa się 1 % wodnym roztworem błękitu nilu A, a następnie inkubuje się przez 10 minut w temperaturze 55 °C,
  - b) zlewa się roztwór barwnika, przepłukuje słabym strumieniem wody bieżącej, a nadmiar wody usuwa za pomocą bibuły,
  - c) preparat zalewa się 8 % wodnym roztworem kwasu octowego i inkubuje przez minutę w temperaturze pokojowej,
  - d) preparat przepłukuje się słabym strumieniem wody bieżącej i osusza bibułą,
  - e) preparat zwilża się kroplą wody i nakłada szkiełko nakrywkowe;
  - f) zabarwiony rozmaz ogląda się w mikroskopie epifluorescencyjnym (450 nm) pod imersją, stosując powiększenie 1000x; obserwacje preparatu prowadzi się w kierunku wykrycia jasnopomarańczowych, fluoryzujących granulek PHB,
  - g) preparat ogląda się również w świetle białym, aby upewnić się, że granulki znajdują się wewnątrz komórek bakterii, a morfologia komórki jest typowa dla bakterii *Ralstonia solanacearum*;

4) test z sudanem czarnym:

- a) utrwalony rozmaz zalewa się 0,3 % roztworem sudanu czarnego B w 70 % alkoholu oraz inkubuje przez 10 minut w temperaturze pokojowej,
- b) zlewa się roztwór barwnika i przepłukuje wodą bieżącą; nadmiar wody zlewa się, a preparat osusza za pomocą bibuły,
- c) preparat zanurza się na krótko w ksylole i osusza bibułą; z uwagi na szkodliwość ksylole pracę wykonuje się pod digestorium,
- d) preparat zalewa się 0,5 % wodnym roztworem safraniny i pozostawia na 10 sekund w temperaturze pokojowej; z uwagi na szkodliwość safraniny pracę wykonuje się pod digestorium,
- e) delikatnie przepłukuje się preparat słabym strumieniem wody bieżącej, osusza bibułą i nakłada szkiełko nakrywkowe,
- f) zabarwiony preparat ogląda się w mikroskopie świetlnym, w świetle przechodzącym pod imersją, stosując powiększenie 1000x, granulki PHB w komórkach bakterii *Ralstonia solanacearum* barwią się na niebieskoczarno, a ściana komórkowa barwi się na różowo;

5) inne testy:

- a) test IF — przeprowadzany zgodnie ze sposobem określonym w części III ust. 2,
- b) test ELISA — przeprowadzany zgodnie ze sposobem określonym w części III ust. 3,
- c) test PCR — przeprowadzany zgodnie ze sposobem określonym w części III 4 ust. 4.

## 3. Metoda izolacji

- 1) pobiera się śluz lub fragmenty przebarwionej tkanki z pierścienia wiązek przewodzących bulwy ziemniaka lub z wiązek przewodzących łodygi ziemniaka lub pomidora; umieszcza się je w małej objętości sterylnej wody destylowanej lub 50 mM buforu fosforanowego i pozostawia się na 5—10 minut;
- 2) wykonuje się serie dziesięciokrotnych rozcieńczeń zawiesiny (1:10 i 1:100 lub więcej, jeśli uzna się za stosowne);
- 3) przenosi się standardową objętość zawiesiny i jej rozcieńczeń na podstawowe podłoża odżywcze NA, YPGA i SPA, o których mowa w części IV ust. 1, lub na podłoże Kelmana z chlorkiem tetrazoliowym, o którym mowa w części IV ust. 1, lub na podłoże selektywne SMSA, o którym mowa w części IV ust. 7; wykonuje się posiew za pomocą ezy lub głaszczki, stosując odpowiednią technikę rozcieńczeń płytkowych; jeżeli uzna się za stosowne, wykonuje się kontrolę pozytywną drogą posiewu rozcieńczonej zawiesiny patogenicznej kultury bakterii *Ralstonia solanacearum*, należącej do biowaru 2/rasy 3 bakterii *Ralstonia*

*solanacearum* na oddzielnych płytkach z każdym z podłoży;

- 4) płytki inkubuje się przez 3 dni w temperaturze 28 °C; jeżeli wzrost jest powolny, czas inkubacji można wydłużyć do 6 dni, mając na uwadze, że na podłożu SMSA kolonie bakterii często stają się nietypowe i zamierają:
  - a) na podstawowych podłożach odżywczych patogeniczne izolaty bakterii *Ralstonia solanacearum* tworzą perłowobiałe, płaskie, nieregularne i fluidalne kolonie, często z charakterystycznymi zagłębieniami,
  - b) na podłożu Kelmana z chlorkiem tetrazolowym typowe kolonie patogenicznych izolatów bakterii *Ralstonia solanacearum* są kremowe, płaskie, nieregularne i fluidalne z krwistoczerwonym, zagłębionym środkiem; niepatogeniczne formy tej bakterii produkują ciemnoczerwone kolonie o masłowatej konsystencji,
  - c) na podłożu SMSA typowe kolonie patogenicznych izolatów bakterii *Ralstonia solanace-*

*arum* są mlecznobiałe, płaskie, nieregularne i fluidalne, z krwistoczerwonym środkiem; niepatogeniczne formy tej bakterii produkują mniej fluidalne kolonie, całkowicie różowe do czerwonych;

- 5) kolonie o charakterystycznej morfologii przeszczepia się na podstawowe podłoże odżywcze w celu uzyskania czystej kultury; należy unikać regularnego przeszczepiania, które może prowadzić do utraty patogeniczności.

#### 4. Testy potwierdzające

- 1) Czystą kulturę bakterii *Ralstonia solanacearum* identyfikuje się, stosując co najmniej jeden z następujących testów:
  - a) testy biochemiczne i fizjologiczne przeprowadzane w celu określenia, czy wyizolowane bakterie posiadają właściwości biochemiczne i fizjologiczne, typowe dla bakterii *Ralstonia solanacearum*; do każdego testu dołącza się odpowiedni szczep kontrolny

barwnik fluoryzujący	–
inkluzyje PHB	+
test oksydacyjno-fermentacyjny (O/F)	O+/F–
katalaza	+
test Kovacsa	+
redukcja azotanów	+
wykorzystanie cytrynianu	+
wzrost w temperaturze 40 °C	–
wzrost w 1 % NaCl	+
wzrost w 2 % NaCl	–
dihydrolaza argininy	–
hydroliza żelatyny	–
hydroliza skrobi	–
hydroliza eskuliny	–
produkcja lewanu	–

- b) test IF — przygotowuje się zawiesinę  $10^6$  komórek/ml badanej kultury i szczepu kontrolnego oraz wykonuje się serię dwukrotnych rozcieńczeń przeciwciał; test IF przeprowadza się zgodnie ze sposobem, o którym mowa w części III ust. 2; miano dla badanej kultury musi być równoważne mianu dla kontroli pozytywnej,
- c) test ELISA — przygotowuje się zawiesinę  $>10^6$  komórek/ml badanej kultury i szczepu kontrolnego; test ELISA przeprowadza się zgodnie ze sposobem, o którym mowa w części III ust. 3;

odczyty w teście ELISA dla badanej kultury muszą być równoważne wartościom uzyskanym dla kontroli pozytywnej,

- d) test PCR — przygotowuje się zawiesinę  $10^6$  komórek/ml badanej kultury i szczepu kontrolnego; test PCR przeprowadza się zgodnie ze sposobem, o którym mowa w części III ust. 4; uzyskany produkt PCR dla badanej kultury musi mieć taką samą wielkość i wzór uzyskany w analizie z użyciem enzymów restrykcyjnych (REA) jak kontrola pozytywna,

- e) fluorescencyjna hybrydyzacja in-situ (FISH) — przygotowuje się zawiesinę  $10^6$  komórek/ml badanej kultury i szczepu kontrolnego; stosuje się metodę FISH z primerem PCR OLI-1; badana kultura musi wykazywać taką samą reakcję jak kontrola pozytywna,
- f) profil białkowy — zdenaturowane białka komórkowe są rozdzielane drogą elektroforezy na żelu poliakrylamidowym — PAGE,
- g) analiza kwasów tłuszczowych (FAP) — hoduje się badaną kulturę i szczep bakterii kontroli pozytywnej przez 48 godzin, w temperaturze 28 °C, na agarze sojowo-tryptonowym oraz stosuje metodę FAP; profil badanej kultury musi być identyczny z profilem kontroli pozytywnej; charakterystyka kwasów tłuszczowych jest następująca: 14:0 3OH, 16:0 2OH, 16:1 2OH i 18:1 2OH;
- 2) oznaczanie szczepu jest zalecane w każdym nowym przypadku wykrycia bakterii *Ralstonia solanacearum*; stosuje się co najmniej jedną z następujących metod:
- a) określanie biowaru na podstawie zdolności do produkcji kwasu z trzech alkoholi sześciowęglowych i trzech cukrów

wykorzystywanie	Biowar				
	1	2	3	4	5
— maltozy	–	+	+	–	+
— laktozy	–	+	+	–	+
— celobiozy	–	+	+	–	+
— mannitolu	–	–	+	+	+
— sorbitolu	–	–	+	+	–
— dulcitolu	–	–	+	+	–

dotatkowe testy na rozróżnienie w obrębie biowaru 2 podfenotypów

	biowar 2	biowar 2-A	biowar 2-T
wykorzystywanie trehalozy	–	+	+
wykorzystywanie inozytolu	+	–	+
wykorzystywanie D-rybozy	–	–	+
aktywność pektolityczna	niska	niska	wysoka

- b) określanie rasy na podstawie testu patogeniczności na roślinach pomidora lub oberżyny i roślinach tytoniu oraz na podstawie reakcji nadwrażliwości (HR) na liściach tytoniu

Reakcja	Rasa <sup>*)</sup>		
	1	2	3
na roślinach pomidora/oberżyny	więdnienie	brak reakcji	więdnienie
na roślinach tytoniu	więdnienie	brak reakcji	brak reakcji
na liściach tytoniu	nekroza (48 h) i więdnienie (7–8 dni)	HR (12–24 h)	chloroza (2–8 dni)

\*) Nie uwzględniono rasy 4 (patogeniczna dla imbiru i niektórych innych roślin żywicielskich) i rasy 5 (patogeniczna wyłącznie dla morwy).

Określenie rasy na podstawie testu patogeniczności lub testu nadwrażliwości na roślinach tytoniu może być niewystarczająco wiarygodne; o rasie można wnioskować na podstawie biowaru i naturalnej rośliny żywicielskiej.

Szczepy bakterii *Ralstonia solanacearum* można rozróżnić na poziomie molekularnym za pomocą:

- analizy RFLP,
- powtarzalnej sekwencji PCR (REP-, ERIC- i BOX-PCR);

3) test patogeniczności stosuje się w celu potwierdzenia diagnozy oraz w celu określania patogeniczności kultur zidentyfikowanych jako bakteria *Ralstonia solanacearum*, wykonując następujące czynności:

- a) przygotowuje się inokulum  $10^6$  komórek/ml badanej kultury i szczepu kontroli pozytywnej,
- b) inokuluje się 5—10 roślin pomidora lub obrzyny, najlepiej w stadium trzeciego liścia właściwego lub starszych, zgodnie z metodą określoną w części III ust. 6,
- c) rośliny inkubuje się do dwóch tygodni w temperaturze 22—28 °C i względnie wysokiej wilgotności, codziennie podlewając,
- d) prowadzi się obserwacje w celu stwierdzenia, czy na roślinach występują objawy wędnięcia, epinastii, chlorozy i karłowatości,
- e) bakterie izoluje się z roślin z objawami choroby w następujący sposób:
  - wycina się fragment tkanki łodygi dwa centymetry powyżej miejsca inokulacji,
  - tkankę łodygi rozdrabnia się i zawiesza w niewielkiej objętości sterylnej wody destylowanej lub w 50 mM buforu fosforanowego, a następnie posiewa się na podłoże, inkubuje i sprawdza występowanie typowych kolonii bakterii *Ralstonia solanacearum*.

### III. Wykrywanie i identyfikacja bakterii *Ralstonia solanacearum* w próbach bulw ziemniaka

#### 1. Przygotowanie próby do badania

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.

W celu stymulacji namnażania małych populacji bakterii *Ralstonia solanacearum* można, jeżeli uzna się to za stosowane, inkubować próbę w temperaturze 25—30 °C do dwóch tygodni.

Przed przystąpieniem do właściwego badania, bulwy można umyć pod bieżącą wodą z użyciem odpowiednich dezynfektantów i detergentów, a następnie osuszyć na powietrzu.

#### Sposób postępowania przy przygotowaniu ekstraktu:

- 1) za pomocą czystego i zdezynfekowanego skalpela lub noża do obierania warzyw usuwa się skórkę z części przystolonowej bulwy w taki sposób, aby uwidocznic wiązki przewodzące; ostrożnie wycina się z części przystolonowej tkankę przewodzącą w postaci małego stożka o średnicy 3—5 mm; ilość tkanki innej niż przewodząca należy ograniczyć do minimum; w ten sam sposób postępuje się z każdą bulwą wchodzącą w skład próby; na tym etapie można dokonać wizualnej oceny bulw; bulwy z objawami choroby lub gnijące poddaje się odrębnym badaniom określonym w części II;
- 2) tkankę pobraną z części przystolonowej bulw umieszcza się w zamkniętym pojemniku; jeżeli nie jest możliwe bezpośrednie przeprowadzenie badania, materiał można przechować do 24 godzin, a w temperaturze 4 °C — nie dłużej niż 72 godziny;
- 3) tkankę pobraną z części przystolonowej:
  - a) przenosi się do odpowiedniego pojemnika, a następnie dodaje się odpowiednią objętość buforu do maceracji, o którym mowa w części IV ust. 2, w taki sposób, aby pokryć tkankę; rozdrabnia się w homogenizatorze, nie dopuszczając do nadmiernej homogenizacji; macerat pozostawia się na 15—30 minut lub
  - b) przenosi się do odpowiedniego pojemnika, a następnie dodaje się odpowiednią objętość buforu do maceracji w taki sposób, aby pokryć tkankę; pojemnik z tkanką wytrząsa się na wstrząsarce obrotowej przy 50—100 obrotów/min przez 4 godziny w temperaturze 20—22 °C lub przez 16—24 godzin w temperaturze 4 °C, lub
  - c) przenosi się do mocnej jednorazowej torebki do maceracji, a następnie miadży się aż do uzyskania homogenatu; dodaje się odpowiednią objętość buforu do maceracji w taki sposób, aby pokryć tkankę; macerat pozostawia się na 15—30 minut;
- 4) bakterie ekstrahuje się ze zmacerowanej tkanki pobranej z części przystolonowej w następujący sposób:
  - a) macerat delikatnie dekantuje się do probówki wirówkowej, pozostawiając jego resztki w pojemniku lub torebce; jeżeli zdekantowany macerat jest mętny, odwirowuje się go z zastosowaniem następujących parametrów: 180 g/10 minut/<10 °C; zdekantowany macerat lub supernatant uzyskany podczas wirowania wstępnego odwirowuje się z zastosowaniem następujących parametrów: 7000 g/15 minut/<10 °C lub 10000 g/10 minut/<10 °C; supernatant zlewa się bez naruszania osadu lub
  - b) macerat przefiltrowuje się z użyciem filtra o wielkości oczek 40—100 µm; filtrowanie można ufatwić, stosując pompę próżniową;

filtrat zbiera się do probówki wirówkowej, a filtr przepłukuje się buforem do maceracji; filtrat odwirowuje się z zastosowaniem następujących parametrów: 7000 g/15 minut/ $<10\text{ }^{\circ}\text{C}$  lub 10000 g/10 minut/ $<10\text{ }^{\circ}\text{C}$ ; supernatant zlewa się bez naruszania osadu;

- 5) osad zawiesza się w 1 ml buforu do zawieszania osadu, o którym mowa w części IV ust. 2, a następnie dzieli na dwie równe porcje i przenosi do mikroprobówek; ekstrakt z jednej mikroprobówki wykorzystuje się do badań, a jego pozostałość przechowuje się na czas badania w temperaturze  $4\text{ }^{\circ}\text{C}$ ; do drugiej probówki dodaje się kroplę sterylnego glicerolu i miesza się na wstrząsarce typu wortex, a następnie przechowuje się w temperaturze  $-18\text{ }^{\circ}\text{C}$  przez kilka tygodni lub w temperaturze  $-70\text{ }^{\circ}\text{C}$  przez kilka miesięcy.

## 2. Test IF

W teście IF używa się przeciwciał na bakterię *Ralstonia solanacearum* (najlepiej rasa 3/biowar 2). Miano przeciwciał określa się z użyciem zawiesiny  $10^6$  komórek/ml homologicznego szczepu bakterii *Ralstonia solanacearum* i koniugatu izotiocyjanianu fluoresceiny (FITC) w odpowiednim rozcieńczeniu, zgodnie z instrukcją stosowania. Przeciwciała wyjściowe powinny posiadać miano co najmniej 1:2000.

W teście używa się szkiełek mikroskopowych wielopunktowych; zalecane są szkiełka 10. punktowe o średnicy 6 mm. Na każdym szkiełku mikroskopowym umieszcza się kontrolę negatywną, w celu sprawdzenia, czy koniugat (FITC) nie wiąże się niespecyficznie z antygenem bakteryjnym. Badanie powtarza się, jeśli w okienku z kontrolą negatywną obecne są fluoryzujące komórki bakterii.

Preparaty z kontrolą pozytywną wykonuje się oddzielnie, z użyciem zawiesiny  $10^6$  komórek/ml szczepu należącego do odpowiedniej rasy/biowaru bakterii *Ralstonia solanacearum*. Dla każdego zestawu testów wykonuje się jeden preparat kontrolny.











### Sposób wykonania badania:

- 1) preparaty z badanych prób wykonuje się w następujący sposób:
- w przypadku osadu z niewielką zawartością skrobi — za pomocą pipety nanosi się na okienka, w jednym rzędzie, standardową objętość zawieszonoego w buforze osadu; standardową objętością dla okienek o średnicy 6 mm jest  $15\text{ }\mu\text{l}$ ; dla okienek o większej średnicy należy dokonać proporcjonalnych przeliczeń; drugi rząd okienek może być użyty jako powtórzenie próby lub dla kolejnej próby, zgodnie ze schematem 1,
  - w przypadku pozostałych ekstraktów — wykonuje się dziesięciokrotne rozcieńczenia ekstraktu (1:10, 1:100 i 1:1000) w buforze do zawieszania osadu; za pomocą pipety nanosi się na okienka, w jednym rzędzie, standardową objętość zawieszonoego w buforze osadu i jego rozcieńczenia; standardową objętością dla okienek o średnicy 6 mm jest  $15\text{ }\mu\text{l}$ ; dla okienek o większej średnicy należy dokonać proporcjonalnych przeliczeń; drugi rząd okienek może być użyty jako powtórzenie próby lub dla kolejnej próby, zgodnie ze schematem 2;

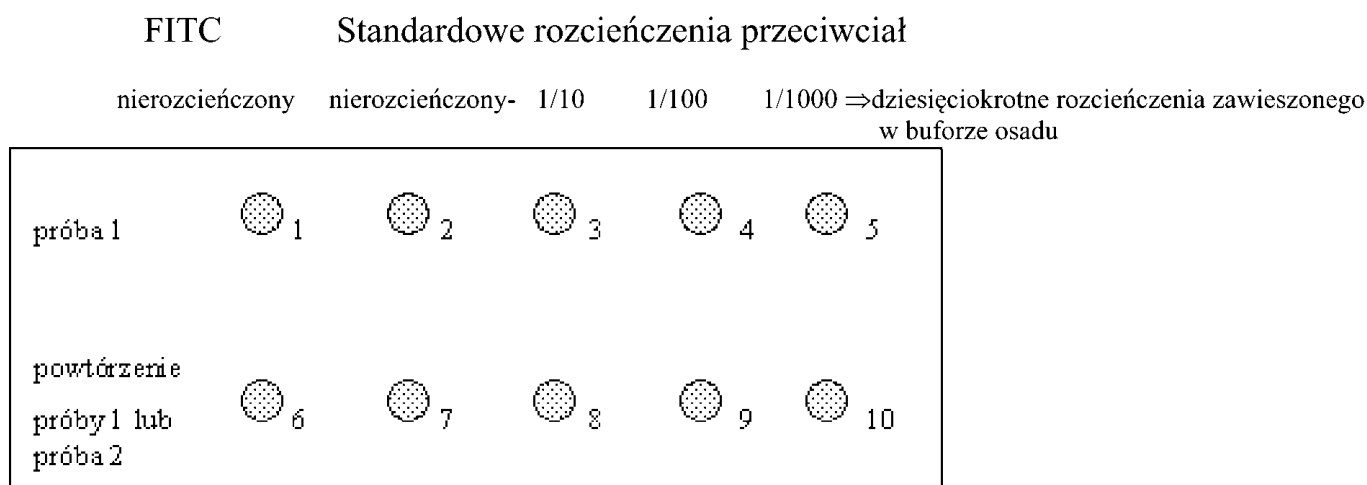
### Schemat 1

#### Standardowe rozcieńczenie zawieszonoego w buforze osadu

$M = \text{miano}$

	FITC	M/4	M/2	M	2 M $\Rightarrow$ dwukrotne rozcieńczenia przeciwciał
próba 1	 1	 2	 3	 4	 5
powtórzenie próby 1 lub próba 2	 6	 7	 8	 9	 10

## Schemat 2



- 2) krople pozostawia się do wyschnięcia, a następnie preparat utrwala się przez ogrzanie, opalenie lub z użyciem 95 % etanolu;
  - 3) w przypadku gdy preparaty wykonuje się zgodnie ze sposobem określonym w pkt 1 lit. a, sporządza się zestaw dwukrotnych rozcieńczeń [ $\frac{1}{4}$  miana (M/4),  $\frac{1}{2}$  miana (M/2), miano (M) i podwojone miano (2M)] przeciwciał w buforze IF, o którym mowa w części IV ust. 3; w przypadku sposobu określonego w pkt 1 lit. b — sporządza się rozcieńczenie robocze (RR) przeciwciał w buforze IF; rozcieńczenie robocze jest rozcieńczeniem przeciwciał o optymalnej specyficzności i stanowi ono zwykle połowę miana:
    - a) preparaty umieszcza się na wilgotnej bibule; okienka z badanymi próbami pokrywa się przeciwciałami, a w okienku z kontrolą negatywną FITC umieszcza się bufor PBS; naniesiona na okienka objętość przeciwciał musi być równoważna objętości naniesionego ekstraktu,
    - b) preparaty inkubuje się pod przykryciem przez 30 minut w temperaturze otoczenia,
    - c) krople przeciwciał usuwa się z preparatów, a następnie preparaty ostrożnie spłukuje się buforem IF; moczy się przez pięć minut w buforze IF-Tween, a następnie pięć minut w buforze IF i ostrożnie usuwa się nadmiar wilgoci,
    - d) preparaty umieszcza się na wilgotnej bibule; okienka z badanymi próbami oraz okienko z kontrolą negatywną FITC pokrywa się koniugatem FITC w rozcieńczeniu użytym przy określaniu miana; naniesiona na okienka objętość koniugatu (FITC) musi być identyczna jak objętość naniesionych przeciwciał,
    - e) preparaty inkubuje się pod przykryciem przez 30 minut w temperaturze otoczenia,
    - f) krople koniugatu usuwa się z preparatu, preparat płucze się, a następnie moczy w sposób określony w lit. c i ostrożnie usuwa się nadmiar wilgoci,
    - g) na każde okienko nanosi się za pomocą pipety 5—10  $\mu$ l 0,1 M buforu fosforanowego z glicerolem, o którym mowa w części IV ust. 3, lub podobnego utrwalacza i nakłada się szkiełko nakrywkowe;
  - 4) odczyt testu IF — preparaty ogląda się w mikroskopie epifluorescencyjnym z filtrami odpowiednimi dla wzbudzenia FITC pod imersją, stosując powiększenie 500—1000x; okienka przegląda się w poprzek dwóch średnic przeciętych pod kątem prostym oraz wokół obwodu okienka; najpierw sprawdza się preparat z kontrolą pozytywną; komórki muszą być wyraźnie zabarwione i wykazywać jasną fluorescencję; test należy powtórzyć, jeśli zabarwienie jest niewłaściwe; przeglądając preparaty z badaną próbą, najpierw sprawdza się, czy w kontroli FITC nie występują fluoryzujące komórki; obecność fluoryzujących komórek w kontroli FITC wskazuje na niespecyficzne wiązanie koniugatu FITC, autofluorescencję lub kontaminację; test należy powtórzyć, jeżeli takie zjawisko występuje; okienka z badanymi próbami przegląda się, poszukując jasno fluoryzujących komórek o charakterystycznej dla bakterii *Ralstonia solanacearum* morfologii; intensywność fluorescencji musi być równoważna z intensywnością fluorescencji w preparacie z kontrolą pozytywną z użyciem tego samego rozcieńczenia przeciwciał; komórki niecałkowicie zabarwione lub słabo fluoryzujące muszą być pominięte, chyba że występuje wiele takich komórek.
- Interpretacja wyników testu IF:**
- 1) jeżeli nie stwierdzono obecności jasno fluoryzujących komórek o charakterystycznej morfologii, wynik testu jest negatywny;



- 2) jeżeli stwierdzono obecność jasno fluoryzujących komórek o charakterystycznej morfologii, określa się średnią ilość komórek w polu widzenia i oblicza się ilość komórek (N) w ml zawieszonego osadu według wzoru określonego w części IV ust. 4; populacja stanowiąca około  $10^3$  komórek/ml zawieszonego osadu jest uznawana za granicę wykrywalności w teście IF, a więc w przypadku prób o:
  - a)  $N > 10^3$  komórek/ml zawieszonego osadu — wynik testu jest uznawany za pozytywny,
  - b)  $N < 10^3$  komórek/ml zawieszonego osadu — wynik testu może być uznawany za pozytywny;
- 3) jeżeli w zakresie miana przeciwciał widoczna jest duża ilość ( $>10^5$  komórek/ml) częściowo lub słabo fluoryzujących komórek, wykonuje się drugi test:
  - a) oparty na innej zasadzie biologicznej lub
  - b) powtórny test IF z użyciem innych przeciwciał albo z użyciem dziesięciokrotnie rozcieńzonego osadu.
- 5) sporządza się odpowiednie rozcieńczenie przeciwciał na bakterię *Ralstonia solanacearum* w buforze blokującym, o którym mowa w części IV ust. 5; do studzienek nanosi się po 100 µl rozcieńczonych przeciwciał oraz inkubuje przez godzinę w temperaturze 37 °C;
- 6) przeciwciała usuwa się ze studzienek, a studzienki wypłukuje się w sposób określony w pkt 4;
- 7) sporządza się odpowiednie rozcieńczenie koniugatu z alkaliczną fosfatazą w buforze blokującym i nanosi się po 100 µl rozcieńzonego koniugatu do studzienek; płytki inkubuje się przez 1 godzinę w temperaturze 37 °C;
- 8) koniugat, o którym mowa w pkt 7, usuwa się ze studzienek, a studzienki wypłukuje się w sposób określony w pkt 4;
- 9) sporządza się roztwór substratu alkalicznej fosfatazy, o którym mowa w części IV ust. 5, nanosi się po 100 µl do studzienek oraz inkubuje przez 30 minut do jednej godziny w ciemności, w temperaturze otoczenia;
- 10) absorbancję odczytuje się przy długości fali 409 nm.

### 3. Test ELISA

W teście ELISA używa się przeciwciał na bakterię *Ralstonia solanacearum* (najlepiej rasę 3/biowar 2). Miano określa się z użyciem zawiesiny  $10^6$  komórek/ml homologicznego szczepu bakterii *Ralstonia solanacearum*. Używa się płytek titracyjnych. Sporządza się kontrolę negatywną z użyciem ekstraktu ze zdrowych ziemniaków i kontrolę buforu fosforanowego (PBS); jako kontroli pozytywnej używa się zawiesiny o stężeniu  $>10^6$  komórek/ml szczepu należącego do odpowiedniej rasy/biowaru bakterii *Ralstonia solanacearum*. Z kontrolą pozytywną postępuje się w taki sam sposób jak z badanymi próbkami, przy czym kontrolę pozytywną wyraźnie odziera się od badanej próby na płytce titracyjnej.

#### Sposób wykonania badania:

- 1) wprowadza się 100—200 µl zawieszonego osadu za pomocą pipety do mikroprobówki, którą podgrzewa się przez 4 minuty w temperaturze 100 °C, a następnie pozostawia w lodzie;
- 2) dodaje się równoważną objętość podwójnie stężonego buforu opłaszczającego, o którym mowa w części IV ust. 5, oraz miesza się na wstrząsarce typu worteks;
- 3) nanosi się po 100 µl ekstraktu do co najmniej dwóch studzienek w płytce titracyjnej, a następnie inkubuje się przez jedną godzinę w temperaturze 37 °C lub pozostawia do następnego dnia w temperaturze 4 °C;
- 4) ekstrakt usuwa się ze studzienek, a studzienki wypłukuje się trzykrotnie buforem PBS-Tween, o którym mowa w części IV ust. 5, pozostawiając bufor w studzienkach przy ostatnim płukaniu na co najmniej 5 minut;

#### Interpretacja wyników testu ELISA:

- 1) jeżeli gęstość optyczna (GO) próby jest  $<2 \times GO$  kontroli negatywnej — wynik testu ELISA jest negatywny;
- 2) jeżeli gęstość optyczna (GO) próby jest  $>2 \times GO$  kontroli negatywnej — wynik testu ELISA jest pozytywny.

### 4. Test PCR

Na wszystkich etapach przygotowania próby i podczas innych czynności związanych z przeprowadzeniem testu PCR używa się końcówek do pipet z filtrem. Sporządza się zawiesinę  $10^6$  komórek/ml szczepu należącego do rasy 3/biowaru bakterii *Ralstonia solanacearum* jako kontrolę pozytywną. Z kontrolą pozytywną postępuje się w taki sam sposób jak z badanymi próbkami.

#### Sposób wykonania badania:

- 1) wprowadza się 100 µl zawieszonego osadu za pomocą pipety do mikroprobówki albo przenosi się 90 µl zawieszonego osadu do mikroprobówki zawierającej 10 µl 0,5M NaOH; miesza się przez kilkakrotne odwrócenie probówki;
- 2) probówkę ogrzewa się przez 4 minuty w temperaturze 100 °C, a następnie pozostawia w lodzie;
- 3) sporządza się co najmniej dwa dziesięciokrotne rozcieńczenia (1:10 i 1:100) lub więcej, jeżeli uzna się za stosowne, w sterylnej wodzie destylowanej lub w wodzie ultraczystej (UPW);
- 4) przygotowuje się mieszaninę reakcyjną do testu PCR, o której mowa w części IV ust. 6, w sterylnej mikroprobówce i dodaje się składniki w następującej kolejności:

a) dla objętości 50  $\mu$ l:

składnik	ilość	stężenie końcowe
woda sterylna destylowana lub UPW	30,8 $\mu$ l—33,8 $\mu$ l	
10 x bufor PCR	5,0 $\mu$ l	1 x
d-ATP	1,0 $\mu$ l	0,2 mM
d-CTP	1,0 $\mu$ l	0,2 mM
d-GTP	1,0 $\mu$ l	0,2 mM
d-TTP	1,0 $\mu$ l	0,2 mM
primer OLI-1 (20 $\mu$ M)	2,5 $\mu$ l	1 mM
primer Y-2 (20 $\mu$ M)	2,5 $\mu$ l	1 mM
Tag polimeraza (5 U/ $\mu$ l)	0,2 $\mu$ l	1,0 U
objętość całkowita 45 $\mu$ l—48 $\mu$ l		

b) dla większej liczby reakcji — przelicza się ilość każdego składnika na wymaganą liczbę reakcji, a następnie miesza się składniki i przenosi 45  $\mu$ l—48  $\mu$ l mieszaniny do sterylnych probówek PCR; probówki z mieszaniną reakcyjną do PCR przetrzymuje się w lodzie,

c) dla objętości 25  $\mu$ l — składniki przelicza się proporcjonalnie;

#### 5) amplifikacja PCR:

a) probówki z zagotowaną próbą i kontrolą pozytywną można odwirować; do poszczególnych probówek z mieszaniną reakcyjną PCR dodaje się w następującej kolejności: 2—5  $\mu$ l próby albo kontrolę negatywną (woda), albo kontrolę pozytywną; probówki umieszcza się w bloku grzejnym amplifikatora DNA,

b) przeprowadza się program, obejmujący następujące etapy:<sup>1)</sup>

— jeden cykl: 2 minuty w temperaturze 96 °C (denaturacja),

— 50 cykli: 20 sekund w temperaturze 94 °C (denaturacja), 20 sekund w temperaturze 68 °C (przyłączanie primerów), 30 sekund w temperaturze 72 °C (wydłużanie kopii),

— jeden cykl: 10 minut w temperaturze 72 °C (dalsze wydłużanie),

— jeden cykl: utrzymywanie w temperaturze 4 °C,

c) probówki wyjmują się z amplifikatora i analizuje produkt PCR; jeżeli analiza nie będzie wykonywana bezpośrednio, probówki przechowywane są w temperaturze 4 °C w celu użycia jeszcze tego samego dnia, lub w temperaturze -18 °C, jeżeli analiza będzie przeprowadzana w późniejszym terminie;

6) analiza produktu PCR drogą elektroforezy agarozowej i barwienia bromkiem etydyny:

a) sporządza się odpowiedni żel agarozowy, doprowadzając stopniowo do wrzenia agarozę w buforze do elektroforezy (TAE),

b) płynną agarozę schładza się do temperatury 50—60 °C, a następnie wlewa pomiędzy dwie płyty w celu uformowania żelu i montuje grzebień; pozostawia się do zestalenia,

c) usuwa się grzebień; żel zanurza się w buforze TAE w taki sposób, aby był pokryty 2—3 mm warstwą buforu,

d) na parafilmie umieszcza się 3  $\mu$ l kroplę buforu obciążającego; dodaje się 12  $\mu$ l produktu PCR z próby, z kontroli pozytywnej lub z kontroli negatywnej (woda), po czym miesza się kilkakrotnie nabierając i wypuszczając mieszaninę z końcówki pipety; podane objętości mogą być modyfikowane w taki sposób, aby odpowiadały rozmiarowi kieszonki w żelu agarozowym,

e) ostrożnie napełnia się kieszonki w żelu; w co najmniej jednej kieszonce umieszcza się odpowiedni wzorec DNA jako odniesienie,

f) prowadzi się elektroforezę przy parametrach 5—8 V/cm do chwili, aż wskaźnik osiągnie poziom 1 cm od końcowego brzegu żelu,

g) po wyłączeniu aparatu do elektroforezy, ostrożnie wyjmuje się żel i zanurza się w roztworze bromku etydyny na 30—45 minut, używając rękawic jednorazowych,

h) żel odbarwia się w wodzie destylowanej przez 10—15 minut,

i) zamplifikowany fragment ogląda się w transiluminatorze UV; produkt PCR dla bakterii *Ralstonia solanacearum* z zestawem primerów OLI-1 i Y-2 ma wielkość 288 bp; porównuje się go z markerem DNA i kontrolą pozytywną; kontrola negatywna (woda) w każdym przypadku musi być negatywna, w przeciwnym przypadku test należy powtórzyć,

j) wykonuje się fotografię żelu w celu udokumentowania wyników, jeżeli jest to wymagane,

k) potwierdza się autentyczność zamplifikowanego fragmentu drogą analizy z użyciem enzymów restrykcyjnych (REA);

<sup>1)</sup> Podane parametry przewidziane są dla amplifikatora Perkin Elmer 9600; w przypadku innych amplifikatorów konieczne może być dodanie do probówki reakcyjnej PCR oleju mineralnego lub modyfikacja czasu w etapie obejmującym 50 cykli.

- 7) analiza z użyciem enzymów restrykcyjnych (REA):
  - a) przenosi się 8,5 µl produktu PCR do nowej mikroprobówki i dodaje się 1 µl stężonego 10 x buforu do enzymu i 0,5 µl enzymu restrykcyjnego Ava II,
  - b) zawartość probówki miesza się kilkakrotnie nabierając i wypuszczając mieszaninę z końcówki pipety; jeżeli na ściankach mikroprobówki pozostaną krople, krótko wiruje się w mikrowirówce oraz inkubuje się przez godzinę w temperaturze 37 °C,
  - c) analizuje się strawiony przez enzymy restrykcyjne fragment PCR drogą elektroforezy agarozowej w sposób określony ust. 4 pkt 6.

#### Interpretacja wyników testu PCR:

- 1) jeżeli nie wykryto charakterystycznego fragmentu 288 bp, a fragment ten został wykryty w kontroli pozytywnej *Ralstonia solanacearum* — wynik testu PCR jest negatywny;
- 2) jeżeli wykryto charakterystyczny fragment 288 bp, a analiza REA zamplifikowanego fragmentu jest identyczna jak w przypadku kontroli pozytywnej bakterii *Ralstonia solanacearum* — wynik testu PCR jest pozytywny.

#### 5. Izolacja na podłoża selektywne

- 1) izolację przeprowadza się z zastosowaniem techniki rozcieńczeń płytkowych, np.:
  - a) sporządza się co najmniej dwa 10. rozcieńczenia osadu zawieszonego w buforze do osadu (1:10 i 1:100) lub więcej, jeśli uzna się za stosowne; nanosi się za pomocą pipety odmierzoną standardową objętość (50—100 µl) zawieszonego w buforze osadu i każde jego rozcieńczenie na zmodyfikowane podłoże selektywne SMSA, o którym mowa w części IV ust. 7, po czym rozprowadza się na powierzchni podłoża za pomocą szklanej głaszczki; jeżeli uzna się za stosowne, wykonuje się posiew zawieszonego osadu za pomocą ezy z oczkiem o objętości 10 µl; po każdym etapie eżę opala się lub
  - b) przenosi się odmierzoną standardową objętość (50—100 µl) zawieszonego w buforze osadu na zmodyfikowane podłoże selektywne SMSA i rozprowadza na całej powierzchni podłoża za pomocą szklanej głaszczki; wykonuje się posiew bez opalania głaszczki, na co najmniej dwóch innych szalkach ze zmodyfikowanym podłożem SMSA;
- 2) przygotowuje się kontrolę pozytywną, stosując tę samą metodę rozcieńczeń płytkowych w odniesieniu do zawiesiny 10<sup>6</sup> komórek/ml patogenicznej rasy 3/biowaru 2 bakterii *Ralstonia solanacearum* na oddzielnym zestawie płytek ze zmodyfikowanym podłożem SMSA;

- 3) płytki inkubuje się w temperaturze 28 °C, a odczyt wyniku rozpoczyna się po trzech dniach; w przypadku wyniku negatywnego płytkę inkubuje się dalej, do sześciu dni; kolonie patogenicznych izolatów bakterii *Ralstonia solanacearum* są mlecznobiałe, płaskie, nieregularne i fluidalne, z krwistoczerwonym zagłębionym środkiem, wykazujące wewnętrzne bruzdki;
- 4) kolonie bakterii o charakterystycznej morfologii, w celu uzyskania czystej kultury, przeszczepienia się na podstawowe podłoże odżywcze, o którym mowa w części IV ust. 1;
- 5) identyfikuje się czystą kulturę w sposób określony w części II ust. 4 pkt 1 i potwierdza identyfikację bakterii *Ralstonia solanacearum* na podstawie testu patogeniczności, o którym mowa w części II ust. 4 pkt 3.

#### Interpretacja wyników uzyskanych w metodzie izolacji na podłoża selektywne:

- 1) jeżeli w ciągu sześciu dni nie wyrosną żadne kolonie lub nie zostaną wyizolowane kolonie charakterystyczne dla bakterii *Ralstonia solanacearum*, pod warunkiem że nie podejrzewa się hamującego wpływu innych kolonii bakterii, oraz jeżeli w kontroli pozytywnej obecne są kolonie charakterystyczne dla bakterii *Ralstonia solanacearum* — wynik izolacji na podłoża selektywne uznaje się za negatywny;
- 2) jeżeli obecne są kolonie charakterystyczne dla bakterii *Ralstonia solanacearum* — wynik izolacji na podłoża selektywne uznaje się za pozytywny.

#### 6. Test biologiczny

- 1) dla każdej badanej próby używa się 10 sadzonek roślin testowych podatnej odmiany pomidora lub oberżyny w stadium trzeciego liścia właściwego; nie podlewa się roślin 24 godziny przed inokulacją;
- 2) 100. µl zawieszonego osadu inokuluje się rośliny testowe, wkuwając igłę w łodygę pomiędzy liścieniami oraz w jedno lub kilka innych miejsc;
- 3) przygotowuje się kontrolę pozytywną; stosując tę samą technikę inokuluje się 10 sadzonek zawieszoną 10<sup>6</sup> komórek/ml patogenicznego szczepu bakterii *Ralstonia solanacearum* biowar 2/rasa 3 jako kontrolę pozytywną oraz kontrolę negatywną, inokulując rośliny buforem do zawieszenia osadu; rośliny stanowiące kontrolę pozytywną oddziela się od pozostałych roślin w celu uniknięcia kontaminacji;
- 4) rośliny testowe hoduje się dalej, do czterech tygodni, w temperaturze 22—28 °C i w warunkach wysokiej wilgotności względnej, codziennie podlewając; prowadzi się obserwacje w celu stwierdzenia, czy na roślinach wystąpią objawy więdnięcia, epinastii, chlorozy lub karłowatości;
- 5) izoluje się bakterie z zainokulowanych roślin i dokonuje się identyfikacji czystej kultury o cha-

rakterystycznej morfologii w sposób określony w części II ust. 4 pkt 1 oraz potwierdza się identyfikację kultury jako bakterię *Ralstonia solanacearum* na podstawie testu patogeniczności, o którym mowa w części II ust. 4 pkt 3;

- 6) w przypadku zestawu roślin z badanej próby nie wykazujących objawów choroby, jeżeli uzna się za stosowne, sprawdza się, czy nie występuje infekcja latentna: z każdej rośliny testowej wycina się 1. cm fragment łodygi w odległości 2 cm od miejsca inokulacji; pobraną tkankę homogenizuje się w buforze do maceracji, a następnie wykonuje się posiew metodą rozcieńczeń, o której mowa w części III ust. 5 pkt 1; jeżeli wynik jest pozytywny, dokonuje się identyfikacji czystych kultur o charakterystycznej morfologii w sposób określony w części II ust. 4 pkt 1 oraz potwierdza się identyfikację kultury jako bakterii *Ralstonia solanacearum* na podstawie testu patogeniczności, o którym mowa w części II ust. 4 pkt 3.

#### Interpretacja wyniku testu biologicznego:

- 1) jeżeli rośliny testowe nie są porażone przez bakterię *Ralstonia solanacearum*, a bakteria *Ralstonia solanacearum* została wykryta w kontroli pozytywnej — wynik testu biologicznego uznaje się za negatywny;
- 2) jeżeli rośliny testowe są porażone przez bakterię *Ralstonia solanacearum* — wynik testu biologicznego uznaje się za pozytywny.

#### 7. Testy wzbogacania

- 1) przenosi się 100 µl zawieszonego osadu do 3 ml zmodyfikowanego bulionu SMSA, o którym mowa w części IV ust. 7;
- 2) mieszaninę inkubuje się 48 godzin, ale nie dłużej niż 72 godziny, w temperaturze 28 °C, z luźno umocowanym korkiem probówki w celu zapewnienia dostępu powietrza;
- 3) wciska się korek i miesza się na wstrząsarce typu worteks; rozdziela się go do celów testu IF, testu ELISA lub testu PCR.

#### 8. Test patogeniczności

Test patogeniczności przeprowadza się w sposób określony w części II ust. 4 pkt 3.

#### IV. Odczynniki, podłoża i testy stosowane przy diagnozowaniu, wykrywaniu i identyfikacji bakterii *Ralstonia solanacearum*

##### 1. Podłoża do izolacji i hodowli *Ralstonia solanacearum*

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

Nutrient Agar (Difco)	23 g
Woda destylowana	1 litr

przygotowuje się półlitrowe porcje pożywki w jednolitrowych kolbach; rozpuszcza się składniki i sterylizuje w autoklawie w temperaturze 121 °C przez 15 minut; schładza się do temperatury 50 °C, a następnie rozlewa na płytki;

###### 2) Yeast-Peptone-Glucose-Agar (YPGA) — agar drożdżowo-peptonowo-glukozowy

Yeast Extract (Difco)	5 g
Bacto Peptone (Difco)	5 g
D(+) glukoza (jednowodna)	10 g
Bacto Agar (Difco)	15 g
Woda destylowana	1 litr

przygotowuje się półlitrowe porcje pożywki w jednolitrowych kolbach; rozpuszcza się składniki i sterylizuje się w autoklawie w temperaturze 121 °C przez 15 minut; schładza się do temperatury 50 °C, a następnie rozlewa się na płytki;

###### 3) Sucrose Peptone Agar (SPA) — agar z sacharozą i peptonem

Sacharoza	20 g
Pepton	5 g
K <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub>	0,5 g
MgSO <sub>4</sub> × 7 H <sub>2</sub> O	0,25 g
Bacto Agar (Difco)	15 g
Woda destylowana	1 litr

przygotowuje się półlitrowe porcje pożywki w jednolitrowych kolbach; rozpuszcza się składniki; ustala się pH 7,2—7,4, jeżeli jest to konieczne; sterylizuje się w autoklawie w temperaturze 121 °C przez 15 minut; schładza się do temperatury 50 °C, a następnie rozlewa się na płytki;

###### 4) Podłoże Kelmana z chlorkiem tetrazoliowym

Casamino acids (Difco)	1 g
Bacto Peptone (Difco)	10 g
Glukoza	5 g
Bacto Agar (Difco)	15 g
Woda destylowana	1 litr

przygotowuje się półlitrowe porcje pożywki w jednolitrowych kolbach; rozpuszcza się składniki; sterylizuje się w autoklawie w temperaturze 121 °C przez 15 minut; schładza się do temperatury 50 °C; dodaje się wodny roztwór triphenylu tetrazolium chloride (Sigma) sterylizowany drogą filtrowania tak, aby uzyskać ostateczne stężenie 50 mg na litr; rozlewa się na płytki.

##### 2. Materiały do przygotowania próby

###### 1) bufor do maceracji: 50 mM bufor fosforanowy, pH 7,0

Na <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub>	4,26 g
KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>	2,72 g
Woda destylowana	1 litr

bufor ten jest stosowany do maceracji tkanek; rozpuszcza się składniki i ustala się pH; dzieli się na

mniejsze porcje, jeżeli uzna się za stosowne; sterylizuje się w autoklawie w temperaturze 121 °C przez 15 minut; w przypadku wykonywania testu PCR zaleca się dodanie 5 % polivinylpyrrolidone-40000 MWT (PVP-40) w celu zmniejszenia inhibicji amplifikacji przez cząsteczki związków aromatycznych obecnych w ekstrakcie; w przypadku przeprowadzenia homogenizowania tkanek ziemniaka zaleca się dodanie środka zapobiegającego powstawaniu kłaczkowości, środka przeciwpieniącego lub środka antyoksydacyjnego, w ilościach niezbędnych do uzyskania wymaganego stężenia;

Lubrol w płatkach	0,5 g /litr
DC Silicone antifoam	1,0 ml/litr
tetrasodium pyrophosphate	1,0 g/litr.

autoklawuje się oddzielnie; dodaje się do uzyskania wymaganego stężenia;

## 2) bufor do zawieszania osadu: 10 mM bufor fosforanowy, pH 7,2

Na <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub> × 12 H <sub>2</sub> O	2,7 g
NaH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub> × 2 H <sub>2</sub> O	0,4 g
Woda destylowana	1 litr

bufor ten jest stosowany do zawieszania tkanki przystolonowej bulwy i osadu; rozpuszcza się składniki i ustala pH; dzieli na mniejsze porcje, jeżeli uzna się za stosowne; sterylizuje się w autoklawie w temperaturze 121 °C przez 15 minut.

## 3. Materiały do testu IF

### 1) bufor IF: 10 mM bufor fosforanowy (PBS), pH 7,2

Na <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub> × 12 H <sub>2</sub> O	2,7 g
NaH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub> × 2 H <sub>2</sub> O	0,4 g
NaCl	8,0 g
Woda destylowana	1 litr

bufor ten jest stosowany do sporządzania rozcieńczeń przeciwciał; rozpuszcza się składniki i ustala pH; dzieli się na mniejsze porcje, jeżeli uzna się za stosowne; sterylizuje się w autoklawie w temperaturze 121 °C przez 15 minut;

### 2) bufor IF — Tween

bufor ten jest stosowany do płukania preparatów; dodaje się 0,1 % Tween 20 do buforu IF;

### 3) 0,1 M bufor fosforanowy z glicerolem, pH 7,6

Na <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub> × 12 H <sub>2</sub> O	3,2 g
NaH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub> × 2 H <sub>2</sub> O	0,15 g
Glicerol	50 ml
Woda destylowana	100 ml

bufor ten jest stosowany w celu zapobiegania szybkiemu wygasaniu fluorescencji.

## 4. Określanie poziomu infekcji w teście IF

Powierzchnia (S) okienka na szkiełku wielopunktowym

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

gdzie:

D = średnica okienka.

Powierzchnia (s) pola widzenia obiektywu

$$s = \frac{\pi d^2}{4} \quad \text{wzór (2)}$$

gdzie:

d = średnica pola widzenia.

Określa się *d* na podstawie bezpośredniego pomiaru lub według następującego wzoru:

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

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 itp. obiektywu,

$$d = \sqrt{\frac{4s}{\pi}}$$

na podstawie wzoru (2)

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

na podstawie wzoru (3)

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. Materiały do testu ELISA****1) podwójnie stężony opłaszczający bufor węglanowy, pH 9,6**

Na <sub>2</sub> CO <sub>3</sub>	6,36 g
NaHCO <sub>3</sub>	11,72 g
Woda destylowana	1 litr

rozpuszcza się składniki i ustala pH; dzieli się na mniejsze porcje, jeżeli uzna się za stosowne; sterylizuje się w autoklawie w temperaturze 121 °C przez 15 minut; jeżeli ekstrakt zawiera wysokie frakcje cząsteczek związków aromatycznych, dodaje się siarczynu sodowego o stężeniu końcowym 0,2 % jako środka antyoksydacyjnego;

**2) 10 x bufor fosforanowy (PBS), pH 7,4**

NaCl	80 g
KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>	2 g
Na <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub> x 12 H <sub>2</sub> O	29 g
KCl	2 g
Woda destylowana	1 litr

rozpuszcza się składniki i sprawdza pH; dzieli się na mniejsze porcje, jeżeli uzna się za stosowne; sterylizuje się w autoklawie w temperaturze 121 °C przez 15 minut;

**3) bufor fosforanowy (PBS-T)**

10 x PBS	100 ml		
10 % Tween 20	5 ml		
Woda destylowana	895 ml		
Fiolet krystaliczny	5 mg/ litr		
Polymixin B sulphate	100 mg/litr	(średnio 600 000 jednostek)	Sigma P-1004
Bacitracin <sup>*)</sup>	25 mg/litr	(średnio 1250 jednostek)	Sigma B-0125
Chloramphenicol	5 mg/litr		Sigma C-3175
Penicilin-G	0,5 mg/litr	(średnio 825 jednostek)	Sigma P-3032
Tetrazolium salts	50 mg/litr		

<sup>\*)</sup> zwiększenie stężenia Bacitracin do 300 ppm może zmniejszyć stopień kontaminacji przez bakterie saprofityczne bez redukcji wzrostu *Ralstonia solanacearum*;

składniki rozpuszcza się w 70 % etanolu, tak aby uzyskać dane stężenia dla objętości przygotowanego podłoża; niektóre składniki, mianowicie polymixin B i chloramphenicol wymagają lekkiego podgrzania i wstrząsania;

**4) bufor blokujący (przeciwciała) (musi być świeżo przygotowany)**

10 x PBS	10 ml
Polyvinylpyrrolidone-44000 MWT (PVP-44)	2,0 g
10 % Tween 20	0,5 g
Mleko w proszku	0,5 g
Woda destylowana	do 100 ml

**5) roztwór substratu alkalicznej fosfatazy, pH 9,8**

Diethanolamine	97 ml
Woda destylowana	800 ml

miesza się i ustala pH 9,8 za pomocą stężonego HCl; uzupełnia się do 1 litra wodą destylowaną; dodaje się 0,2 g MgCl<sub>2</sub>; rozpuszcza się dwie 5 mg tabletki substratu fosfatazy (Sigma) w 15 ml roztworu.

**6. Materiały do testu PCR****sekwencja oligonukleotydowa primera**

Primer OLI-1 5'-GGGGGTAGCTTGCTACCTGCC-3'

Primer Y-2 5'-CCCACTGCTGCCTCCCGTAGGAGT-3'

**7. Materiały do izolacji na podłoża selektywne i testów wzbogacania****1) podłoże selektywne SMSA**

podłoże podstawowe:

Casamino acids (Difco)	1 g
Bacto Peptone (Difco)	10 g
Glicerol	5 ml
Agar (Difco)	15 g
Woda destylowana	1 litr

przygotowuje się półlitrowe porcje pożywki w jednolitrowych kolbach; rozpuszcza się składniki i ustala pH; ustala się pH 6,5 przed autoklawowaniem, jeżeli jest to konieczne. *Ralstonia solanacearum* nie rośnie zbyt dobrze na podłożu o pH > 7,0; sterylizuje się w autoklawie w temperaturze 121 °C przez 15 minut; schładza się do temperatury 50 °C; dodaje się następujące składniki (wszystkie z Sigmy), tak aby uzyskać podane ostateczne stężenie:

**2) bulion SMSA**

przygotowuje się w podobny sposób jak selektywne podłoże SMSA, lecz nie dodaje się agaru; rozdziela się po 3 ml do 30 ml uniwersalnych probówek.