

Metodyka pobierania prób materiału szkółkarskiego do testów laboratoryjnych na obecność fitoplazm

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

Fitoplazma:

Fitoplazma zamierania gruszy – Candidatus Phytoplasma pyri Seemüller & Schneider [PHYPPY] syn. Pear decline phytoplasma

Termin pobierania prób

Próby liści, pędów i/lub korzeni należy pobierać od 1 sierpnia do 10 września. Dopuszcza się późniejsze pobieranie prób pod warunkiem, że nie zakończyła się wegetacja drzew, w szczególności, że nie opadły liście. Podczas pobierania prób należy zwrócić uwagę, czy nie występuje przedwczesne czerwienienie liści.

W przypadku konieczności przeprowadzenia testów **poza optymalnym terminem** (na przykład występuje podejrzenie ostrego fitoplazmatycznego zamierania gruszy we wcześniejszym terminie) należy pobrać przede wszystkim korzenie i ewentualnie dodatkowo pędy i/lub liście.

Wybór tkanki/części rośliny do testowania

Do testów na obecność fitoplazm wykorzystywane są liście (a dokładniej ogonki liściowe i nerw główny), łyko z pędów i ewentualnie korzenie (o średnicy 4-30 mm).

Obecność Fitoplazmy zamierania gruszy bada się tylko w materiale szkółkarskim z rodzaju *Pyrus L.* (grusza) i *Cydonia oblonga Mill.* (pigwa).

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). Jeżeli pobierane do badania są również korzenie to należy je umieścić w osobnej (oznakowanej) torebce. 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 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 drzew pobierana jest próba składająca się z czterech różnych pędów (z czterech stron drzewa) wraz z liśćmi.
 - b. z roślin młodszych niż 5-letnie pobierany jest jeden pęd (jeśli nie zniszczy to rośliny) i po jednym liściu z pozostałych pędów.
5. Pędy (a dokładniej część pędów od nasady do około 2/3 długości pędu) lub liście z dolnej i środkowej części pobranych pędów (od nasady do 2/3 długości pędów) będą wykorzystywane do izolacji DNA fitoplazm. Wskazane jest oddzielenie tych liści od pędów (tzw. opiórkowanie) i zachowanie do badań. Pozostałe liście należy usunąć razem z wierzchołkami pędów, co zmniejszy transpirację i wysychanie pędów.
6. Jeżeli na części badanej rośliny występują symptomy charakterystyczne dla porażenia fitoplazmami, należy z tych miejsc pobrać w pierwszym rzędzie próbki do badania laboratoryjnego.
7. Pobrane próbki należy przekazać do badań laboratoryjnych załączając także "zlecenie na wykonanie badań laboratoryjnych", którego formularz można pobrać ze strony internetowej Państwowej Inspekcji 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, korzenie, pędy)	
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 pojedynczych roślin może być bardzo trudna, lub niemożliwa. W takim przypadku należy trwale oznakować 1 metr bieżący, z którego należy pobrać do testów cztery pędy z liśćmi jako jedną próbę. Pędy (od nasady do około 2/3 długości pędów) albo liście z dolnej i środkowej części pobranych pędów będą wykorzystywane do izolacji DNA fitoplazm. Wskazane jest oddzielenie tych liści od pędów (tzw. opiórkowanie) i zachowanie do badań. Pozostałe liście z części wierzchołkowej pobranych pędów należy usunąć (można też odrzucić cały wierzchołek pędu), co zmniejszy transpirację i wysychanie pędów, z których także będzie izolowany kwas deoksynukleinowy. W przypadku stwierdzenia fitoplazm usunąć rośliny z badanego metra i po jednym metrze z każdej strony (łącznie 3 metry bieżące rzędu).

Metoda laboratoryjna weryfikacji obecności fitoplazm

Fitoplazmy są wykrywane metodami opartymi na technice PCR.

Objaśnienia skrótów użytych w tekście:

PCR = Polymerase Chain Reaction = Reakcja Łańcuchowa Polimeryzacji

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

Data publikacji (umieszczenia na stronie internetowej): grudzień 2022 r.