

Metodyka pobierania prób materiału szkółkarskiego do oceny laboratoryjnej na obecność wirusa pierścieniowej plamistości pomidora Tomato ringspot nepovirus (ToRSV)

Rośliny testowane:
Jabłoń – *Malus* Mill.,

Wirus pierścieniowej plamistości pomidora (ToRSV) jest przedstawicielem rodzaju *Nepovirus*. Ma izometryczne cząsteczki o wielkości około 28 nm. W naturze jest przenoszony przez nicienie. ToRSV jest także przenoszony przez nasiona u kilku roślin żywicielskich i może być przenoszony z pyłkiem do nasion lub przez pyłek na zapyloną roślinę. W warunkach szklarniowych/laboratoryjnych ToRSV może być przenoszony przez inokulację mechaniczną na rośliny testowe.

Wirus występuje u żywicieli zdrewniałych i półzdrewniałych, ale może być również obecny u roślin ozdobnych i chwastów zielnych. (OEPP/EPPO, 2001).

Termin pobierania prób

W odniesieniu do roślin zdrewniałych zalecany termin testów to wczesna wiosna, koniec marca - początek kwietnia.

Wybór tkanki/części rośliny do testowania

Do testów można wykorzystywać liście, kwiatostany, pąki liściowe i pąki kwiatowe. Zalecane jest wykorzystywanie młodych liści, ale nie z wierzchołków pędów! Próby należy pobierać z fragmentu pędu do 2/3 długości od nasady.

Sposób pobierania prób

Przy pobieraniu prób należy kierować się następującymi ogólnymi zasadami:

1. Jedna próba 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 próby, 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). Próby 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. w pierwszym rzędzie należy pobrać próby liści wykazujących podejrzone symptomy. Przy pobieraniu prób z jabłoni należy zlustrować miejsce złączenia podkładki i odmiany pod kątem występowania nekroz.
7. Pobrane próby należy przekazać do badań laboratoryjnych załączając zlecenie na ich wykonanie (formularz można pobrać ze strony internetowej Państwowej Inspekcji Ochrony Roślin i Nasiennictwa www.gov.pl/piorin). Dodatkowo, należy sporządzić i przechowywać przez 3 lata kopię "Zlecenia" oraz pisemną informację zawierającą dodatkowe dane, o ile nie zostały podane w "Zleceniu":

Data pobrania próby (dd mm rrrr)	
Dane producenta: • Imię i nazwisko • Adres kontaktowy • Telefon • Adres e-mail	
Adres plantacji	

Rodzaj uprawy (gatunek, odmiana, ew. typ, wiek roślin)	
Rodzaj pobranego materiału (na przykład: 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 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 wykrywania ToRSV w jabłoniach należy stosować test ELISA lub RT-PCR.

Objaśnienia skrótów użytych w tekście:

ELISA =Enzyme Linked ImmunoSorbent Assay = Test immunoenzymatyczny

RT = Reverse Transcription = OdwrotnaTranskrypcja

PCR =Polymerase Chain Reaction = ReakcjaŁańcuchowaPolimeryzacji