

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

Rośliny testowane:

***Prunus dulcis (Miller) Webb, Prunus armeniaca L., Prunus avium L.
Prunus cerasus L., Prunus domestica L., Prunus salicina Lindley
i inne gatunki Prunus L.***

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 poraża rośliny drzewiaste i półdrewniałe, lecz może również występować w gatunkach ozdobnych oraz chwastach 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 pobrany materiał przed nadmiarem wilgoci i wysychaniem (groźniejszy jest nadmiar wilgoci niż wysychanie). W celu uniknięcia zamieszania prób, do laboratorium należy dostarczyć zamknięte torebki. Na czas zbierania i transportu, próby należy zabezpieczyć przed nadmiernym nagrzewaniem przez ich zacieniowanie. 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) przez kilka dni. Do momentu przystąpienia do badań przygotowaną próbę analityczną można zamrozić w temp. -21°C.
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. Próbę do badań stanowią liście (ewentualnie kwiatostany i pąki), pochodzące z dolnych oraz środkowych odcinków pędów. W pierwszej kolejności należy pobierać materiał symptomatyczny, charakteryzujący się objawami porażenia wirusem ToRSV, takimi jak chlorozy, nekrozy czy deformacje blaszki liściowej. Pobrane próby należy przekazać do badań laboratoryjnych załączając zlecenie na wykonanie badań laboratoryjnych (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 • e-mail	
Adres plantacji	
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 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 należy usunąć rośliny z badanego metra i po jednym metrze z każdej strony (łącznie 3 metry bieżące rzędu).

Metoda laboratoryjna weryfikacji obecności wirusów

Do wykrywania ToRSV w roślinach *Prunus* należy stosować test ELISA.

Objaśnienia skrótów użytych w tekście:

ELISA =Enzyme Linked ImmunoSorbent Assay = test immunoenzymatyczny

RT = Reverse Transcription = odwrotnatranskrypcja

PCR =Polymerase Chain Reaction = reakcja łańcuchowa polimerazy

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