

## **Metodyka pobierania próbek materiału szkółkarskiego do badań laboratoryjnych na obecność grzyba *Colletotrichum acutatum***

Rośliny testowane: **Poziomka – *Fragaria L.*,  
Truskawka – *Fragaria × ananassa D.***

### Termin pobierania próbek:

Dopuszczalny próg tolerancji w przypadku materiału roślinnego, na każdym etapie jego produkcji, wynosi 0% roślin wykazujących objawy chorobowe w danej partii ocenianego materiału (Rozporządzenie Wykonawcze Komisji (UE) 2019/2072 z dnia 28 listopada 2019 r.)

Próbki do badania obecności patogena w materiale roślinnym należy pobierać wiosną (V-VI) lub jesienią (IX-X) przed nastaniem długotrwałych wysokich lub niskich temperatur powietrza.

### Wybór tkanki/części rośliny

Na ogonkach, liściach i szypułkach kwiatowych truskawek porażonych przez *Colletotrichum acutatum* (*Glomerella acutata*) występują małe, czarne, wydłużone, zapadnięte nekrozy zaś na liściach - nieregularne plamy. Objawy można także obserwować na przekroju podłużnym korony (skróconej łodygi) truskawki/poziomki w postaci czerwonobrazowej nekrozy. W przypadku wyraźnie widocznych zmian chorobowych, należy pobrać fragment rośliny zawierający porażoną tkankę i przeprowadzić izolację patogena na podłoża mikrobiologiczne. W celu identyfikacji sprawcy choroby stosuje się metody klasyczne oraz techniki biologii molekularnej.

Ogonki liściowe oraz rozłogi mogą być źródłem patogena występującego w stadium ukrytym (brak objawów) lub też obserwuje się na nich niepozorne bądź nietypowe nekrozy, które mogą być mylone z uszkodzeniami powodowanymi przez inne czynniki. Chociaż patogen w stadium ukrytym może być obecny we wszystkich częściach rośliny, można go wykryć pobierając do testów fragmenty tkanki (ok. 4 cm) z podstawy starszych ogonków wraz z przylistkami lub pobrać do badania całą roślinę. Próbki należy pobrać, z co najmniej 300 roślin z badanej partii towaru, lub wybrać do badania 300 całych roślin.

## Sposób pobierania próbek

### **Przy pobieraniu próbek należy kierować się następującymi zasadami:**

1. W pierwszej kolejności należy pobrać próbkę z liści lub ogonków liściowych wykazujących objawy chorobowe (plamy, nekrozy, deformacje lub utrata turgoru).
2. Jedna próbka powinna pochodzić z jednej rośliny, oznakowanej w sposób umożliwiający indywidualną identyfikację zainfekowanych roślin.
3. Wskazane jest oznaczenie (zaetykietowanie) roślin, z których pobrano próbki, chyba, że identyfikacja jest możliwa na podstawie istniejącego oznakowania lub szczegółowego planu nasadzenia.
4. Próbkę należy pobierać do trwale oznakowanych foliowych torebek i zabezpieczyć przez ich zamknięcie. W przypadku wyższych temperatur (powyżej 25°C) zaleca się umieszczenie próbek w tzw. lodówce turystycznej, pojemniku styropianowym albo "torbie na mrożonki" z wkładem chłodzącym. Nie dopuszczać do zamrożenia próbek! Po dostarczeniu do laboratorium, próbki umieścić w temperaturze (+4°C do +10°C). Mogą być one przechowywane w warunkach chłodni maksymalnie przez okres kilku dni.
5. Pobrane próbki przekazać do badań laboratoryjnych załączając zlecenie na wykonanie badań laboratoryjnych, którego formularz można pobrać ze strony internetowej właściwego miejscowego Wojewódzkiego inspektoratu Ochrony Roślin i Nasiennictwa ([piorin.gov.pl](http://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)	
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	

### Metoda laboratoryjna weryfikacji obecności *Colletotrichum acutatum*

Badania na obecność patogena w materiale roślinnym można przeprowadzić w dwóch etapach: (1) wykrywanie grzyba poprzez jego namnażanie (pułapka, stymulacja zarodnikowania, hodowla na pożywkach agarowych ; (2) identyfikacja na podstawie morfologii oraz testów i PCR. W przypadku pracy z materiałem bez widocznych

Data publikacji (umieszczenia na stronie internetowej): 05.03.2020 r.

objawów, zabieg z parakwatem jest testem, który stymuluje zarodnikowanie patogena na ogonkach liściowych i pozwala na wykrycie zarodnikowania grzyba z użyciem mikroskopu biologicznego. Test z parakwatem. Próbki ogonków liściowych należy dokładnie umyć w wodzie wodociągowej, zdezynfekować przez 4 min. w 1 litrze rozcieńczonego podchlorynu sodu (NaOCl) i dwukrotnie wypłukać w wodzie wodociągowej. Następnie ogonki zanurzyć na 1 minutę w wodnym roztworze parakwatu o stężeniu 1:40, a po tym czasie opłukać sterylną wodą i umieścić w warunkach aseptycznych w wilgotnej komorze i inkubować w świetle w temperaturze 25°C przez 6 dni. Po okresie inkubacji wskazana jest mikroskopowa obserwacja próbek pod kątem obecności typowego dla patogena zarodnikowania (OEPP/EPPO 2008, PM 4/11(2); Cook, 1993; Dyko i Mordue, 1979).

Alternatywnie, po zabiegu z parakwatem, próbki można homogenizować w moździerzu z 0,1% agarem wodnym. Następnie, należy przeprowadzić serię rozcieńczeń (1, 1/10, 1/100) uzyskanego homogenatu, i rozetrzeć go na podłożu półselektywnym MBC (4,5% mąka owsiana, 1,3% agar, 7 ppm benomyl, 250 ppm chloramphenicol, woda destylowana) (Batta, 1991). Po 6 dniach inkubacji w 25°C, w świetle UV (Morzières i Baudry, 1993) obserwuje się wzrost kolonii grzyba i identyfikuje na podstawie morfologii, testem ELISA lub testem PCR (OEPP/EPPO 2004, PM7/25(1)). Po upływie 6 dni na pożywce MBC obserwuje się białe, punktowo rozmieszczone kolonie (kilka mm szerokości), z łososiowo-różową masą zarodników wypływającą z centrum. Rzadko obserwuje się acerwulusy z typowymi dla rodzaju szczecinkami.

b) Ocena morfologii kolonii na podłożu stałym. Izolacje z materiału roślinnego z objawami można przeprowadzać zarówno na PDA bez suplementów lub z dodatkiem antybiotyków, bądź na podłożu półselektywnym (Barker i Pitt, 1987). Do bezpośredniej izolacji patogena można również zastosować pożywkę selektywną MBC. Wybór podłoża zależy od spodziewanego poziomu kontaminacji innymi organizmami. Konidia z acerwulusów pochodzących z porażonego materiału roślinnego lub fragment tkanki z nekrozą, przygotowany jak do testu z parakwatem, należy przenieść w warunkach aseptycznych na odpowiednie podłożo agarowe. Zaszczepione szalki Petriego inkubuje się w 25 °C przez 12 godz. w świetle bliskim UV i 12 godz. w ciemności. Morfologię kultur ocenia się według klucza (OEPP/EPPO 2004, PM7/25(1)).

- a) Test PCR. Do izolacji kwasów nukleinowych, zarówno z czystych kultur grzyba, jak i materiału roślinnego z wyraźnymi objawami choroby, można wykorzystać komercyjne zestawy, jak np. GeneMATRIX Plant & Fungi DNA Purification Kit. (EURx). W każdym przypadku należy stosować się do zaleceń producenta. Obecnie dostępny jest jeden zestaw starterów do identyfikacji *G. acutata*: starter Calnt2 (Sreenivasaprasad i in. 1996) w połączeniu ze starterem ITS4 (White i in. 1990), który jest uniwersalny dla regionu ITS grzybów. Technika ta nie została jeszcze udoskonalona do bezpośredniego wykrywania patogena w porażonym materiale roślinnym.

Startery specyficzne dla gatunku *Colletotrichum acutatum* do przeprowadzenia reakcji PCR

Patogen	Startery	Sekwencja startera (5' → 3')	Temperatura przyłączenia starterów (°C)	Długość produktu PCR (pz)	Literatura
<i>C. acutatum</i>	CaInt2	5'-GGGGAAGCCTCTCGCGG -3'	55 °C	490	8
	ITS4	5'-TCCTCCGCTTATTGATATGC-3'			9

Literatura:

1. Barker I., Pitt D. 1987. Selective medium for the isolation from soil of the leaf curl pathogen of anemones. Transactions of the British Mycological Society 88: 553-555.
2. Batta Y. 1991. L'antracnose du fraisier dû à *Colletotrichum acutatum*: épidémiologie de la maladie et sensibilité de l'hôte. PhD Thesis, Institut National, Paris-Grignon (FR).
3. Cook R.T.A. 1993. Strawberry black spot caused by *Colletotrichum acutatum*. In: Plant Health and the European Single Market (Ed. Ebbels D.), pp. 301–304. British Crop Protection Council, Farnham (GB).
4. Dyko B.J., Mordue J.E.M. 1979. *Colletotrichum acutatum*. CMI Descriptions of Pathogenic Fungi and Bacteria, no. 630. CAB International, Wallingford (GB).
5. Morzières J.P., Baudry A. 1993. Comparison of three methods to assess latent contamination of *Colletotrichum acutatum* on frozen strawberry plants. Acta Hort., 348: 504-508.
6. OEPP/EPPO Bulletin 34, 2004, 155–157. PM7/25 (1). Protokoły diagnostyczne dla agrofagów podlegających przepisom. *Glomerella acutata*.
7. OEPP/EPPO Bulletin 38, 2008, 430-737. PM 4/11 (2). Certification scheme for strawberry.
8. Sreenivasaprasad S., Sharada K., Brown A.E., Mills P. R. 1996. PCR-based detection of *Colletotrichum acutatum* on strawberry. Plant Pathol. 45: 650-655.
9. White T.J., Bruns T., Lee S., Taylor J. 1990. Amplification and direct sequencing of fungal ribosomal RNA sequencing of fungal ribosomal RNA genes for phylogenetics. W: PCR Protocols: A Guide to Methods and Applications. Innis M.A., Gelfand D.H., Sninsky J.J., White T.J. (ed.) Academic Press, San Diego, CA.: 315-322.

Objaśnienia skrótów użytych w tekście:

PCR = Polymerase Chain Reaction = reakcja łańcuchowa polimerazy

ELISA = Enzyme-Linked Immunosorbent Assay = test immunodiagnostyczny

---

Opracowanie: mgr Monika Michalecka, e-mail: [monika.michalecka@inhort.pl](mailto:monika.michalecka@inhort.pl)

Data publikacji (umieszczenia na stronie internetowej): 05.03.2020 r.