

Metodyka pobierania prób materiału szkółkarskiego do testów laboratoryjnych na obecność wiroidów

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

Wiroidy:

Wiroid pęcherzykowatych zrakowaceń gruszy – *Pear blister canker viroid* (PBCVd)

Wiroid bliznowatości skórki jabłek – *Apple scar skin viroid* (ASSVd)

Wiroid marszczycy owoców jabłek – *Apple dimple fruit viroid* (ADFVd)

Termin pobierania prób

Próby liści do testów laboratoryjnych na obecność wiroidów 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 wiroidów wykorzystywane są liście (a dokładniej ogonki liściowe i nerw główny) lub owoce (dojrzałe). Zalecane jest wykorzystywanie młodych liści, ale nie z wierzchołków pędów! Próby pobierać z fragmentu pędu do 2/3 długości od nasady.

Obecność PBCVd bada się tylko w materiale szkółkarskim z rodzaju *Pyrus L.* (grusza) i *Cydonia oblonga Mill.* (pigwa). Obecność ASSVd i ADFVd bada się tylko w materiale szkółkarskim rodzaju *Malus Mill.* (jabłoń). Dodatkowo, testy na obecność wiroidów prowadzone są tylko w przypadku podejrzenia (zaobserwowania) podejrzanym symptomów na roślinach badanych lub pochodzących od nich).

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 zacielenie. 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).
6. Liście należy pobierać z dolnej i środkowej części pędów (jednak patrz następny punkt).
7. Jeżeli na części badanej rośliny występują symptomy charakterystyczne dla porażenia wiroidami, należy z tych miejsc pobrać w pierwszym rzędzie próbki do badania laboratoryjnego.
8. Pobrane próbki należy przekazać do badań laboratoryjnych załączając także "zlecenie na wykonanie badań laboratoryjnych", którego formularz można pobrać Data publikacji (umieszczenia na stronie internetowej): 31.05.2019

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 wiroidów

Wiroidy są wykrywane metodami: elektroforezy powrotnej (R-PAGE), RT-PCR, RT-LAMP lub hybrydyzacji molekularnej.

Objaśnienia skrótów użytych w tekście:

R-PAGE = return – polyacrylamide gel electrophoresis = elektroforeza powrotna w żelu poliakrylamidowym

RT = Reverse Transcription = Odwrotna Transkrypcja

PCR = Polymerase Chain Reaction = Reakcja Łańcuchowa Polimeryzacji

LAMP = Loop Mediated isothermal amplification = izotermiczna amplifikacja z wykorzystaniem pętli

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