

Metodyka pobierania prób materiału szkółkarskiego do testów laboratoryjnych na obecność wirusów i wiroidów

Rośliny testowane: **Brzoskwinia - *Prunus persica* L. i gatunki używane jako jej podkładki**

Wirusy:

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

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

Utajony wirus moreli -*Apricot latent virus* (ApLV)

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

Wirus ospowatości śliwy – *Plum pox virus* (PPV)

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

Utajony wirus pierścieniowej plamistości truskawki -*Strawberry latent ringspot virus* (SLRSV)

Wiroid:

Utajony wiroid mozaiki brzoskwini =*Peach latent mosaic viroid* (PLMVd)

Termin pobierania prób

Do testów na obecność PDV i PNRSV w drzewkach i drzewach kwitnących oraz 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 podpędzenie 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 ApMV, ApLV, SLRSV, PLMVd oraz PDV i PNRSV (jeśli nie wykorzystano testów podpędzonego materiału roślinnego) próby należy pobierać wiosną, nie później niż w drugiej dekadzie maja.

Próbki liści do testów na obecność PPV i ACLSV należy pobierać od trzeciej dekady maja do końca czerwca. 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 patogenów, które nie są przenoszone do siewek: ACLSV, ApMV, ApLV, SLRSV i PLMVd, chyba, że zaobserwowano podejrzane symptomy wskazujące na porażenie.

Wybór tkanki/części rośliny do testowania

Do testów na obecność wirusów można wykorzystywać liście, tyko, 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.

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.

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 zacienianie. 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 "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: 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).

Metoda laboratoryjna weryfikacji obecności wirusów

Dla ApMV, PDV, PNRSV, SLRSV, PPV i ACLSV należy stosować test ELISA lub RT-PCR, dla ApLV i PLMVd stosować RT-PCR.

Objaśnienia skrótów użytych w tekście:

ELISA = Enzyme Linked ImmunoSorbent Assay = Test immunoenzymatyczny

RT = Reverse Transcription = Odwrotna Transkrypcja

PCR = Polymerase Chain Reaction = Reakcja Łańcuchowa Polimerazy

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