

Metodyka pobierania prób materiału szkółkarskiego do testów laboratoryjnych na obecność wirusów

Rośliny testowane: **Grusza - *Pyrus L.*, Jabłoń – *Malus Mill.*,
Pigwa – *Cydonia oblonga Mill.***

Wirusy:

Wirus chlorotycznej plamistości liści jabłoni - *Apple chlorotic leaf spot virus* (ACLSV)

Wirus mozaiki jabłoni - *Apple mosaic virus* (ApMV)

Wirus żłobkowatości pnia jabłoni - *Apple stem grooving virus* (ASGV)

Wirus jamkowatości pnia jabłoni - *Apple stem pitting virus* (ASPV)

Termin pobierania prób

Próby liści do testów laboratoryjnych na obecność ACLSV, ASGV, ApMV i ASPV należy pobierać wiosną. Dopuszczalne jest również pobieranie prób latem, pod warunkiem, że przez dwa tygodnie temperatura powietrza nie przekroczyła 25°C.

Wybór tkanki/części rośliny do testowania

Do testów na obecność wirusów w drzewach owocowych można stosować liście, tyko, kwiatostany, owoce, pąki liściowe i pąki kwiatowe. Zalecane jest wykorzystywanie młodych liści, ale nie z wierzchołków pędów! Próby pobierać z fragmentu pędu do 2/3 długości od nasady. Ekstrakty z liści są najprostsze do przygotowania, a wyniki są bardziej powtarzalne niż w przypadku testowania kwiatostanów/płatków kwiatowych lub owoców.

Sady nasienne nie muszą być testowane na obecność wirusów, które nie są przenoszone do siewek: ACLSV, ApMV i ASPV, chyba, że zaobserwowano podejrzane symptomy wskazujące na porażenie.

Obecność ApMV badana jest tylko w materiale szkółkarskim z rodzaju *Malus Mill.* (jabłonie).

Sposób pobierania prób

Przy pobieraniu próbek należy kierować się następującymi ogólnymi zasadami:

1. Jedna próbka powinna pochodzić z jednej rośliny, oznakowanej w sposób umożliwiający indywidualną identyfikację zainfekowanych roślin (*w dalszej części omówiono odstępstwa od tej reguły*).
2. Na plantacji matecznej podkładek wegetatywnych jedna próbka powinna być pobrana z 1 mb matecznika. Każda próbka powinna reprezentować kolejne 50 mb matecznika.
3. Wskazane jest oznaczenie (zaetykietowanie) roślin, z których pobrano próbki, chyba, że identyfikacja jest możliwa na podstawie istniejącego oznakowania lub szczegółowego planu nasadzenia.
4. Próby należy pobierać do trwale oznakowanych foliowych torebek, zabezpieczając przed nadmiarem wilgoci i wysychaniem (groźniejszy jest nadmiar wilgoci niż wysychanie). Torebki mogą być otwarte tylko jeżeli będą transportowane bezpośrednio do laboratorium w sposób, który uniemożliwi zamieszanie prób. W każdym innym przypadku próby należy zabezpieczyć przez zamknięcie torebek. Na czas zbierania i transportu, próby należy zabezpieczyć przed nadmiernym nagrzewaniem przez zacieniowanie. W przypadku wyższych temperatur (powyżej 25°C) zaleca się umieszczenie prób w tzw. lodówce turystycznej, pojemniku styropianowym albo "torbie na mrożonki" z wkładem chłodzącym. Nie dopuszczać do zamrożenia prób! Po dostarczeniu do laboratorium próby należy umieścić w chłodzie (+4°C od +10°C). Próbki mogą być przechowywane w lodówce (chłodni) kilka do kilkunastu dni.
- 5- Próba powinna być reprezentatywna dla rośliny, tzn.:
 - a. z drzew matecznych próbki pobierane są dla każdego drzewa, z czterech różnych pędów (z czterech stron drzewa), po dwa do czterech liści, lub odpowiednio więcej pąków lub kwiatów.
 - b. w mateczniku podkładek rozmnażanych przez odkłady, identyfikacja pojedynczej rośliny może być bardzo trudna lub praktycznie niemożliwa. W takim przypadku należy trwale oznakować 1 metr bieżący, z którego należy pobrać do testów po jednym liściu z ośmiu pędów (jako jedną próbę). W przypadku stwierdzenia wirusa/wirusów usunąć rośliny z badanego metra i po jednym metrze z każdej strony (łącznie 3 metry bieżące rzędu).
 - ~~c. z młodszych niż 5-letnie drzew pobierane są liście (pąki) ze wszystkich pędów.~~
6. Liście (ewentualnie kwiatostany, pąki) należy pobierać z dolnej i środkowej części pędów (jednak patrz następny punkt).
7. Jeżeli na liściach występują chlorotyczne lub nekrotyczne plamy, deformacje liści itp. należy pobrać w pierwszym rzędzie próbki z podejrzanych o zakażenie części rośliny.

8. Pobrane próbki należy przekazać do badań laboratoryjnych załączając także "zlecenie na wykonanie badań laboratoryjnych", którego formularz można pobrać ze strony internetowej właściwego miejscowego Wojewódzkiego inspektoratu Ochrony Roślin i Nasiennictwa (piorin.gov.pl). Dodatkowo należy sporządzić i przechowywać przez 3 lata kopię "Zlecenia" oraz pisemną informację zawierającą dodatkowe dane, o ile nie zostały podane w "Zleceniu":

Rodzaj uprawy (gatunek, odmiana, ew. typ, wiek roślin)	
Rodzaj pobranego materiału (na przykład: liście, kwiaty)	
Plan (szkic) lub opis umożliwiający jednoznaczne odnalezienie roślin w terenie, z których pobierano próby	
Dodatkowe informacje dotyczące m.in. występowania podejrzanych symptomów, chorób, szkodników, lub rozpoznanych źródeł infekcji w pobliżu badanych roślin	

UWAGA: Próby do urzędowego badania na obecność patogenów podlegających obowiązkowi zwalczania (patogeny kwarantannowe) muszą być pobrane przez inspektorów.

Metoda laboratoryjna weryfikacji obecności wirusów

Dla ACLSV, ASGV i ApMV należy stosować test ELISA lub RT-PCR. Dla ASPV stosować RT-PCR; test ELISA może być wykorzystany do pozytywnej weryfikacji podejrzeń, ale jego negatywny wynik nie może być uważany za dowód braku porażenia badanej rośliny.

Objaśnienia skrótów użytych w tekście:

ELISA = Enzyme Linked ImmunoSorbent Assay = Test immunoenzymatyczny

RT = Reverse Transcription = Odwrotna Transkrypcja

PCR = Polymerase Chain Reaction = Reakcja Łańcuchowa Polimeryzacji

Opracowanie: dr Tadeusz Malinowski, e-mail: tadeusz.malinowski@inhort.pl