

Metodyka pobierania prób materiału szkółkarskiego do testów laboratoryjnych na obecność fitoplazm

Rośliny testowane: Czereśnia ptasia - *Prunus avium* L.,
Wiśnia – *Prunus cerasus* L. oraz gatunki używane jako ich podkładki

Fitoplazma: Fitoplazma Europejskiej żółtaczkii drzew pestkowych -
Candidatus Phytoplasma prunorum [PHYPPR]
syn. Apricot chlorotic leafroll phytoplasma.

Termin pobierania prób

Próby pędów, liści 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** należy pobrać przede wszystkim korzenie i ewentualnie dodatkowo pędy i/lub liście.

Wybór tkanki/części rośliny do testowania

Do testów na obecność fitoplazm można wykorzystać tylko z pędów, liście (a dokładniej ogonki liściowe i nerw główny), lub korzenie (o średnicy 4-30 mm).

Uwaga: **Obecnie (lipiec 2022) laboratoria PIORiN akceptują tylko z pędów.** W przypadku wątpliwości należy skontaktować się bezpośrednio z laboratorium przed pobieraniem próbek.

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 zacieniowanie. W przypadku wyższych temperatur (powyżej 25°C) zaleca się umieszczenie prób w tzw. lodówce turystycznej, pojemniku styropianowym albo "torbie na mrożonki" z odpowiednio odizolowanym wkładem chłodzącym. Nie dopuszczać do zamrożenia prób! Po dostarczeniu do laboratorium materiał roślinny należy umieścić w chłodzie (+4°C do +10°C). Próbki mogą być przechowywane w lodówce (chłodni) kilka do kilkunastu dni. Dopuszczalne jest przechowywanie pędów w temperaturze pokojowej do 5 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) lub liści z czterech stron drzewa po 3 liście (razem 12).
 - b. z roślin młodszych niż 5-letnie pobierany jest jeden pęd (jeśli nie zniszczy to rośliny) i ewentualnie po jednym liściu z pozostałych pędów, Jeśli jest taka możliwość należy pobrać materiał zgodnie z postępowaniem w przypadku drzew 5-letnich i starszych
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 liści od pędów (tzw. opiórkowanie) i zachowanie do badań (jeśli laboratorium akceptuje ten rodzaj materiału roślinnego - w przeciwnym przypadku liście należy wyrzucić, a do badań przekazać tylko opiórkowane pędy). Wskazane jest także usunięcie wierzchołków pędów, co zmniejszy transpirację i wysychanie pędów.
6. Jeżeli na części badanej rośliny występują symptomy charakterystyczne dla porażenia fitoplazmami, należy w pierwszej kolejności pobrać z tych miejsc 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 liści od pędów (tzw. opiórkowanie) i zachowanie do badań (jeśli ten rodzaj materiału roślinnego jest akceptowany przez laboratorium - w przeciwnym razie liście wyrzucić). Pozostałe liście z części wierzchołkowej pobranych pędów należy usunąć (można też odrzucić cały wierzchołek pędu), co zmniejszy transpirację i wysychanie pędów.

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.