

Ocena skuteczności bakteriocydów

Erwinia amylovora

Zakres

Niniejsza norma opisuje sposób prowadzenia badań nad oceną skuteczności bakteriocydów, stosowanych w zwalczaniu infekcji kwiatowych wywołanych przez bakterie *Erwinia amylovora*, wywołujące zarazę ogniową drzew i krzewów różnanych.

Zatwierdzenia normy i poprawki

Po raz pierwszy zatwierdzona we wrześniu 1991.
Zgodnie z poprawkami wniesionymi do tekstu normy w 1996.
Poprawka zatwierdzona we wrześniu 2001.

1. Warunki doświadczenia

1.1 Organizmy badane, wybór rośliny uprawnej i jej odmiany

Organizmy badane: *Erwinia amylovora* (ERWIAM). W przypadku doświadczeń z wykorzystaniem sztucznego porażenia, należy użyć takich szczepów, o których wiadomo, że powodują zarazę ogniową w warunkach polowych i o sprawdzonej wrażliwości na stosowanie antybiotyków. Zaleca się użycie mieszanki kilku różnych szczepów.

Roślina uprawna: drzewa owocowe, w szczególności jabłonie (MABSD) i grusze (PYUCO), zdrewniałe rośliny ozdobne *Crataegus* spp. (1CSCG) lub *Cotoneaster* spp. (1CTTG). Zaleca się wybór bardzo odpornych odmian, a *Cotoneaster salicifolius* (CTTSA) jest jedną z nich. W przypadku *Crataegus*, szczególnie wskazane jest, by wszystkie badane rośliny pochodziły z tego samego klonu. Rośliny pojemnikowe mogą być użyte w doświadczeniach, jednak uzyskane na nich wyniki mogą służyć jedynie jako dane pomocnicze.

Doświadczenie powinno być przeprowadzone na organizmie (organizmach) i roślinie (roślinach) zgodnie z zaleceniami dla przewidywanego zastosowania.

1.2 Warunki doświadczenia

E. amylovora jest agrofagiem podlegającym kwarantannie w wielu krajach EPPO. Ze względu na ograniczenie jego występowania w danym rejonie, w niektórych krajach może nie być możliwe przeprowadzenie doświadczeń w warunkach polowych lub mogą one podlegać wewnątrzpaństwowym regulacjom.

Doświadczenie można przeprowadzić w warunkach polowych lub kontrolowanych. Warunki uprawowe (np. rodzaj gleby, nawożenie) powinny być jednakowe dla wszystkich poletek doświadczalnych

i powinny być zgodne z miejscową tradycją uprawy roślin. Doświadczenie należy przeprowadzić w rejonie, w którym wystąpienie porażenia jest dość prawdopodobne. Jeśli konieczne jest sztuczne wywołanie porażenia, należy je przeprowadzić zgodnie ze wskazówkami załączonymi w Załączniku I. W tym przypadku zaleca się dwukrotnie zwiększyć powierzchnię poletka i ograniczyć sztucznie wywołane porażenie do połowy jego powierzchni, aby najbliższe drzewa sąsiadujące rosnące na drugiej połowie poletka były wystawione na infekcję wtórną. Sztucznie wywołane porażenie należy przeprowadzić zgodnie z istniejącymi regulacjami fitosanitarnymi, aby zapobiec rozprzestrzenieniu się *E. amylovora*. Rośliny z widocznymi anomaliami wzrostu wywołanymi przemarznięciami, uszkodzeniem przez gryzonie itp. powinny być wyłączone z doświadczeń, podobnie jak zawiązki kwiatowe lub czubki pędów z widocznymi śladami porażenia.

W przypadku doświadczeń przeprowadzanych w warunkach kontrolowanych, zabiegi należy przeprowadzać w osobnych szklarniach lub oddzielonych od siebie pomieszczeniach, jeśli sposób stosowania preparatu może spowodować ich wzajemne znoszenie (np. w przypadku preparatów o wysokim ciśnieniu pary, fumigantów, aerozoli lub mgieł).

Doświadczenie powinno być częścią serii badań przeprowadzonych w różnych regionach o odmiennych warunkach środowiskowych i najlepiej w różnych latach lub sezonach wegetacji (zob. Normy EPPO PP 1/181 Przeprowadzanie i raporty z badań nad oceną skuteczności).

W trakcie doświadczenia nie należy używać innych środków ochrony roślin, które wykazują negatywne efekty uboczne względem patogenu i/lub insektów, które mogłyby wpłynąć na rozprzestrzenienie się infekcji wtórnych.

1.3 Projekt i układ doświadczenia

Kombinacje doświadczenia: poletka chronione badanym preparatem (preparatami), preparatem porównawczym i poletko kontrolne, powinny być rozmieszczone według odpowiedniego układu statystycznego.

Rozmiar poletka doświadczalnego (bez pasów ochronnych): w przypadku drzew owocowych co najmniej 3 drzewa. Zgodnie z miejscową tradycją uprawy roślin, wielkość poletka powinna zapewniać stosowanie preparatu w jednakowym stopniu na co najmniej 3 drzewach. W trakcie przeprowadzania doświadczenia należy ocenić minimum 200 pąków kwiatowych. Jeśli uzyskanie takiej ich liczby nie jest możliwe, wówczas należy zwiększyć rozmiary poletka. W przypadku klonów *Crataegus* i *Cotoneaster* należy wziąć pod uwagę co najmniej 5 roślin.

Liczba powtórzeń: przynajmniej 4

W celu uzyskania dalszych informacji odnośnie projektu badań, zob. Normę EPPO PP 1/152 Planowanie i analiza badań oceniających skuteczność.

2. Stosowanie zabiegów

2.1 Badany preparat (preparaty)

Oceniany preparat (preparaty) powinien być konkretnym bakteriocydem o określonej formulacji (zob. Normy EPPO PP 1/181 Przeprowadzanie i raporty z badań nad oceną skuteczności).

2.2 Preparat porównawczy

Preparat porównawczy powinien być środkiem znanym z praktycznej skuteczności w warunkach uprawy i zdrowotności roślin oraz w warunkach środowiskowych (włącznie z klimatycznymi) na obszarze, na którym ma być prowadzone doświadczenie. W zasadzie mechanizm działania, terminy i metody stosowania powinny być jak najbardziej zbliżone do tych dla badanego środka.

2.3 Sposób stosowania

Sposób stosowania winien odpowiadać dobrym standardom stosowanym w praktyce.

2.3.1 Sposób wykonania zabiegu

Sposób wykonania zabiegu (np. opryskiwanie) powinien odpowiadać zalecanemu dla danego bakteriocydu.

2.3.2 Rodzaj sprzętu

Zabiegi powinny być wykonane przy użyciu sprzętu pozwalającego na równomierne rozmieszczenie preparatu na obszarze całego poletka lub, jeśli jest to pożądane, naniesienie go dokładnie tam, gdzie ma być naniesiony w miarę możliwości dobrej praktyki produkcyjnej. Czynniki mogące wpłynąć na skuteczność (takie jak ciśnienie robocze, rodzaj dysz) winny być dobrane zgodnie z zaleceniami.

2.3.3 Czas i częstotliwość stosowania

Liczba zabiegów oraz data każdego z nich winny być zgodne z zaleceniami.

W przypadku sztucznie wywoływanych infekcji, preparat należałoby zastosować z reguły tuż przed porażeniem, przy czym należy zwrócić uwagę, aby powierzchnia rośliny zdążyła wyschnąć przed wywołaniem porażenia. Należy postępować standardowo wprowadzając próbne modele postępowania, co ma na celu ocenę odpowiednich warunków dla przeprowadzenia infekcji pierwotnej i wtórnej oraz zabiegów w zależności od sposobu działania preparatu (preparatów).

2.3.4 Dawki i objętości

Preparat powinien w zasadzie być stosowany w dawkach określonych w zaleceniach. Dawki wyższe lub niższe niż zalecane mogą być sprawdzone w celu określenia zakresu skuteczności i bezpieczeństwa uprawy.

Stosowana dawka powinna być wyrażona jako stężenie (%) w połączeniu z objętością (L ha⁻¹), odpowiednio do stanu uprawy. Dane te powinny być zanotowane wraz z dawką zastosowanego środka wyrażoną w kg (lub w L) na ha. Przydatnym może też być zanotowanie dawki substancji czynnej wyrażonej w g na ha.

Należy odnotować wszelkie odchylenia od zalecanego dawkowania.

W przypadku preparatów o dużym ciśnieniu roboczym, fumigantów, aerozoli lub mgieł wielkość użytej dawki należy wyrazić w stosunku do powierzchni [na m²] i kubatury [na m³] szklarni.

2.3.5 Dane dotyczące innych środków ochrony roślin

Jeżeli zachodzi potrzeba zastosowania innych środków ochrony roślin (bądź czynników ochrony biologicznej), powinny być one stosowane jednakowo na wszystkich poletkach, oddzielnie od badanego środka i środka porównawczego. Prawdopodobieństwo ich współdziałania powinno być ograniczone do minimum.

3. Sposób zbierania i rejestrowania wyników oraz dokonywania pomiarów

3.1 Dane meteorologiczne oraz edaficzne

3.1.1 Dane meteorologiczne

Doświadczenia przeprowadzone w warunkach polowych

Dla okresów poprzedzających i następujących po zastosowaniu preparatu należy zebrać dane meteorologiczne, które mogą mieć wpływ na rozwój uprawy i/lub patogenu oraz na działanie środka ochrony rośliny. Obejmują one zazwyczaj dane dotyczące opadów atmosferycznych i temperatury. Wszystkie dane powinny być zebrane z miejsca prowadzenia doświadczenia, lecz mogą też pochodzić z pobliskiej stacji meteorologicznej.

W dniu zastosowania preparatu należy odnotować dane meteorologiczne, które mogą mieć wpływ na jakość i trwałość zastosowanych preparatów. Dotyczy to zazwyczaj przynajmniej opadów atmosferycznych (rodzaju i wielkości w mm) oraz temperatury (średniej, maksymalnej i minimalnej w °C). Przydatnym może okazać się zarejestrowanie danych dotyczących wilgotności, ponieważ duża wilgotność stymuluje infekcję *E. amylovora* oraz nie zawsze jest skorelowana z opadami deszczu. Należy również odnotować wszelkie znaczące zmiany pogody oraz czas ich wystąpienia w stosunku do czasu zastosowania preparatu.

Ponadto, w ciągu całego okresu przeprowadzania doświadczenia należy odnotować wszelkie ekstremalne warunki pogodowe, które mogą mieć wpływ na wyniki, takie jak dotkliwa lub długotrwała susza, obfite opady, późne przymrozki, grad. itp. We właściwy sposób należy też odnotować dane dotyczące nawadniania.

Doświadczenia przeprowadzone w warunkach polowych

W ciągu całego okresu przeprowadzania doświadczenia należy odnotować temperaturę, wilgotność oraz, jeśli dotyczy, dane dotyczące programu sztucznego oświetlenia oraz podlewania.

3.1.2 Dane edaficzne

Nie są wymagane.

3.2 Sposób, terminy oraz częstotliwość dokonywania oceny

Należy odnotować fazę rozwojową rośliny uprawnej BBCH każdorazowo w dniu zastosowania preparatu i zbierania danych służących do jego oceny.

3.2.1 Rodzaj danych

Na każdym poletku należy policzyć łączną liczbę porażonych pąków kwiatowych lub czubków pędów. Jeśli jest to trudne do wykonania w praktyce (np. z powodu wysokiej ściany drzew), wystarczy ocenić odsetek porażonych pąków kwiatowych lub czubków pędów. Porażone pąki kwiatowe lub czubki pędów można usunąć z każdego poletka każdorazowo po dokonaniu oceny, jeśli jest to zgodne z miejscową praktyką; należy jednak odnotować taki fakt. Bez względu na to, która metoda oceniania jest używana, należy podać średnią łączną liczbę pąków kwiatowych lub czubków pędów przypadających na poletko. Ta średnia liczba może być oparta o całkowitą sumę pąków/czubków (zarówno zdrowych jak i porażonych) na co najmniej 2 reprezentatywnych roślinach z danego doświadczenia. Na poletkach kontrolnych więcej niż 5% roślin musi być porażonych, aby ocena doświadczenia była możliwa. Należy uzyskać potwierdzenie, że oceniane oznaki są spowodowane przez *E. amylovora*, a nie przez inny patogen.

3.2.2 Terminy i częstotliwość

Pierwsza ocena: na początku doświadczenia lub tuż po pojawieniu się pierwszych oznak porażenia na poletku niepoddawany zabiegom.

Druga ocena: 3-10 dni później.

Trzecia ocena: średnio 10 dni po ostatnim zastosowaniu preparatu. W przypadku złych warunków pogodowych (niskich temperatur) ocenę tę należy przesunąć o 4-5 tygodni.

W przypadku wielokrotnego stosowania preparatu, przydatnym może okazać się dokonywanie ocen przed każdym jego zastosowaniem.

3.3 Bezpośredni wpływ na roślinę uprawną

Uprawa powinna być zbadana na obecność objawów fitotoksyczności (takich jak brunatnienie liści), a wyniki tego badania powinny być zapisane. Ponadto należy opisać wszelkie objawy korzystnego działania preparatu. Wszelkie pozytywne efekty, ich rodzaj oraz rozmiary widoczne w uprawie powinny być opisane, a nawet brak jakichkolwiek efektów powinien być odnotowany.

Fitotoksyczność powinna być szacowana następująco:

(1) Jeśli objawy fitotoksyczności są policzalne lub mierzalne, powinny być wyrażone w liczbach bezwzględnych.

(2) W pozostałych przypadkach częstotliwość i natężenie uszkodzeń powinny być oszacowane. Można to zrobić dwojako: każde poletko jest oceniane na obecność środków fitotoksycznych w odpowiedniej skali, bądź też każde traktowane

poletko jest porównywane z poletkiem kontrolnym, a fitotoksyczność jest wyrażana procentowo.

We wszystkich przypadkach objawy uszkodzenia roślin powinny być dokładnie opisane (skarłowacenia, chloroza, deformacje, itp.). W celu uzyskania dalszych szczegółów zob. Normę EPPO PP 1/135 Badanie fitotoksyczności, która zawiera rozdziały poświęcone poszczególnym uprawom.

3.4 Wpływ na organizmy niebędące przedmiotem zwalczania

3.4.1 Wpływ na inne agrofagi

Jakiegokolwiek zaobserwowane efekty, korzystne bądź niekorzystne, mogące mieć wpływ na występowanie innych agrofagów powinny być odnotowane.

3.4.2 Wpływ na inne organizmy niebędące przedmiotem zwalczania

Każde zaobserwowane działanie, korzystne bądź niekorzystne na naturalnie występujące lub wprowadzane owady zapylające lub naturalnych

wrogów powinno być zarejestrowane. Jakiegokolwiek zaobserwowane efekty, pozytywne bądź negatywne, występujące na plantacjach przylegających i następczych powinny być odnotowane. Dotyczy to również wszelkich zjawisk w zakresie ochrony środowiska, w szczególności wpływu na dziko żyjącą faunę i florę.

3.5 Ilościowe i jakościowe rejestrowanie plonów

Nie jest wymagane.

4. Wyniki

Wyniki powinny być przedstawione w formie usystematyzowanej a raport powinien obejmować analizę i ocenę. Dane źródłowe (robocze) również powinny być dostępne. Należy też dokonać analizy statystycznej przy użyciu odpowiednich metod, które powinny być podane. Brak takiej analizy powinien być uzasadniony. Zobacz Normę EPPO PP 1/152 Planowanie i analiza skuteczności badań szacunkowych.

ilości zawiesiny należy się pozbyć, a wykorzystywany sprzęt dokładnie odkazić. Z uwagi na niebezpieczeństwo przeniesienia infekcji przez owady przylatujące na kwiaty (e.g. pszczoły), sztuczne infekcje należy przeprowadzać jedynie na terenach, na których patogen jest już obecny.

Załącznik I

Sztucznie wywoływane infekcje

Należy użyć zawiesiny zawierającej komórki bakteryjne w ilości 10^6 - 10^8 /ml. Stężenie takie należy uzyskać przy pomocy zwykłych metod laboratoryjnych oraz należy je odnotować. Nie należy korzystać przy tym z żadnych dodatków (np. specjalnych emulsji, detergentów). Po przeprowadzeniu zabiegu, przy użyciu odpowiednich metod należy oszacować liczbę żywych komórek.

Zawiesina bakteryjna powinna być nanoszona przy pomocy delikatnego opryskiwania po to, aby umożliwić naturalne umocowanie się patogenu przede wszystkim na znamieniu, używając w tym celu sprzętu umożliwiającego jednakowe rozmieszczenie inokulum. Porażenie najlepiej jest przeprowadzić przy pochmurnym niebie, a wzmocnić je można przez zapewnienie wysokiej wilgotności, np. poprzez przykrycie roślin folią na czas około 10-15 godzin po przeprowadzeniu zabiegu. Lekki deszcz z długim czasem wysychania (ponad 10 godzin) dodatkowo wspomaga infekcję; taki sam efekt można uzyskać powtarzając co jakiś czas czynność zraszania roślin wodą, zwracając przy tym uwagę, by nie zmyć dawki inokulum lub preparatów ochronnych.

Najlepsze rezultaty daje porażenie wywołane na otwartych kwiatkach, przy czym co najmniej 30 % kwiatów powinno być otwartych (BBCH 63) lub jeszcze lepiej w okresie pełnego kwitnienia (BBCH 65). Aby uniknąć przenoszenia preparatu przez wiatr oraz wykorzystać obecność rosy, opryskiwanie najlepiej przeprowadzać wcześniej rano. Nadmiernej