

Metodyka pobierania prób materiału szkółkarskiego do testów laboratoryjnych na obecność wirusów

Rośliny testowane:

Śliwa domowa - *Prunus domestica* L.
Śliwa japońska - *Prunus salicina* L.
i gatunki używane jako ich podkłádki

Wirusy:

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

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

Utajony wirus pierścieniowej plamistości mirabelki - *Myrobalan latent ring spot virus* (MLRSV)

Wirus karłowatości śliwy = wirus żółtaczk wiśni - *Prune dwarf virus* (PDV)

Wirus nekrotycznej plamistości pierścieniowej wiśni - *Prunus necrotic ring spot virus* (PNRSV)

Termin pobierania prób

Do testów na obecność PDV i PNRSV w drzewkach i drzewach kwitnących i mających wystarczającą liczbę pędów w koronie (3 letnich i starszych) zaleca się ścięcie 3-4 pędów jednorocznych z badanej rośliny późną zimą lub wczesną wiosną (nie później jednak niż 3 tygodnie przed przewidywanym kwitnieniem drzew) i podpięcie ich w temperaturze pokojowej (18-24°C). Do testu można wykorzystać nabrzmiałe pąki (kwiatowe i liściowe) lub rozwinięte kwiatostany i młode listki. Przy testowaniu mateczników podkładek nie stosujemy pędzenia – rośliny te jeszcze nie kwitną i brak jest możliwości pobrania pędów zimą.

Do testów laboratoryjnych na obecność ACLSV, ApMV, MLRSV oraz PDV i PNRSV (jeśli nie wykorzystano testów podpiętego materiału roślinnego) próby należy pobierać wiosną, jednak w przypadku ACLSV nie wcześniej niż końca maja/czerwcu. Dopuszczalne, chociaż niezalecane, jest również pobieranie prób latem, pod warunkiem, że przez dwa tygodnie temperatura powietrza nie przekroczyła 25°C.

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

Wybór tkanki/części rośliny do testowania

Do testów można wykorzystywać liście, łtyko, kwiatostany, pąki liściowe i pąki kwiatowe. Z materiału niepodpędzanego 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.

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. Wskazane jest oznaczenie (zaetykietowanie) roślin, z których pobrano próbki, chyba, że identyfikacja jest możliwa na podstawie istniejącego oznakowania lub szczegółowego planu nasadzenia.
3. 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 zacielenowanie. 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 do +10°C).Próbki mogą być przechowywane w lodówce (chłodni) kilka do kilkunastu dni.
4. Próba powinna być reprezentatywna dla rośliny, tzn.:
 - a. z 5-letnich i starszych roślin próbka pobierana jest z czterech różnych pędów (z czterech stron drzewa), po dwa do czterech liści, lub odpowiednio więcej pąków lub kwiatów.
 - b. z młodszych niż 5-letnie drzew pobierane są liście (pąki) ze wszystkich pędów.
5. Liście (ewentualnie kwiatostany, pąki) należy pobierać z dolnej i środkowej części pędów (jednak patrz następny punkt)

6. Jeżeli na liściach występują chlorotyczne lub nekrotyczne plamy, deformacje liści itp. należy pobrać w pierwszym rzędzie próbki liści wykazujących podejrzane symptomy
7. 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 1: W przypadku pobierania prób 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).

UWAGA 2: Próby do urzędowego badania na obecność patogenów podlegających obowiązkowi zwalczania (patogeny kwarantannowe) muszą być pobrane przez inspektorów.

Metoda laboratoryjna weryfikacji obecności wirusów

Dla ApMV, PDV, PNRSV i ACLSV należy stosować test ELISA lub RT-PCR, dla MLRSV stosować RT-PCR.

Objaśnienia skrótów użytych w tekście:

ELISA =Enzyme Linked ImmunoSorbent Assay = Test immunoenzymatyczny

RT = Reverse Transcription = OdwrotnaTranskrypcja

PCR =Polymerase Chain Reaction = Reakcja Łańcuchowa Polimeryzacji

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