

Organisation Européenne et Méditerranéenne pour la Protection des Plantes
Europejska i Śródziemnomorska Organizacja Ochrony Roślin

Normes OEPP Standardy EPPO

Protokoły diagnostyczne
dla agrofagów podlegających przepisom
Protocoles de diagnostic pour les organismes réglementés

PM 7/33



Zatwierdzanie

Standardy są zatwierdzane przez Radę EPPO. Na każdym ze standardów umieszczona jest data zatwierdzenia. W rozumieniu Artykułu II Międzynarodowej Konwencji Ochrony Roślin (IPPC), Standardy EPPO stanowią Regionalne Standardy dla członków EPPO.

Przegląd

Standardy EPPO podlegają okresowemu przeglądowi i nowelizacji. Data kolejnego przeglądu niniejszego Standardu jest ustalana przez Grupę Roboczą EPPO ds. Przepisów Fitosanitarnych.

Nowelizacja

Jeśli zaistnieje taka konieczność zostaną wydane, opatrzone kolejnym numerem i datowane, nowelizacje standardu. Na każdym ze standardów, o ile ma to zastosowanie, umieszczone są daty nowelizacji.

Dystrybucja

Standardy EPPO są przez Sekretariat EPPO dystrybuowane do władz wszystkich państw członkowskich EPPO. Egzemplarze standardów dostępne są dla wszystkich zainteresowanych wg szczegółowych zasad na indywidualną prośbę skierowaną do Sekretariatu EPPO.

Zakres

Protokoły diagnostyczne EPPO dotyczące agrofagów podlegających przepisom są przeznaczone do stosowania przez Krajowe Organizacje Ochrony Roślin (NPPO), jako ciała odpowiedzialne za stosowanie środków fitosanitarnych, w celu wykrycia i identyfikacji agrofagów podlegających przepisom w EPPO i/lub Unii Europejskiej.

W roku 1998 EPPO rozpoczęła nowy program przygotowywania protokołów diagnostycznych dla agrofagów podlegających przepisom w regionie EPPO (włączając Unię Europejską). Prace są prowadzone przez Panel Diagnostyczny EPPO oraz inne panele specjalistyczne. Celem programu jest utworzenie dla każdego agrofaga podlegającego przepisom zatwierdzonego międzynarodowego protokołu diagnostycznego. Protokoły bazują na wieloletnich doświadczeniach ekspertów EPPO. Pierwsze projekty są przygotowywane przez wyznaczonego eksperta – autora(ów). Są one pisane zgodnie z „ogólnym formatem i zawartością protokołu diagnostycznego”, przyjętymi przez Panel Diagnostyczny i dostosowanymi, o ile to konieczne, do poszczególnych agrofagów. Z reguły, protokół zaleca szczegółowy sposób wykrywania lub identyfikacji, który został uznany za lepszy (niezawodność, łatwość w użyciu itd.) od innych metod. Inne metody mogą być również wymienione ze wskazaniem ich wad i zalet. Jeśli jest stosowana metoda niewymieniona w protokole, należy to uzasadnić.

Do wszystkich Standardów EPPO dotyczących diagnostyki mają zastosowanie następujące ogólne warunki:

- Badania laboratoryjne mogą wymagać użycia odczynników lub urządzeń, które stanowią określone zagrożenie. We wszystkich przypadkach należy ściśle stosować lokalne procedury dotyczące bezpieczeństwa.
- Użycie w Standardach EPPO nazw odczynników lub wyposażenia nie oznaczają wykluczenia innych odczynników czy wyposażenia, które również mogą być przydatne.

- Procedury laboratoryjne przedstawione w protokołach mogą być dostosowane do standardów poszczególnych laboratoriów, pod warunkiem, że są one odpowiednio zwalidowane lub, że zostały włączone stosowne kontrole pozytywne i negatywne.

Materiały źródłowe¹

- EPPO/CABI (1996) Agrofagi kwarantannowe Europy, Wydanie II. CAB International, Wallingford (Wielka Brytania). [EPPO/CABI (1996) Quarantine Pests for Europe, 2nd end. CAB International, Wallingford (GB).]
- EU (2000) Dyrektywa Rady 2000/29/EC z 8 Maja 2000 r. dotycząca środków zapobiegających wprowadzeniu na teren Wspólnoty organizmów szkodliwych dla roślin lub produktów roślinnych i ich rozprzestrzenieniu w obrębie Wspólnoty, Official Journal of the European Communities L169, 1 –112. [EU (2000) Council Directive 2000/29/EC of 8 May 2000 on protective measures against the introduction into the Community of organisms harmful to plants or plant products and against their spread within the Community. Official Journal of the European Communities L169, 1–112.]
- FAO (1997) Międzynarodowa Konwencja Ochrony Roślin (tekst nowy, poprawiony). FAO, Rzym (Włochy). FAO (1997) [International Plant Protection Convention (new revised text). FAO, Rome (IT).]
- IPPC (1993) Zasady kwarantanny roślin w odniesieniu do handlu międzynarodowego ISPM nr 1. Sekretariat IPPC, FAO, Rzym (Włochy). [IPPC (1993) Principles of plant quarantine as related to international trade ISPM no. 1. IPPC Secretariat, FAO, Rome (IT).]
- IPPC (2002) Słownik terminów fitosanitarnych ISPM nr 5. Sekretariat IPPC, FAO, Rzym (Włochy). [IPPC (2002) Glossary of phytosanitary terms . ISPM no. 5. IPPC Secretariat, FAO, Rome (IT).]
- OEPP/ EPPO (2003) Standardy EPPO PM 1/2(12): EPPO Lista A1 i A2 agrofagów podlegających obowiązkowi zwalczania. Standardy EPPO PM1 Ogólne środki fitosanitarne, 5 –17. OEPP/EPPO, Paryż. [OEPP/EPPO (2003) EPPO Standards PM 1/2 (12): EPPO A1 and A2 lists of quarantine pests. EPPO Standards PM1 General phytosanitary measures, 5–17. OEPP/EPPO, Paris.]

Definicje

Agrofag podlegający przepisom: agrofag kwarantannowy lub agrofag niekwarantannowy podlegający przepisom.

Agrofag kwarantannowy: agrofag o potencjalnym znaczeniu ekonomicznym dla zagrożonego obszaru, ale jeszcze nie występujący na tym obszarze lub obecny, ale nie rozprzestrzeniony szeroko i podlegający urzędowemu zwalczaniu.

Zarys wymagań

Protokoły diagnostyczne EPPO dotyczące agrofagów podlegających przepisom dostarczają wszystkich niezbędnych informacji dotyczących określonego agrofaga w celu jego wykrycia i prawidłowej identyfikacji dokonanej przez eksperta (np. specjalisty w dziedzinie entomologii, mikologii, wirusologii, bakteriologii itp.). Każdy protokół rozpoczyna się krótką ogólną informacją dotyczącą agrofaga (jego występowania, stosunku do innych organizmów, zakresu żywicieli, uszkodzeń powodowanych na żywicielach, rozmieszczenia geograficznego oraz jego tożsamości), a następnie opisuje szczegóły dotyczące wykrywania, identyfikacji, porównania z podobnymi

¹ W nawiasach kwadratowych podana oryginalna pisownia. (przyp. tłum.)

gatunkami, wymagane w celu przeprowadzenia prawidłowej diagnozy, zawiera wykaz instytucji lub osób gdzie można uzyskać więcej informacji i opinii na temat określonego organizmu (na temat diagnozy, metody wykrywania lub ekstrakcji, metod badawczych).

Standardy EPPO z tej serii

Do tej pory zostało zatwierdzonych i opublikowanych dziewiętnaście standardów i protokołów diagnostycznych EPPO. Każdy ze standardów jest ponumerowany w sposób PM 7 / 4 (1), co oznacza, że jest to standard EPPO dotyczący środków fitosanitarnych (PM), numer serii 7 (Protokoły Diagnostyczne), w tym przypadku – standard numer 4, wersja pierwsza. Istnieją następujące standardy:

- PM 7/1(1) *Ceratocystis fagacearum*. *Biuletyn OEPP/EPPO Biuletyn* **31**, 41–44
- PM 7/2(1) *Tobacco ringspot nepovirus*. *Biuletyn OEPP/EPPO Biuletyn* **31**, 45–51
- PM 7/3(1) *Thrips palmi*. *Biuletyn OEPP/EPPO Biuletyn* **31**, 53–60
- PM 7/4(1) *Bursaphelenchus xylophilus*. *Biuletyn OEPP/EPPO Biuletyn* **31**, 61–69
- PM 7/5(1) *Nacobbus aberrans*. *Biuletyn OEPP/EPPO Biuletyn* **31**, 71–77
- PM 7/6(1) *Chrysanthemum stunt pospiviroid*. *Biuletyn OEPP/EPPO Biuletyn* **32**, 245–253
- PM 7/7(1) *Aleurocanthus spiniferus*. *Biuletyn OEPP/EPPO Biuletyn* **32**, 255–259
- PM 7/8(1) *Aleurocanthus woglumi*. *Biuletyn OEPP/EPPO Biuletyn* **32**, 261–265
- PM 7/9(1) *Cacoecimorpha pronubana*. *Biuletyn OEPP/EPPO Biuletyn* **32**, 267–275
- PM 7/10(1) *Cacyreus marshalli*. *Biuletyn OEPP/EPPO Biuletyn* **32**, 277–279
- PM 7/11(1) *Frankliniella occidentalis*. *Biuletyn OEPP/EPPO Biuletyn* **32**, 281–292
- PM 7/12(1) *Parasaissetia nigra*. *Biuletyn OEPP/EPPO Biuletyn* **32**, 293–298
- PM 7/13(1) *Trogoderma granarium*. *Biuletyn OEPP/EPPO Biuletyn* **32**, 299–310
- PM 7/14(1) *Ceratocystis fimbriata* f. sp. *platani*. *Biuletyn OEPP/EPPO Biuletyn* **33**, 249–256
- PM 7/15(1) *Ciborinia camelliae*. *Biuletyn OEPP/EPPO Biuletyn* **33**, 257–264
- PM 7/16(1) *Fusarium oxysporum* f. sp. *albedinis*. *Biuletyn OEPP/EPPO Biuletyn* **33**, 265–270
- PM 7/17(1) *Guignardia citricarpa*. *Biuletyn OEPP/EPPO Biuletyn* **33**, 271–280
- PM 7/18(1) *Monilinia fructicola*. *Biuletyn OEPP/EPPO Biuletyn* **33**, 281–288
- PM 7/19(1) *Helicoverpa armigera*. *Biuletyn OEPP/EPPO Biuletyn* **33**, 289–296

Niektóre ze standardów w niniejszej serii są wynikiem różnych projektów i konsultacji dotyczących procedur. Są one wynikiem projektu Komisji Unii Europejskiej DIAGPRO (nr SMT 4-CT 98-2252). Projekt ten obejmował cztery wyznaczone laboratoria (w Anglii, Holandii, Szkocji, Hiszpanii) i 50 laboratoriów porównawczych z wielu krajów europejskich (w obrębie i spoza Unii Europejskiej), które były zaangażowane w badania porównawcze projektu protokołów. Projekt DIAGPRO został utworzony z uwzględnieniem pełnej znajomości równoległych działań Grupy Roboczej EPPO ds. Przepisów Fitosanitarnych w zakresie tworzenia projektów protokołów diagnostycznych i obejmował agrofagi podlegające przepisom, które z tego powodu nie zostały włączone do programu EPPO. Protokoły DIAGPRO zostały zatwierdzone przez Radę EPPO jako Standardy EPPO z serii PM 7. W przyszłości będą one przedmiotem przeglądu zgodnie z procedurami EPPO na tych samych warunkach jak inne standardy z tej serii.

Protokoły diagnostyczne dotyczące agrofagów podlegających przepisom² **Protocoles de diagnostic pour les organismes réglementés**

Potato spindle tuber pospiviroid

Zakres

Standard opisuje protokół diagnostyczny dla *Potato spindle tuber pospiviroid* dla roślin w postaci „*in vitro*” i liści ziemniaka poddawanych badaniom kwarantannowym po wwozie materiału, dla badania materiału produkcyjnego wyjściowego oraz badania materiału przeznaczonego do uprawy polowej. Nie dotyczy innych przypadków (np. liści roślin uprawianych polowo, soku z bulw, nasion, roślin żywicielskich innych niż ziemniak).

Zatwierdzenie i nowelizacja

Standard jest wynikiem projektu UE DIAGPRO Projekt (SMT 4-CT98-2252) wykonanego przy współpracy laboratoriów i wzajemnego porównania wyników laboratoriów w krajach Unii Europejskiej. Zatwierdzony jako Standard EPPO w 2003-09

Wprowadzenie

Pospiviroid Potato tuber spindle tuber viroid (PSTVd) jest infekcyjnym, niekapsydowym, małym, kolistym, jednoniciowym RNA w znacznej części tworzącym strukturę drugorzędową, potrafiącym autonomicznie replikować po inokulacji rośliny żywicielskiej. Na ziemniaku powszechnie długość nukleotydów wynosi 359 (Gross *et al.*, 1978) rzadziej 358 lub 360 (Herold *et al.*, 1992; Lakshman & Tavantzis, 1993). Długość nukleotydów wynoszącą 356 znaleziono na dzikich gatunkach *Solanum* spp. (Behjatnia *et al.*, 1996) oraz pomidorze (Puchta *et al.*, 1990). Długości 356 i 357 zanotowano na roślinie pepino (*Solanum muricatum*) (Puchta *et al.*, 1990; Shamlul *et al.*, 1997). Izolaty wykazują niewielkie różnice w homologii, jednakże duże zróżnicowanie pod względem symptomów na ziemniaku.

Zakres naturalnych roślin żywicielskich jest stosunkowo wąski. Głównymi roślinami żywicielskimi są ziemniaki (*Solanum* spp. tworzące stolony i bulwy) i pomidory (Puchta *et al.*, 1990; Verhoeven & Roenhorst, 1995). PSTVd zostało także znalezione na roślinach awokado (*Persea americana*) (Querci *et al.*, 1995) i pepino (Puchta *et al.*, 1990; Shamloul *et al.*, 1997; Verhoeven & Roenhorst, 1995). W 2001 PSTVd wykryto w uprawach szklarniowych pomidorów w Nowej Zelandii (Elliot *et al.*, 2001). Wiroid ten posiada szeroki zakres doświadczalnych roślin żywicielskich infekując 94 gatunki w 31 rodzinach (Jeffries, 1998).

PSTVd jest jedynym znanym wiroidem infekującym uprawne gatunki ziemniaka, znany jest również Mexican papita viroid infekujący dzikie gatunki ziemniaka *Solanum cardiophyllum* (papita guera, cimantli) (Martinez-Soriano *et al.*, 1996). Doświadczalnie wiadomo, iż inne gatunki wiroidów

² Ryciny w niniejszym standardzie oznaczone „Web Fig.” zostały opublikowane na stronie internetowej EPPO www.eppo.org.

rodzaju *Pospiviroid* np. *Tomato chlorotic dwarf viroid* (Singh *et al.*, 1999), *Columnnea latent viroid* (Hammond *et al.*, 1989) i *Tomato planta macho viroid* (Galindo *et al.*, 1982) wykazują zdolność infekowania upraw ziemniaka. Fakt, czy wiroidy te zostaną uznane jako porażające ziemniaki może zależeć od bliskości upraw ziemniaków w stosunku do naturalnych roślin żywicielskich w uprawach polowych, szklarniowych lub w laboratorium kultur tkankowych i zastosowanych środków zaradczych zapobiegających pojawieniu się infekcji krzyżowych.

PSTVd porażające ziemniaki znaleziono w Afryce (Nigeria), Azji (Afganistan, Chiny, Indie) częściowo we Wschodniej Europie obejmującej były Związek Radziecki, Północnej Ameryce (EPPO/CABI, 1997) i Centralnej Ameryce (Badilla, 1999). Systematyczne badanie przez okres ponad 10-20 lat w rzeczywistości wyeliminowało lub widocznie obniżyło występowanie PSTVd w materiale nasiennym i z programu produkcji towarowej w Północnej Ameryce oraz częściowo we Wschodniej Europie. Ostatnio wyizolowano PSTVd z dzikiej odmiany *Solanum* spp. rosnącej na północnym terytorium Australii (Behjatnia *et al.*, 1996)

PSTVd jest rozprzestrzeniany z nasionami (0-100% nasion może być zainfekowanych) (Fernow *et al.*, 1970; Singh, 1970) poprzez zainfekowany pyłek lub zalążki (Grasmick & Slack, 1986; Singh *et al.*, 1992) oraz przez kontakt, głównie przez maszyny polowe. Eksperymentalnie zaobserwowano nabywanie i przenoszenie PSTVd przez *Myzus persicae* z roślin jednocześnie zainfekowanych przez *Potato leafroll polerovirus* (Salazar *et al.*, 1995; Querci *et al.*, 1996; Syller & Marczewski, 1996; Querci *et al.*, 1997), w małym procencie przez rośliny (Singh & Kurz, 1997).

Początkowo myślano, że Tomato bunchy top jest powodowany przez PSTVd. Obecnie wiadomo, iż jest wywoływane przez innego wiroida *Tomato bunchy top viroid*.

Tożsamość

Nazwa: *Potato spindle tuber pospiviroid*

Synonimy: potato spindle tuber viroid, potato gothic virus

Akronim: PSTVd

Stanowisko taksonomiczne: Rodzina Pospiviroidae, Rodzaj *Pospiviroid*

Komputerowy kod Bayera: PSTVD0

Kategoria fitosanitarna: EPPO lista A2 list nr 97, UE Załącznik 1 /A1

Wykrywanie

Objawy

Na ziemniaku, objawy PSTVd zależą od szczepu, rodzaju uprawy, warunków środowiskowych i mogą wykazywać zróżnicowane symptomy od silnych (redukcją wielkości rośliny, widzianym z góry, pionowym ustawieniem liści i ich skrzyżowaniem zgodnym z ruchem wskazówek zegara, ciemnozielonym zabarwieniem liści i marszczeniem; Web zdj. 1), poprzez łagodne, bądź wykazywać infekcję bezobjawową (Web zdj. 2.). Bulwy mogą wykazywać redukcję wielkości, zniekształcenie, wrzecionowatość lub przypominać kształtem ciężarki. Mogą także posiadać wyraźne, wystające i równomiernie rozłożone oczka (Pfanenstiel & Slack, 1980) (Web zdj. 3, 4 i 5).

Identyfikacja

Warunki uprawy roślin i program badawczy

Ponieważ koncentracja wiroida zależy od temperatury i ilości światła, rośliny „*in vitro*” i rośliny szklarniowe przeznaczone do badań powinny być uprawiane w temperaturze nie niższej niż 18°C (temperatura preferowana wyższa niż 20°C) i w przynajmniej 16-h fotoperiodzie. Rośliny „*in*

in vitro” należy testować po przynajmniej 4-6 tygodniach uprawy w stadium, kiedy łodygi osiągną nie mniej niż 5 cm długości. Powinno pobierać się całą łodygę. Rośliny „*in vitro*” dające negatywne wyniki badania powinny być przebadane po uprawie w szklarni tak szybko, jak tylko się przyjmą, lecz przed kwitnieniem i produkcją pyłku. Próbkę należy pobierać z w pełni wykształconych listków wierzchołkowej części łodygi.

Dla kwarantanny po wwozie materiału lub dla systemu badania materiału produkcyjnego wyjściowego nie opartego na mikrorozmnażaniu, małe szklarniowe rośliny powinny być przetestowane tak szybko, jak tylko się przyjmą i ponownie, kiedy osiągną około 25 cm wysokości w okresie kwitnienia lub krótko przed kwitnieniem. W programie badawczym należy postępować wg określonego schematu (Ryc. 6 i 7).

Metody badawcze

Opisana w protokole ekstrakcja RNA oraz metody wykrywania zostały wybrane na drodze badań międzylaboratoryjnych dotyczących metod obecnie używanych w krajach UE i poza jej obszarem (EU 1997; OEPP/EPPO, 1984, 1998), objętych międzylaboratoryjną walidacją³. Pozostałe metody mogą być użyte, o ile zapewni się, że mają szeroki zakres specyficzności (powinny wykryć wszystkie izolaty PSTVd, najlepiej inne *Pospiviroid* spp. mogące infekować ziemniaki) oraz zostaną spełnione wymagania kontroli jakości opisane w części kontrola jakości.

W badaniach kwarantannowych oraz materiału produkcyjnego wyjściowego schemat decyzyjny (Ryc. 6) przewiduje dwie metody wstępnego wykrywania PSTVd w próbkach: Return-PAGE (elektroforeza w żelu poliakrylamidowym) z barwieniem srebrem (R-PAGE, Załącznik 1) oraz znakowana Digoxigeniną sonda RNA (DIG probe, Załącznik 2). Druga, najlepiej inna metoda powinna być użyta do potwierdzenia pozytywnego wykrycia (druga metoda badawcza). R-PAGE, DIG Probe lub RT-PCR (Załącznik 3) mogą zostać użyte jako druga metoda. TaqMan (Załącznik 4) również może być użyty.

Do badań próbek oczkowych po zbiorze schemat decyzyjny (Ryc. 7) zazwyczaj wymaga użycia R-PAGE lub DIG Probe. Jednakże zastosowany może być także RT-PCR lub TaqMan, o ile startery (sondy) uznano jako odpowiednie do wykrywania wiroidów (np. poszukiwanie będące wynikiem pojawu ogniska). Druga, najlepiej inna metoda powinna być użyta do potwierdzenia pozytywnego wykrycia (druga metoda badawcza) wybrana spośród R-PAGE, DIG Probe lub RT-PCR lub TaqMan.

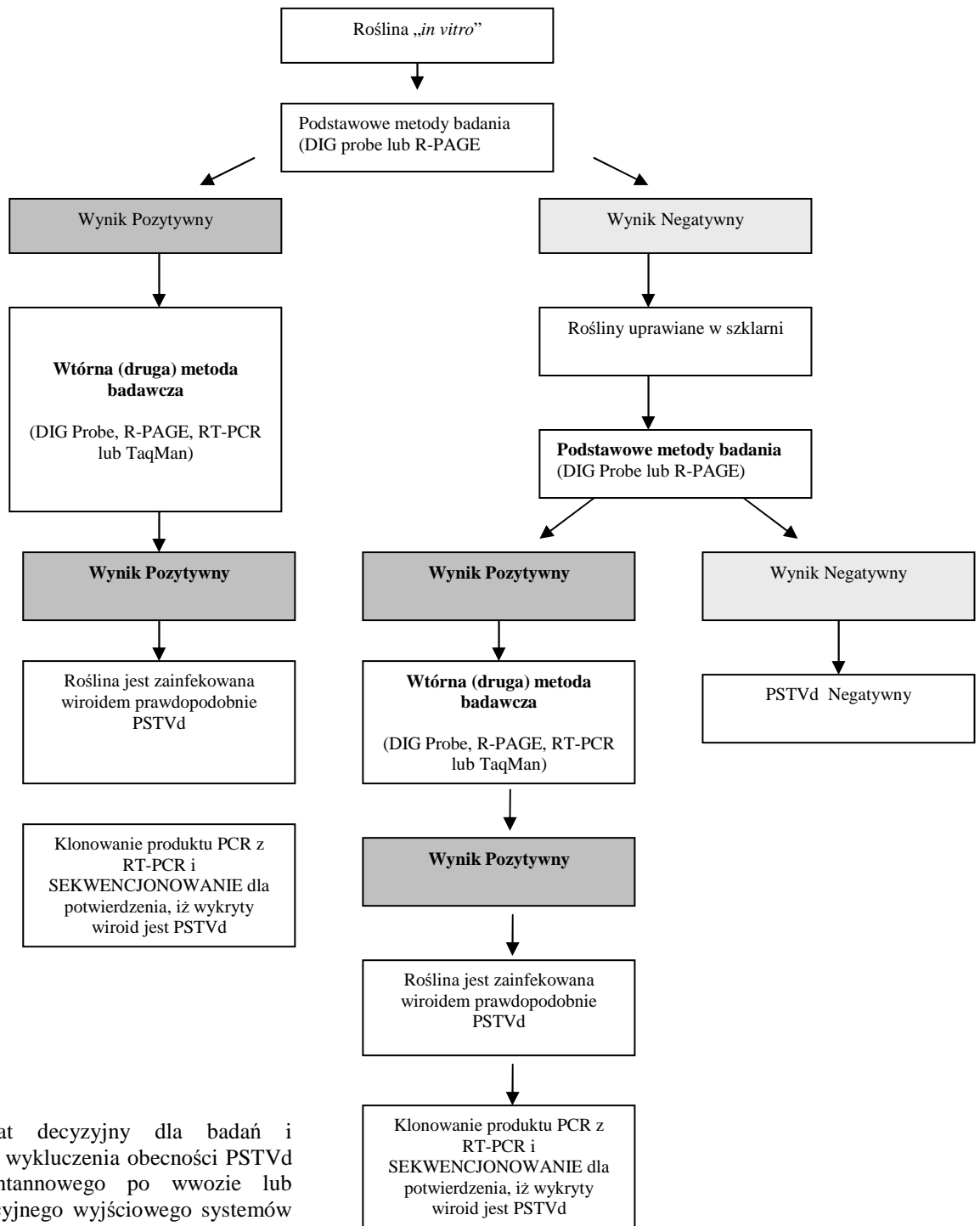
Specyficzność i czułość metod badawczych

Żadna z opisanych metod nie identyfikuje specyficznie PSTVd. Do tego celu wiroid musi być sekwencjonowany i przeanalizowany. Czułość opisana dla każdej metody oparta jest na wynikach badań międzylaboratoryjnych. Pierwsza liczba jest najmniejszą ilością zainfekowanej tkanki wykrytą przez najlepsze laboratorium do poziomu minimum 0.0155 mg (jest to odpowiednik około 17 pg PSTVd). Druga liczba jest najmniejszą ilością tkanki liścia wykrywaną przez większość laboratoriów.

³ Pierwsze badania międzylaboratoryjne składały się z 2 zestawów próbek, jeden z zestawów nie wymagał dalszej ekstrakcji, drugi wymagał dodatkowej ekstrakcji RNA z liści. Każdy zestaw próbek składał się z RNA pochodzącego z 8 różnych stężeń tkanki zainfekowanej PSTVd + 2 kontroli negatywnych. Użyty izolant pochodził z Rosji (358 nt) z 98% podobieństwem do skatalogowanego M25199 (szczep *Solanum commersoni*) (Wezenbeek et al., 1982). Pomimo tego, iż metody z zastosowaniem sondy RNA znakowanej ³²P, dają świetne rezultaty stwierdzono, iż nie są one odpowiednie do badań walidacyjnych międzylaboratoryjnych ze względu na zdrowie i bezpieczeństwo pracy z ³²P. Pomimo, iż metoda TaqMan nie jest szeroko dostępna, została włączona ze względu na jej potencjał dla prac badawczych oraz bezpośrednie badania bulw (co nie jest przedmiotem obecnego projektu). Walidacja międzylaboratoryjna została opisana dla pierwszego badania międzylaboratoryjnego, jedynie dla RNA pochodzącego z 11 różnych koncentracji tkanki zainfekowanej PSTVd + 4 kontroli negatywnych.

Podstawowe (wstępne) metody badania

Metoda R-PAGE wykrywa większość wiroidów. Jest najmniej czułą z metod (1mg; 5mg). Dig Probe (sonda), bazująca na całej długości monomeru PSTVd jest specyficzna dla pospiviroidów. Oprócz PSTVd, sonda (probe) może także reagować z *Chrysanthemum stunt viroid* i *Citrus exocortis viroid* (A. Harness, Agdia Inc, US, pers. comm) oraz silnie wykrywa *Tomato chlorotic stunt pospiviroid* (Singh *et al.*, 1999). Może ona hybrydować z innymi *Pospiviroid* spp. Metoda powinna wykrywać wszystkie izolaty PSTVd. Jest ona stabilna, wiarygodna i czuła (0.0155 mg; 0.50 mg).



Ryc. 6 Schemat decyzyjny dla badań i potwierdzenia lub wykluczenia obecności PSTVd materiału kwarantannowego po wwozie lub materiału produkcyjnego wyjściowego systemów produkcji opartych na materiale mikrorozmnożeniowym.

Wtórne metody badawcze

W metodzie RT-PCR sekwencje starterów prawdopodobnie wykrywają większość izolatów PSTVd i innych *Pospiviroid* spp. zapisanych obecnie w bazach danych sekwencji (Tabela 1). Metoda jest bardzo czuła (0.0155 mg; 0.062 mg), jednak może pominąć niektóre izolaty PSTVd i inne blisko spokrewnione wiroidy. Istnieje ryzyko wystąpienia fałszywie negatywnych wyników. Produkt PCR może zostać zsekwencjonowany w celu identyfikacji PSTVd. Metoda jest rekomendowana jedynie jako wstępna metoda badawcza, gdy badanie wykonywane jest dla izolatów, których sekwencje starterów/sond są znane (np. poszukiwanie jako wynik pojawu).

W TaqMan sekwencje starterów prawdopodobnie wykrywają większość izolatów PSTVd i niektórych *Pospiviroid* spp. zapisanych w bazach danych sekwencji (Tabela 1). Jest to prawdopodobnie najczulsza z metod przedstawionych w Protokole (0.0155 mg, 0.0155 mg), ale ponieważ nie ma pewności czy wykrywa wszystkie izolaty PSTVd, TaqMan nie jest polecany jako wstępna metoda badawcza dla materiału kwarantannowego po wwozie lub materiału produkcyjnego wyjściowego. Ponadto, mogą być wykrywane inne *Pospiviroid* spp.

Metoda ta jest rekomendowana jedynie jako wstępna metoda badawcza, gdy badanie wykonywane jest dla izolatów, których sekwencje starterów/sond są znane (np. poszukiwanie jako wynik pojawu).

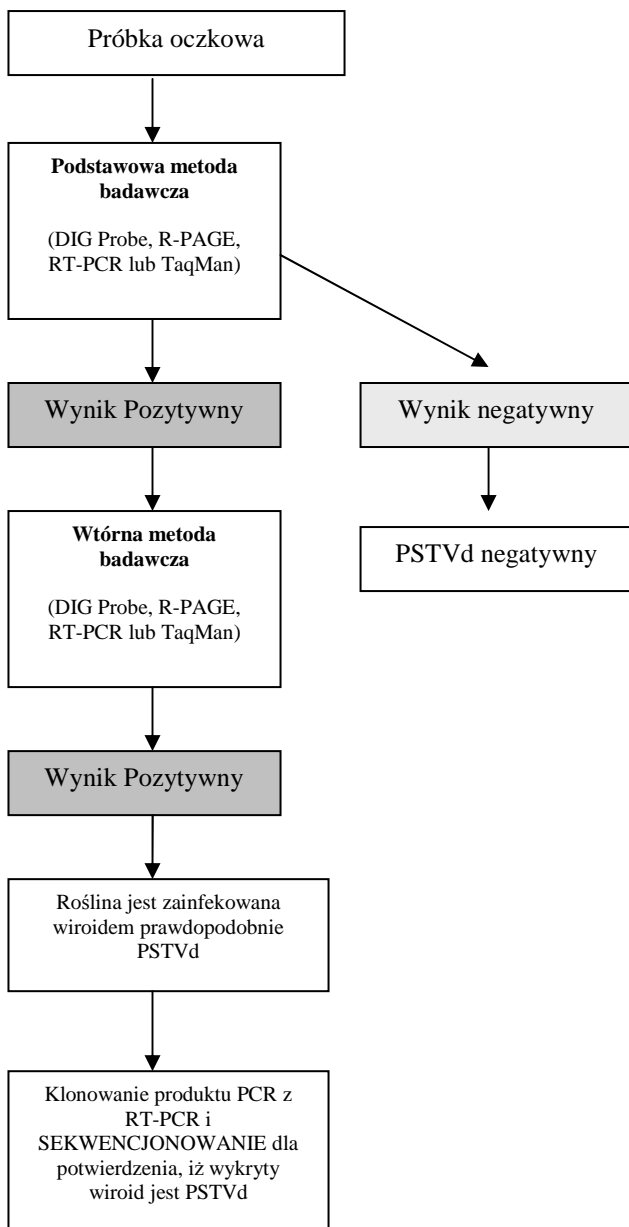
Ekstrakcja próbek

Zalecana jest raczej ekstrakcja przez rozdrobnienie (np. za pomocą moździerza), niż wyciskanie soku (np. prasy serologicznej Pollahne), ponieważ poprzez wyciskanie można uzyskać niższą koncentrację PSTVd. Jednakże, podczas badań dużej liczby próbek użycie prasy serologicznej może okazać się bardziej odpowiednie. Jeśli stosowany jest sok konieczne jest sprawdzenie, czy wiroid jest nadal wykrywany.

Kontrola jakości

Kontrole

Na ogół powinny być używane kontrole negatywne. Aby skontrolować jakość przygotowania próbki i skuteczność wykrywania podczas ekstrakcji RNA powinno używać się jako standardu pozytywnej dla PSTVd kontroli ziemniaka w ilości 1:10 tkanki liścia na próbkę. Przykładowo, gdy nie przygotowuje się próbek zbiorczych z różnych roślin, dla 200mg próbki używanej podczas ekstrakcji RNA powinno być użyte 20 mg zainfekowanej tkanki + 180 mg zdrowej tkanki jako kontrola pozytywna. Jeśli pozytywna kontrola nie jest wykrywana, badanie powinno być powtórzone. Kontrola pozytywna powinna być uprawiana w takich samych warunkach, jak pozostałe rośliny przeznaczone do badania. Dla wszystkich metod opisanych w tym protokole z wyjątkiem R-PAGE, powinno być możliwe zastosowanie próbek zbiorczych 1:10. Kontrola pozytywna powinna być odpowiednio przystosowana np. 10 partii 20 mg próbki zbiorczej dla ekstrakcji RNA, 2 mg zainfekowanej próbki + 198 mg zdrowej tkanki roślinnej. Jeśli próbka zbiorcza nie jest wykrywana, badanie powinno być powtórzone lub ilość próbek zbiorczych zredukowana, aż do osiągnięcia wiarygodnego wykrycia. Dla RT-PCR i TaqMan może być zastosowana dodatkowa „wewnętrzna kontrola” we wstępnym badaniu. Nie jest to konieczne, gdy RT-PCR i TaqMan są użyte do potwierdzenia, ponieważ błędne wykrycie powinno skończyć się dalszym badaniem.



Ryc.7 Schemat decyzyjny badań, potwierdzenia lub wykluczenia obecności PSTVd dla próbek oczkowych po zbiorze przeprowadzanych jako część badań w przypadku, gdy badanie wykonywane jest dla izolatów, których sekwencje starterów/sond są znane i używane w RT-PCR i TaqMan.

Potwierdzanie pozytywnych wyników

Niewykorzystany nadmiar ekstraktu RNA oraz wszystkie rośliny, z których ekstrakt pochodził (subkultury w przypadku roślin „*in vitro*”) powinny być przechowywane, aż do potwierdzenia wyniku lub wykluczenia. Do potwierdzenia materiał powinien być pobrany ponownie. Jeśli próbka była zbiorcza, każda roślina powinna być przebadana oddzielnie, aby zlokalizować zainfekowaną roślinę. Druga metoda powinna być użyta do potwierdzenia, iż próbka jest porażona wiroidem (najprawdopodobniej PSTVd). Do specyficznej identyfikacji produkt PCR z reakcji RT-PCR powinien być zsekwencjonowany i porównany z sekwencjami bazy danych. Jeśli próbki nie można potwierdzić jako pozytywnej, powinna być pobrana inna próbka na wypadek błędów próbobrania.

Możliwość pomyłki z podobnymi gatunkami

Patrz powyżej „Specyficzność metod badawczych”.

Wymagania dla pozytywnej diagnozy

Powinno postępować się według procedury wykrywania i identyfikacji opisanej w Protokole i Schemacie decyzyjnym Ryc. 6 lub 7.

Raport z badania

Sprawozdanie z wykonania protokołu powinno zawierać:

- informację i dokumentację pochodzenia zainfekowanego materiału
- rodzaj materiału w którym dokonano wykrycia np. rośliny „*in vitro*”, rośliny szklarniowe uprawiane z bulw, sadzeniaki
- powód dla którego przebadano materiał np. kwarantanna po wwozie materiału, certyfikacja, poszukiwania
- metodę użytą we wstępnym wykryciu i identyfikacji
- uzyskane wyniki wg rekomendowanych procedur powinny posiadać dowody z dokumentów np. fotografie żeli (np. R-PAGE, RT-PCR), membranę lub fotografię (DIG Probe) lub wydruki (TaqMan), zawierające wyniki dla właściwej negatywnej i pozytywnej kontroli
- właściwe komentarze co do pewności lub niepewności identyfikacji.

Należy także sprawozdać, jeśli uzyskano informacje o sekwencji, aby dowieść czy jest to PSTVd, czy inny wiroid, który może infekować ziemniaki.

Tabela 1. Wyniki wyszukiwania BLASTA homologicznych starterów/sekwencji pospiviroidów dla RT-PCR i TaqMan: prawdopodobieństwo wykrycia oparte na liczbie i pozycji.

<i>Pospiviroid</i>	Ilość sekwencji	RT-PCR	TaqMan
<i>Chrysanthemum stunt viroid</i>	15	Nie wykrywa	Nie wykrywa
<i>Citrus exocortis viroid</i>	40	Nie wykrywa	Nie wykrywa

<i>Columnnea latent viroid</i> (Indian tomato bunchy top viroid)	1	Nie wykrywa	Nie wykrywa
<i>Iresine viroid</i>	1	Nie wykrywa	Nie wykrywa
<i>Mexican papita viroid</i>	9	Wykrywa wszystkie	Prawdopodobnie wykrywa, w zależności od izolatu (kilka rozbieżności w niekrytycznych pozycjach)
<i>Potato spindle tuber viroid</i>	71	Wykrywa 68 1 prawdopodobnie niewykrywany 1 (infekcyjny replikon RNA wiroida rozwijający się z pochodzącego z „ <i>in vitro</i> ” nieinfekcyjnego wiroida mutanta delekcji niewykrywany 1 (szczep <i>S. commersonii</i>)	Wykrywa 59 6: 1 niesparowanej zasady 5: 2 niesparowanych zasad 1: 3 niesparowanych zasad Z 12-stu sekwencji z niesparowanymi zasadami, 3 są z dzikich <i>Solanum</i> spp. Badania powinny nadal wykrywać wszystkie warianty, kiedy niesparowane zasady nie są w pozycjach krytycznych
<i>Tomato apical stunt viroid</i>	4	Nie wykrywa	Nie wykrywa
<i>Tomato chlorotic dwarf viroid</i>	1	Wykrywa	Prawdopodobnie wykrywa (3 niesparowane zasady w niekrytycznych pozycjach)
<i>Tomato planta macho viroid</i>	1	Nie wykrywa	Prawdopodobnie wykrywa (3 niesparowane zasady)

Informacje dodatkowe

Dalsze informacje można uzyskać od: C. Jeffries (E-mail: colin.jeffries@sasa.gsi.gov.uk) lub T. James (E-mail: tina.james@sasa.gsi.gov.uk), Scottish Agricultural Science Agency, Edinburgh, EH 12 8NJ, (GB).

Podziękowania

W oryginale protokół ten został napisany przez: C. Jeffries i T. James Scottish Agricultural Science Agency, Edinburgh, EH 12 8NJ, United Kingdom.

Materiały źródłowe⁴

- Badilla R (1999) First report of potato spindle tuber viroid in Costa Rica. *Plant Disease* 83, 1072.
- Behjatnia SAA, Dry IB, Krake LR, Conde BD, Connolly MI, Randles JW & Rezaian MA (1996) New potato spindle tuber viroid and tomato leaf curl geminivirus strains from a wild *Solanum* sp. *Phytopathology* 86, 880–886.
- Elliot DR, Alexander BJR, Smales TE, Tang Z & Clover GRG (2001) First report of Potato spindle tuber viroid in tomato in New Zealand. *Plant Disease* 85, 1027.
- EPPO/CABI (1997) Potato spindle tuber viroid. *Quarantine Pests for Europe* (2nd edn), pp. 1305–1310. CAB International, Wallingford (GB).

⁴ Została zachowana oryginalna pisownia. (przyp. tłum.)

- EU (1997) Commission Directive 97/46/EC of 25 July 1997 amending Directive 95/44/EC establishing the conditions under which certain harmful organisms, plants, plant products and other objects listed in Annexes I to V to Council Directive 77/93/EEC may be introduced into or moved within the Community or certain protected zones thereof, for trial or scientific purposes and for work on varietal selections. *Official Journal of the European Communities* L204, 43–46.
- Fernow KH, Peterson LC & Plaisted RL (1970) Spindle tuber virus in seeds and pollen of infected plants. *American Potato Journal* 47, 75–80.
- Galindo JA, Smith DR & Diener TO (1982) Etiology of Planta Macho, a viroid disease of potato. *Plant Disease* 72, 49–54.
- Grasmick ME & Slack SA (1985) Symptom expression enhanced and low concentrations of potato spindle tuber viroid amplified in tomato with high light intensity and temperature. *Plant Disease* 69, 49–51.
- Gross HJ, Domdey H, Lossow C, Jank P, Raba M, Alberty H & Sanger HL (1978) Nucleotide sequence and secondary structure of potato spindle tuber viroid. *Nature* 273, 203–208.
- Hammond R, Smith DR & Diener TO (1989) Nucleotide sequence and proposed secondary structure of Columnea latent viroid: a natural mosaic of viroid sequences. *Nucleic Acids Research* 17, 10083–10094.
- Herold T, Haas B, Singh RP, Boucher A & Sanger HL (1992) Sequence analysis of five new field isolates demonstrates that the chain length of potato spindle tuber viroid (PSTVd) is not strictly conserved but is variable as in other viroids. *Plant Molecular Biology* 19, 329–333.
- Jeffries C (1998) FAO/IPGRI Technical Guidelines for the Safe Movement of Germplasm, No. 19. Potato. FAO, Rome (IT) (ISBN 92-9043-390-6).
- Kolchinsky A, Kolesnikova M & Ananiev E (1991) 'Portraying' of plant genomes using polymerase chain reaction amplification of ribosomal 5S genes. *Genome* 34, 1028–1031.
- Lakshman DK & Tavantzis SM (1993) Primary and secondary structure of a 360-nucleotide isolate of potato spindle tuber viroid. *Archives of Virology* 128, 319–331.
- Lohdi MAYeGN, Weeden NF & Reisch BI (1994) *Plant Molecular Biology Reporter* 12, 6–13.
- Martinez-Soriano JP, Galindo-Alonso J, Maroon CJM, Yucel I, Smith DR & Diener TO (1996) Mexican papita viroid: putative ancestor of crop viroids. *Proceedings National Academy of Sciences USA* 93, 9397–9401.
- Mumford RA, Walsh K & Boonham N (2000) A comparison of Molecular methods for the routine detection of viroids. *Bulletin OEPP/EPPO Bulletin* 30, 431–435.
- OEPP/EPPO (1984) EPPO Standards PM 3/21. Potato viruses (non-European) and potato spindle tuber. *Bulletin OEPP/EPPO Bulletin* 14, 73–76.
- OEPP/EPPO (1999) EPPO Standards PM 4/28 Certification Schemes. Seed Potatoes. *Bulletin OEPP/EPPO Bulletin* 29, 253–267.
- Pfannenstiel MA & Slack SA (1980) Response of potato cultivars to infection by the potato spindle tuber viroid. *Phytopathology* 70, 922–926.
- Podleckis EV, Hammond RW, Hurtt SS & Hadidi A (1993) Chemiluminescent detection of potato and pome fruit viroids by digoxigenin-labelled dot blot and tissue blot hybridization. *Journal of Virological Methods* 43, 147–158.
- Puchta H, Herold T, Verhoeven K, Roenhorst A, Ramm K, Schmidt-Puchta W & Sanger HL (1990) A new strain of potato spindle tuber viroid (PSTVd-N) exhibits major sequence differences as compared to all other strains sequenced so far. *Plant Molecular Biology* 15, 509–511.
- Querci M, Owens RA, Bartolini I, Lazarte V & Salazar LF (1997) Evidence for heterologous encapsidation of potato spindle tuber viroid in particles of potato leafroll virus. *Journal of General Virology* 78, 1207–1211.
- Querci M, Owens RA & Salazar LF (1996) Encapsidation of potato spindle tuber viroid (PSTVd) by potato leafroll virus particles is responsible for aphid transmission of PSTVd. 13th Triennial Conference of the European Association for Potato Research, pp. 312–313. EAPR, Veldhoven (NL).

- Querci M, Owens RA, Vargas C & Salazar LF (1995) Detection of potato spindle tuber viroid in avocado growing in Peru. *Plant Disease* 79, 196–202.
- Reisner D (1987) Structure formation (physical-chemical properties). In: *The Viroids* (Ed. Diener TO), pp. 63–98. Plenum Press, New York (US).
- Salazar LF, Querci M, Bartolini I & Lazarte V (1995) Aphid transmission of potato spindle tuber viroid assisted by potato leafroll virus. *Fitopatologia* 30, 56–58.
- Seigner L (2000) [Virus detection using Polymerase chain reaction (PCR).]. *Gesunde Pflanzen* 52, 205–211 (in German).
- Shamloul AM, Hadidi A, Zhu SF, Singh RP & Sagredo B (1997) Sensitive detection of potato spindle tuber viroid using RT-PCR and identification of a viroid variant naturally infecting pepino plants. *Canadian Journal of Plant Pathology* 19, 89–96.
- Singh RP (1970) Seed transmission of potato spindle tuber virus in tomato and potato. *American Potato Journal* 47, 225–227.
- Singh RP, Boucher A & Somerville TH (1992) Detection of potato spindle tuber viroid in the pollen and various parts of potato plant pollinated with viroid-infected pollen. *Plant Disease* 6, 951–953.
- Singh RP & Kurz J (1997) RT-PCR analysis of PSTVd aphid transmission in association with PLRV. *Canadian Journal of Plant Pathology* 19, 418–424.
- Singh RP, Nie X & Singh M (1999) Tomato chlorotic dwarf viroid: an evolutionary link in the origin of pospiviroids. *Journal of General Virology* 80, 2823–2828.
- Syller J & Marczewski W (1996) Transmission of potato spindle tuber viroid (PSTVd) by aphids. 13th Triennial Conference of the European Association for Potato Research, pp. 306–307. EAPR, Veldhoven (NL).
- van Wezenbeek P, Vos P, van Boom J & van Kammen A (1982) Molecular cloning and characterization of a complete DNA copy of potato spindle tuber viroid RNA. *Nucleic Acids Research* 10, 7947–7957.
- Verhoeven JTJ & Roenhorst JW (1995) Virological risks accompanying the increased interest in pepino (*Solanum muricatum*). *Proceedings of the 8th Conference on Virus Diseases of Vegetables*, pp. 109–112. Prague (CZ).
- Weidemann HL & Buchta U (1998) A simple and rapid method for the detection of potato spindle tuber viroid (PSTVd) by RT-PCR. *Potato Research* 41, 1– 8.

Załącznik 1. Sonda RNA znakowana Digoxigeniną⁵

Wstęp

Digoxigenina (DIG) jest systemem znakowania nieradioaktywnego (Podleckis *et al.*, 1993). Jest bezpieczny dla zdrowia, znakowane sondy mogą być przechowywane przynajmniej rok, a roztwory do hybrydyzacji mogą być kilkakrotnie używane. Niespecyficzna sonda PSTV bazuje na pełnej długości monomeru i może hybrydyzować z innymi Pospiviroidami najbardziej z (*Tomato chlorotic stunt viroid* (Singh *et al.*, 1999)) i w mniejszym stopniu z (*Chrysanthemum stunt viroid*, *Citrus exocortis viroid* (A. Harness, Agdia, pers.comm)) w zależności od podobieństwa sekwencji. Jeśli to konieczne, możliwe są konsultacje z Roche DIG online manual na http://biochem.roche.com/prodinfo_fst.htm?prod_inf/manuals/dig_man/dig_toc.htm

Materiały

Bufor Ames: woda destylowana 160.0 ml; NaCl 11.7 g; MgCl₂ 0.4 g; octan sodu 8.21 g; etanol 40.0 ml; sodium dodecyl sulphate (SDS) 6.0 g. Jako pierwszy rozpuścić NaCl, następnie pozostałe sole, etanol i jako kolejny SDS. Ustalić pH 6.0 za pomocą HCl lub NaOH.

⁵ Oparte na Protokole dostarczonym przez Agdia Inc. ,30380 County Road 6, Elkhart, Indiana 46514 (US).

20 x SSC: NaCl 173.3 g; cytrynian sodu 88.2 g; Rozpuścić w 800 ml wody destylowanej. Ustalić pH 7.0 za pomocą 10 M NaOH, uzupełnić objętość do 1000 ml wodą destylowaną i autoklawować (lub użyć Roche Molecular Biochemicals nr kat. 1666 681).

10% SDS: sodium dodecyl sulphate (SDS) 50 g w 500 ml wody destylowanej.

Bufor do płukania 1 (Wash buffer1): 20 x SSC 100 ml; 10% SDS 10 ml; uzupełnić do 1000 ml wodą destylowaną.

Bufor do płukania 2 (Wash buffer2): 20 x SSC 5 ml; 10% SDS 10 ml; uzupełnić do 1000 ml wodą destylowaną.

RNaza A: przygotować 10 mg/ml roztwór RNazy A w 10 mM Tris-HCl pH 7.5, 15 mM NaCl. Przechowywać w – 20°C. Przed użyciem roztwór lub jego część ogrzać do 100°C przez 15 minut i pozostawić do ostygnięcia. Potraktowaną wysoką temperaturą RNazę przechowywać w 4 °C.

Materiały Roche Molecular Biochemicals: G Easy

Hyb bufor (Numer kat. 1603 558); DIG Luminescent Detection Kit, transportowany w suchym lodzie (Numer kat. 1363 514); DIG Wash and Block Bufor Set (Numer kat. 1585 762); Hybrydyzacyjne torebki (Numer kat. 1666 649).

Używać tylko w przypadku łaźni wodnej z mieszadłem. Jeśli używasz hybrydyzacyjnego pieca, używaj hybrydyzacyjnych probówek. Jeśli używasz inkubatora z mieszadłem, zamiast probówek możesz użyć małe naczynka.

Wielkość próbki oraz kontrole pozytywne i negatywne

Do badania pojedynczej rośliny użyć 200 mg tkanki roślinnej liścia. Jako pozytywną kontrolę użyć nie więcej, niż 20 mg zainfekowanej PSTVd tkanki na 180 mg tkanki zdrowej. Badanie jest wystarczająco czułe, jeśli każdorazowo wykrywany jest taki poziom. W przypadku nie wykrycia takiego poziomu, badanie powinno być powtórzone. Test jest wystarczająco czuły i pozwala na próbki zbiorcze z 10 roślin (przynajmniej 20 mg tkanki na roślinę). Jako pozytywną kontrolę użyć nie więcej, niż 2 mg zainfekowanej tkanki PSTVd, dodanej do 198 mg tkanki zdrowej. Należy użyć dla każdej partii ekstrakcji i nakładać na każdą membranę jedną lub więcej kontroli pozytywnych. Jeśli próbki są poddawane ekstrakcji w oddzielnych dniach i przechowywane, kontrola pozytywna powinna być przygotowana każdego dnia ekstrakcji. Kontrola negatywna również powinna być zastosowana. Kontrolę pozytywną przygotowywać jako ostatnią w celu uniknięcia możliwej przez chlapięcie kontaminacji poszczególnych próbek.

Ekstrakcja próbek

Zmiażdżyć tkankę próbki w małej ilości buforu Ames. Dodać pozostałą ilość buforu do uzyskania stężenia w proporcji 1:1,5 (wagi próbki: objętości buforu), np. 200 mg tkanki na 300 µl buforu Ames. Przenieść zawartość do 1,5 ml probówki. Probówki zamknąć i inkubować przez 15 minut w 37°C. Dodać równą objętość przeznaczzonego do badania chloroformu do każdej probówki, zamknąć dokładnie wieczka, wymieszać zawartość poprzez potrząsanie, zworteksowanie lub obracanie do uzyskania emulsji. Krótco zwirować probówki do rozdzielenia zawartości na warstwę wodną (górze) i chloroformu (dół), lub umieścić probówki w lodówce (4 °C) do rozdziału przez noc. Warstwy powinny być dokładnie rozdzielone przed dalszą obróbką, ponieważ materiał z interfazy może dawać fałszywie pozytywne wyniki.

Nakładanie próbek

Napipetować 3 µl górnej warstwy na membranę (Agdia), wysuszyć membranę w temperaturze pokojowej. Ekstrakty próbek przechowywać w 4 °C. Jeśli konieczne jest ponowne przebadanie którejkolwiek próbki można użyć zachowany ekstrakt. Probki w chloroformie mogą być przechowywane i nakładane przynajmniej przez kilka miesięcy, wysuszona membrana może być przechowywana w suchym miejscu przez kilka lat bez wpływu na uzyskane wyniki.

Hybrydyzacja/Wykrywanie

Mając ustalony optymalny czas ekspozycji w świetle UV, nanieść na wysuszonych w powietrzu membranach nasączone 20 x SSC papierowe filtry w „UV-crosslinkerze” (lub w transiluminatorze typu „light box”, umieścić suchą membranę do dołu i wystawić na działanie światła UV lub suszyć membranę w temperaturze 80 °C w piecu przez 2 h). Probówki zawierające liofilizowaną sondę PSTVd znakowaną DIG (Agdia) przed otwarciem krótko zwirować. W celu uniknięcia zanieczyszczeń RNazami (używać rękawiczki). Zawiesić liofilizowaną sondę PSTVd znakowaną DIG w 100 µl buforu DIG Easy-Hyb (Roche Diagnostics). Proporcja sondy do objętości hybrydyzacyjnego buforu będzie określona i załączona do probówki z sondą. Umieścić membranę w szklanej probówce do hybrydyzacji⁶. Dodać 100 µl rozcieńczonej sondy znakowanej DIG do 8 ml buforu DIG Easy-Hyb (Roche Diagnostics) i wylać wystarczającą ilość na membranę, zakrywając ją (potrzeba około 4 ml na 100 cm² membrany). Pozostały bufor hybrydyzacyjny z dodaną sondą może być przechowywany (patrz 6.7). Jeśli bezpośrednio na membranę dodawana jest rozcieńczona sonda bez dodatku buforu DIG Easy-Hyb, może to skutkować podwyższonym tłem. Hybrydyzację w inkubatorze hybrydyzacyjnym (lub w łaźni wodnej z mieszaniem oraz inkubatorze z mieszaniem) przeprowadzać przez noc w 55 °C.

W poniższej procedurze, podczas inkubacji w buforze wykrywającym, nie należy dopuścić do wyschnięcia membrany. Płukania mogą być przeprowadzane w naczyniach odpornych na wysoką temperaturę. Kolejnego dnia ostrożnie zlać bufor hybrydyzacyjny i przechowywać w sterylnej probówce. Sonda w buforze hybrydyzacyjnym może być przechowywana w temperaturze – 70 °C i użyta ponownie (rozmrozić i zdenaturować w 65 °C przez 15 minut). Membranę odpłukać przez 15 minut w temperaturze pokojowej w 200 ml buforu do płukania 1, następnie przez 15 minut w temperaturze pokojowej w 200 ml buforu do płukania 1 zawierającego 1 µg ml⁻¹ RNazy A. Dodanie RNazy jest konieczne, aby uniknąć fałszywie pozytywnych wyników w zdrowym materiale. Membranę należy odpłukać dwa razy, każde płukanie przez 15 minut, w 65 °C, w 200 ml ogrzanego buforu do płukania 2. Wyplukać membranę w temperaturze pokojowej przez 1 minutę w 50-100 ml buforu kwasu maleinowego (100mM kwas maleinowy, pH 7,5; 150mM NaCl, dołączony jako 10x bufor kwasu maleinowego do Zestawu DIG Wash and Block Bufor, Roche Diagnostics). Wylać roztwór. Następnie blokować przez 1-2 h w temperaturze pokojowej w 25 ml roztworu blokującego na membranę (np. 2,5 ml 10 x roztworu blokującego + 22,5 ml 10 x buforu kwasu maleinowego dołączonych do Zestawu DIG Wash and Block Bufor, Roche Diagnostics), używając obrotowego mieszadła (lub ruchomego stołu) 100-150 obrotów na minutę. Nie wylewać roztworu. Zwirować roztwór anti-DIG-alkaliczna fosfataza (dołączonego do Zestawu DIG Luminescent Detection Roche Diagnostics) przez 5 minut w 10 000-12 000 obr/minutę, aby usunąć małe agregaty przeciwciał, które mogą być obecne i które mogą prowadzić do powstawania plamek w tle. Dodać roztwór anti-DIG-alkaliczna fosfataza, użyty we wcześniejszym etapie w rozcieńczeniu 1: 10 000, bezpośrednio do roztworu blokującego zwracając uwagę, aby nie nałożyć anti-DIG-alkaliczna fosfataza bezpośrednio na membranę. Pracować w sterylnych warunkach podczas stosowania stoku anti-DIG-alkaliczna fosfataza oraz roztworu substratu CSPD. Membranę inkubować przez 30 minut (nie więcej) w temperaturze pokojowej na mieszadle (lub ruchomym stole). Zlać roztwór i dwukrotnie wyplukać membranę przez 15 minut na każde płukanie w temperaturze pokojowej w około 150 ml buforu kwasu maleinowego. Użyć obrotowego mieszadła 50-80 obr/minutę (lub ruchomego stołu). Rozcieńczyć CSPD 1: 100 w 0,5 ml buforu wykrywającego (dołączony do Zestawu DIG Luminescent Detection Roche Diagnostics. Bufor wykrywający to 100mM Tris-HCl, pH 9,5; 100mM NaCl). Wyplukać jednorazowo membranę przez 5 minut w temperaturze pokojowej w 50-100 ml buforu wykrywającego. Mokłą membranę próbką ku górze umieścić na arkuszu celulozowym (lub samoprzylepnej folii) i powoli za pomocą pipety na powierzchnię membrany nanieść rozcieńczony CSPD (około 0,5 ml CSPD na 100 cm² membrany). Ostrożnie podnieść arkusz i membranę i

⁶ Alternatywnie można użyć worki hybrydyzacyjne „heat-sealed” i łaźni wodnej z mieszaniem lub dwuczęściowego zamykanego naczynia należy jednak pamiętać, aby uniknąć rozdzielenia naczynia w cieplarni z mieszaniem, części połączyć folią (taśmą). Małe filtry, jeśli to możliwe, umieścić wewnątrz naczynia na plastikowych naczynkach wagowych, a do naczynka dodać buforu hybrydyzacyjnego.

delikatnie rozprowadzić substrat. Ostrożnie umieścić kolejny arkusz celulozowy (lub samoprzylepnej folii) na powierzchni membrany, za pomocą palców delikatnie usunąć bąble powietrza i ponownie rozprowadzić substrat. Umieścić membranę w kasecie autoradiograficznej. W ciemni włożyć film do kasety. Mocno zamknąć kasetę, usunąć nadmiar filmu i włączyć światło. Wystawić membranę na działanie filmu przez 2,5-3,0 h w temperaturze pokojowej lub 1,0-1,5 h w temperaturze 37°C i następnie wywołać film.

Załącznik 2. Powrotna elektroforeza w żelu poliakrylamidowym.

Wstęp

Powrotna elektroforeza w żelu poliakrylamidowym (r-PAGE) oparta jest na odmiennym uporządkowaniu molekuly wiroida w warunkach natywnych i denaturujących (Reisner, 1987). Pierwszy rozdział jest przygotowywany w warunkach natywnych (temperatura poniżej temperatury przejścia), kiedy mobilność elektroforetyczna wiroida jest podobna do mobilności liniowej molekuly w roślinie. Jednak podczas powrotnego rozdziału w warunkach denaturacji (temperatura powyżej temperatury przejścia) wiroid przybiera swoją kolistą formę, która powoduje obniżenie elektroforetycznej mobilności w porównaniu z jego liniową molekułą. Dlatego można uzyskać wyraźny rozdział pomiędzy prążkiem wiroida i kwasami nukleinowymi rośliny. RNA wiroida jest wizualizowany, dzięki barwieniu w azotanie srebra. Metoda nie jest specyficzna dla PSTVd i może prawdopodobnie wykrywać wszystkie inne wiroidy.

Materiały

Ekstrakcja próbki

Bufor ekstrakcyjny: LiCl 29,69g; glicyna 4,50g. Uzupełnić do 180ml destylowaną wodą oraz używając 10M lub bardziej stężonego LiOH ustalić pH 8,8. Uzupełnić do objętości 200ml destylowaną wodą i jeśli to konieczne ustalić pH 9,0 używając LiOH. Bufor powinien być klarowny, bez żółtego zabarwienia.

PEG 6000 i dozownik PEG: używając moździerza lub młynka do kawy, rozgnieść PEG na drobny proszek. Można wykonać dozownik PEG w celu umożliwienia szybszego sporządzania odważki 0,02g sproszkowanego PEG do probówek Eppendorfa⁷.

Fenol/chloroform mix: skryształizowany fenol 500g; chloroform 500ml; octan-1-ol 20ml; hydroxyquinolene 1,0g. Początkowo mieszać fenol i chloroform, pozostawić do rozpuszczenia na kilka godzin przed dodaniem pozostałych składników. Mieszanina może być przechowywana pod digestorium przez kilka miesięcy.

10% SDS: sodium dodecyl sulphate (SDS) 40,0g uzupełnić do objętości 400ml woda destylowaną.

Etanol/eter płukanie osadu: etanol 50 ml; eter 50ml. Przechowywać w zakręcaniej butelce w zamrażarce.

Przygotowanie żelu

Roztwór akrylamidu: akrylamid 30,0g; bis-akrylamid 0,7g. Uzupełnić do 100ml, rozpuścić i przefiltrować przez papierowy filtr Whatman 1 używać natychmiastowo.

Nadsiarczan amonu: nadsiarczan amonu 0,1g; dodać 900µl destylowanej wody, delikatnie zamieszać na naczynku wagowym. Użyć natychmiastowo.

⁷ Używając flamastra, zaznaczyć na zewnętrznej stronie probówki poziom odpowiadający odważce 0,02g PEG. Usunąć PEG i stosując skalpel odciąć w zaznaczonym miejscu 0,02g czubek Eppendorfa. Umieścić jednorazowy skalpel w ścianie odciętego czubka, jako rączka dozownika. Analityk powinien przećwiczyć stosowanie dozownika, ważąc od czasu do czasu wysypane z dozownika odważki aż do momentu, gdy 0,02 g będzie bezbłędnie odważane.

Mieszanka żelu: stek akrylamidu 83,5ml; 5xTBE 22,4ml; Temed 3,4ml; wody destylowanej 390,7ml. Przechowywać w ciemnym miejscu w 4°C.

5x TBE bufor: zakupiony jako wcześniej sporządzony proszek (tris-borate-EDTA bufor) (Sigma nr kat. T 3913). Rozpuścić zawartość torebki w 1 litrze destylowanej wody.

Obciążanie i rozdział

Bufor obciążający: sacharoza 12g; xylene-cyanol-FF 0,125g; destylowanej wody 30ml. Po przygotowaniu autoklawować.

Bufor rozdzielający: 5x TBE bufor 44ml; uzupełnić do 1 litra destylowaną wodą.

Barwienie srebrem

Utrwalający bufor: etanol 20ml; kwas octowy 1 ml; wody destylowanej 179ml.

Wywoływacz: NaOH 1,5g; formaldehyd 400µl; borowodorek sodu 0,0088g; uzupełnić do 200ml wodą destylowaną.

Roztwór blokujący: Na₂CO₃ 1,5g; destylowanej wody 200ml.

Wielkość próbki oraz kontroli pozytywnej i negatywnej

Jak w Załączniku I⁸. Wielkość masy może być zmniejszona do momentu, w którym nadal jest osiągnięta detekcja.

Ekstrakcja próbki

Celem opisanej dwuetapowej metody ekstrakcji PEG (polyethylene glycol) jest wyekstrahowanie nisko-cząsteczkowego RNA z próbki, aby uzyskać bardzo czystą preparację. Ma to takie znaczenie, iż można użyć bardzo cienkiego żelu, który podnosi czułość wykrywania.

Zmiażdżyć tkankę próbek np. za pomocą moździerza z małą ilością „trawionego” piasku (biały kwarc -50+70 oczko) w 20µl 10% SDS i 180µl Ekstrakcyjnego buforu LiCl. Dodać 400µl mieszaniny fenol/chloroform i następnie zmiażdżyć. Przełać ostrożnie zmiażdżoną tkankę do 1,5 ml probówek eppendorfa i wirować w około 12 000 obr/min przez 20 minut. Dla każdej próbki przegotować dalsze dwie probówki zawierające 0,02g PEG MW 6000. W celu przyspieszenia ekstrakcji, PEG dozować za pomocą dozownika PEG (Tabela 1)*. Po wirowaniu i użyciu czystych końcówek dla każdej próbki ostrożnie pobrać 180µl supernatantu i dodać do jednej z dwóch probówek z PEGiem (jeśli próbki jest mniej niż 180µl, uzupełnić objętość do żądanej buforem LiCl). Probówki wortexować, aż do momentu rozpuszczenia kryształów. Pomocnym w mieszaniu bywa pozostawienie końcówki w probówce podczas wortexowania. Kiedy próbka jest wymieszana, usunąć końcówkę i wirować 12 000 obr./min. przez 30 minut. Uważnie pobrać supernatant, aby nie napipetować glicerynowego osadu, zawierającego wielkocząsteczkową frakcję (MW), która może powodować efekt przeładowania żelu. Uzyskany w taki sposób supernatant ponownie dodać do drugiej próbówki z

⁸ Kontrola nie jest kontrolą indywidualnych probówek. Działa jako kontrola dla czynników, które mogą dotyczyć ukończonej partii badań, takich jak bufor, końcowe stężenie soli. Jest to także wizualny odnośnik dla podsumowania wyników. Podstawowa sprawdzająca kontrola jakości podczas procedury ekstrakcji dla każdej próbki służy analitykowi, aby w pełni uświadomić przeprowadzenie każdego kroku, a szczególnie pojawienie się końcowego osadu. Pomimo małej ilości, końcowy osad powinien być widoczny, aby uznać test za ważny. Każda próbka bez osadu powinna być pobrana ponownie i przebadana.

* przypis tłumacza: błąd, powinien być (Odsyłacz 7)

PEGiem. Probówki wortexować, aż do momentu rozpuszczenia kryształów. Pomocnym w mieszaniu bywa pozostawienie końcówki w probówce podczas wortexowania. Kiedy próbka jest wymieszana, usunąć końcówkę i wirować 12 000 obr./min. przez 30 minut. Na ściance probówki utworzy się niewielki osad. Używając „pasterówki” usunąć supernatant i wylać. Dodać do każdej probówki około 300µl schłodzonego roztworu do płukania etanolu/eteru. Pozostały PEG opadnie na dno probówki. Używając innej „pasterówki” pobrać z dna probówki roztwór do płukania. Osad może przemieszczać się ze ścianki probówki, należy upewnić się, aby nie pobrać go do „pasterówki”. Osad powinien zostać nietknięty. Końcowy osad powinien być widoczny. Każdą próbkę bez osadu należy pobrać i wyekstrahować ponownie. Pozostawić probówki otwarte na powietrzu w celu wysuszenia osadów (lub suszyć w suszarce próżniowej w temperaturze pokojowej przez 5 minut, unikając przesuszenia).

Przygotowanie żelu

Metody opisane w Protokole są przygotowane dla żeli grubości 1mm 9 x 8cm, używanych w wertykalnym urządzeniu elektroforetycznym dla żelu, który może działać pod napięciem 250V ($25Vcm^{-1}$) oraz odpornym na ogrzewanie do 70°C. Żel przygotowywać dzień wcześniej, zgodnie z instrukcją załączoną do urządzenia elektroforetycznego. Płyty szklane przed montażem przeczyścić alkoholem. Umieścić grzebięń w kasecie żelu. Objętości określone dla urządzenia elektroforetycznego Atto⁹ i używane dla innych urządzeń mogą wymagać przystosowania. Dla różnej wielkości żeli, należy dostosować woltaż. Przybliżony woltaż dla rozdziału w 25 V x (długość żelu + odległość pomiędzy żelem i ujemną elektrodą + odległość pomiędzy żelem i dodatnią elektrodą). Zwiększenie woltażu może spowodować miejscowe zwiększenie temperatury w komorach (kuwetach) bez chłodzenia całej powierzchni, powodującą deformację żelu. Niektóre doświadczenia mogą wymagać ustalenia optimum woltażu.

Do przygotowania dwóch żeli dodać 134µl nadsiarczanu amonu do 20ml mixu żelu i szybko wymieszać. Używając „pasterówki” wlać mix żelu pomiędzy pionowe płyty, aż do poziomu gdzie roztwór jest tuż nad górą grzebienia (zapobiega to kurczeniu się studzienek podczas zestalania żelu). Pozostawić do zestalania na 1h, następnie owinąć kasetę w dobrej jakości folię samoprzylepną (np. Saran Wrap) i przechować w 4°C. Żele mogą być przechowywane przez 2 dni, dłuższe przechowywanie może obniżać jakość rozdziału prążków, i stąd też obniżenie czułości przy niskich koncentracjach kwasu nukleinowego.

Nakładanie i rozdzielanie w żelach

Rozdział żeli prowadzić przy stałym napięciu 250V (lub innym woltażu, patrz powyżej). W „powrotnym” PAGE pierwszy rozdzielanie żelu jest przeprowadzany w temperaturze pokojowej, drugi (odwrotny) rozdzielanie jest wykonywany w wysokiej temperaturze. Aby przygotować powrotny rozdzielanie, ogrzać stolik inkubatora lub urządzenie ogrzewające do 70°C, a także ogrzać 500ml buforu rozdzielającego do 70°C. Rozpuścić uzyskany wysuszony osad (sekcja 4) w 10 µl destylowanej wody, dodać 3µl buforu obciążającego do każdej próbki i krótko zwortexować. Jeśli do rozdzielania używany jest tylko jeden żel w kasecie dwu-żelowej, pusta kasetka także powinna być użyta. Usunąć klamry, grzebięń i gumowe uszczelki. Sprawdzić, czy wszystkie studzienki żelu są wyraźne utworzone, aby w przypadku nieprawidłowości zapobiec nakładaniu. Przygotować kasetę do zastosowania w urządzeniu elektroforetycznym, tak jak to opisano w załączonej do niego instrukcji. W pierwszym rozdzielaniu (w temperaturze pokojowej) zastosować wystarczającą ilość buforu rozdzielającego tak, aby zakryć dolną część żelu, pozbyć się pęcherzyków powietrza poprzez nachylenie urządzenia do momentu, gdy pęcherzyki znajdują się na powierzchni, następnie wypełnić komorę. Wypełnić górny zbiornik i delikatnie za pomocą „pasterówki” przemyć studzienki. Przed nakładaniem próbek, zaznaczyć

⁹ Atto dual Mini Slab Kit (Nr kat. AE6400); Dodatkowy zestaw płytek (Nr kat. AE6420); PS304 lub PS503 Zasilacz (Nr kat. 160 000 lub 172 000). Genetic Research Instrumentation Ltd, Gene House, Queensborough Lane, Rayne, Braintree CM7 8TF (GB).

studzienki niewielką ilością buforu obciążającego tak, aby były widoczne. Używając nowych końcówek dla każdej próbki, ostrożnie nałożyć 13µl próbki do studzienki. Określić położenie żelu każdorazowo w ten sam sposób, poprzez nakładanie kontroli na jednym z końców żelu.

Po nałożeniu, podłączyć elektrody i rozdzielić żel przy stałym napięciu 250 V (lub innym woltażu, patrz powyżej) do momentu, kiedy czoło barwnika znajdzie się na wysokości 1 cm od dolnej granicy żelu (około 1 h dla żelu 9x8cm). Odłączyć zasilanie, wyłączyć bufor rozdzielający i w jego miejsce zastosować gorący bufor rozdzielający (70 °C). Usunąć pęcherzyki powietrza, jak poprzednio, ponownie podłączyć elektrody, zamienić bieguny elektrod i umieścić komorę elektroforetyczną wewnątrz inkubatora lub łaźni wodnej w 70 °C. Rozdzielać żel przy stałym napięciu 250 V (lub innym woltażu, patrz powyżej) do momentu, kiedy czoło barwnika znajdzie się w górnej części żelu (około 30 minut dla żelu 9x8 cm).

Barwienie srebrem

Ostrożnie otworzyć płyty żelu. Jeśli żel pozostał na płycie, użyć ostrza skalpela od strony szpary, aby zapobiec rozdarciu żelu. Trzymać płytę stroną z żelem ku dołowi nad pojemnikiem zawierającym bufor utrwalający, odpowiednio zakryć żel(e) (około 200 ml), poluzować jeden z rogów żelu w taki sposób, aby żel powoli zsunął się do buforu. Pojemnik z buforem utrwalającym oraz z żelem (żelami) umieścić na obrotowym mieszadle i delikatnie mieszać przez 15 minut. Jednorazowo wypłukać żel (żele) w wodzie destylowanej, dodać wystarczającą ilość barwiącego srebra tak, aby zakryć żel (żele) jak powyżej i lekko mieszać przez 20 minut. Dokładnie 3-krotnie wypłukać żel (żele) w wodzie destylowanej i dodać odpowiednią ilość roztworu wywoływacza, aby zakryć żel (żele) jak poprzednio. Żel pozostawić w wywoływaczu do momentu, kiedy zaczną się pokazywać kontrole PSTVd, następnie jednorazowo wypłukać żel w wodzie destylowanej i dodać odpowiednią ilość roztworu blokującego, aby zakryć żel (żele) jak poprzednio. Jeśli żele są przeznaczone do przechowania, wyjąć je z roztworu blokującego i ostrożnie zawinąć w wysokiej jakości folię samoprzylepną (np. folia Saran). Przechowywać w 4°C.

Interpretacja

W przypadku pozytywnych próbek, prążek wiroida powinien pojawić się jako oddzielny prążek na wysokości 2/3 dolnej części żelu, bez obecności innych prążków. Górna część żelu powinna być mocno wybarwiona w miejscu, gdzie migrują zdenaturowane kwasy nukleinowe, tworząc ciemne prążki. Jeśli prążki pojawiają się w dolnej części żelu jakiegokolwiek próbki, powinny być przeprowadzone dalsze badania dla potwierdzenia, czy próbki są pozytywne.

Załącznik 3. Dwustopniowa (two-step) reakcja łańcuchowa polimerazy z zastosowaniem odwrotnej transkryptazy (RT-PCR) (z włączeniem wewnętrznych kontroli)

Wstęp

Opisana metoda¹⁰ jest oparta na metodzie Seignera (2000). Metoda nie jest specyficzna dla wykrywania PSTVd. Startery prawdopodobnie pozwalają wykryć większość izolatów PSTVd zamieszczonych w bazie danych sekwencji oraz kilka innych blisko spokrewnionych *Pospiviroid* spp. Oprócz opisu badania specyficznej detekcji PSTVd, protokół zawiera także badanie kontrolne, zaprojektowane sekwencje na bazie genu 5 S rybosomalnego. Ponieważ sekwencje te podlegają

¹⁰ Źródło L. Seigner, Bayerische Landesanstalt für Landwirtschaft, Institut für Pflanzenschutz, D-85 354 Freising, Lange Point 10, Germany

Bufor RPE jest dostarczany jako koncentrat; należy się upewnić czy dodano 4 objętości etanolu przed użyciem.

ekspresji we wszystkich typach tkanek roślinnych, mogą być używane do monitorowania ilości i jakości wyekstrahowanego z każdej próbki kwasu nukleinowego, pomaga to również uniknąć ryzyka pojawienia się wyników fałszywie negatywnych. Jednakże należy zaznaczyć, iż badanie to nie jest specyficzną kontrolą dla RNA i może także wykrywać DNA równocześnie oczyszczane podczas ekstrakcji RNeasy. Mimo takich ograniczeń, stosowanie badań kontrolnych znacząco podnosi ogólną wiarygodność detekcji PSTVd poprzez to, że wskazuje, iż kwas nukleinowy został wyekstrahowany, i że jest wolny od inhibitorów.

Ogólne wskazówki obniżenia ryzyka wystąpienia kontaminacji

Cały czas należy używać bezpudrowych rękawiczek. Rękawiczki lateksowe są wystarczające, aby zapobiec zanieczyszczeniu próbki oraz na wypadek stosowania większości odczynników. Należy stosować rękawiczki nitrylowe podczas pracy z bromkiem etydyny. Stosować oddzielne, najlepiej oznakowane pipety do pracy z bromkiem etydyny. Używać sterylną, wolną od nukleaz, ultra-czystą wodę, jeśli inaczej nie wspomniano w tekście. Używać czyste, jednorazowe akcesoria na wszystkich etapach. Torebki ekstrakcyjne powinny być czyste i „niedotykane”. Probówki do wirowania powinny być autoklawowane i przechowywane w słoikach/woreczkach. Artykuły plastikowe używane ponownie (plastikowe minimoździeże, pudełka) powinny być dekontaminowane całą noc w roztworze zawierającym czynnik utleniający (np. HOCl, Cl₂) i następnie wypłukane obficie wodą. Szkło powinno być wymyte w gorącej wodzie z dodatkiem detergentu, następnie umieszczone w inkubatorze w 180°C przez 2 h. Końcówki do pipet powinny być sterylne z filtrem w pudełkach lub pakowane do pudełek i następnie autoklawowane. Pipety powinny być regularnie oczyszczane roztworem „RNase Away” (Fisher Scientific). Stosować oddzielny zestaw pipet używanych do ekstrakcji, do pipetowania RT- i PCR-składników, do pipetowania RNA i cDNA-próbek oraz do nakładania na żel podczas elektroforezy. Używać odmiennych wirówek dla ekstrakcji RNA oraz do przygotowywania próbek do reakcji RT i PCR.

Materiały

Bufor elektroforetyczny TAE 50x do przygotowania 1litra: 242g Tris (2M), 57ml lodowatego kwasu octowego (1M), 37,23g Na-EDTA. 2 H₂O (0,1M), pH 8,0; roztwór roboczy jest 1x stężony.
Bufor obciążający 6x: 0,25% (w/v) bromofenolu blue, 40% (w/v) sacharozy w 1x stężonym buforze TAE.

Startery dla PSTVd PCR (Weideman & Buchta, 1998);

„Downstream” starter: 5' – CCC TGA AGC GCT CCT CCG AG – 3'

„Upstream” starter: 5' – ATC CCC GGG GAA ACC TGG AGC GAA C – 3'

Startery dla wewnętrznej kontroli reakcji RT (Kolchinsky *et al.*, 1991):

„Downstream” starter: PLANT-UNI 2 5' – TGG GAA GTC CTC GTG TTG CA – 3'

„Upstream” starter: PLANT-UNI 1 5' – TTT AGT GCT GGT ATG ATC GC – 3'

Ekstrakcja RNA

Do ekstrakcji RNA stosować QIAGEN RNeasy plant mini kit. Do ekstrakcji używać probówek wirówkowych, które należy używać tylko raz. Przed rozpoczęciem ekstrakcji RNA poporcjować odpowiednią ilość buforów dostarczonych przez QIAGEN, aby uniknąć, podczas procedury ekstrakcji, kontaminacji krzyżowej roztworów oryginalnych. Krzyżowa kontaminacja próbek jest zagrożeniem podczas otwierania probówek i kolumnienek do wirowania, dlatego też do otwierania każdej probówki i kolumnienki powinien być używany nowy ręcznik bawełniany. Podczas nakładania na RNeasy kolumnienkę „spin” do wirowania nie dotykać membrany żelowo-silikonowej.

Używać nową zbiorczą próbkę podczas każdego etapu ekstrakcji RNA. Ekstrakcja oraz RT-PCR powinny być przygotowywane w różnych miejscach. Wszystkie etapy wirowania powinny być przeprowadzane w temperaturze pokojowej, która zapewnia właściwe wiązanie się RNA na membranach żelowo-silikonowych kolumniek do wirowania.

Próbki do ekstrakcji powinny obejmować próbki podczas badania oraz kontrole pozytywną i negatywną. Mogą być one materiałem roślinnym lub dla pozytywnej kontroli wcześniej wyekstrahowane i przechowane RNA, dodane do soku roślinnego/tkanki liścia i ponownie wyekstrahowane. Można użyć świeży lub mrożony materiał (przechowywany w -20°C do -80°C). Wstępne mrożenie (w -80°C w ciekłym azocie) może pomóc, ułatwiając rozdrabnianie określonych tkanek jednak, kiedy używany jest materiał mrożony decydujące jest uniknięcie rozmrożenia przed dodaniem buforu RLC, aby zapobiec jakiegokolwiek degradacji RNA pod wpływem RNaz. Zaleca się ważenie próbek przed mrożeniem.

Dla małych ilości tkanek umieścić 50mg materiału roślinnego (świeżo ważonego) w probówkach do wirowania, dodać 450 μl buforu RLC zawierającego β -mercaptoethanol (β -ME), całość zmiażdżyć dokładnie, używając mikromoździerza. β -ME dodawany jest w końcowym stężeniu 1%(v/v) do porocjowanego buforu RLC przed użyciem. Bufor RLC jest stabilny po dodaniu β -ME przez jeden miesiąc. Jeśli dostępna jest większa ilość materiału roślinnego stosować 500mg, zwiększając prawdopodobieństwo wykrycia PSTVd. W takim przypadku umieścić 500mg (świeżo ważone) w torebce ekstrakcyjnej 10x10 cm z wewnętrznym wkładem, dodać 4,5ml buforu RLC zawierającego β -ME (patrz powyżej) i zmiażdżyć dokładnie za pomocą ręcznego homogenizatora. Przenieść 450-700 μl ekstraktu bezpośrednio na „QIA shredder” kolumnkę do wirowania, załączoną do RNeasy Kitu. Uważać, aby nie zanieczyścić pipety podczas dotykania polietylenowej torebki ekstrakcyjnej. Etap „QIA shredder” zapewnia dalszą homogenizację materiału roślinnego i usunięcie komórkowych pozostałości.

Wirować w maksymalnej prędkości przez 2 minuty. Ostrożnie przenieść supernatant przesączonej frakcji do nowej próbki i zastosować ją w dalszych etapach. Dodać 0,5 objętości etanolu (96-100%) i mieszać natychmiast przez pipetowanie lub wortexowanie (zwrócić uwagę na możliwą kontaminację). Napipetować próbkę z osadem, który może formować się po dodaniu etanolu na kolumnkę RNeasy umieszczoną w 2 ml próbce zbiorczej i wirować przez 15-60 s w 8000g. Odrzucić przesącz wraz z probówką zbiorczą. Umieścić kolumnkę w nowej 2 ml próbce zbiorczej i otworzyć ją. Dodać 700 μl bufor RW1 (dołączony) na kolumnkę. Zamknąć delikatnie próbkę i wirować, jak powyżej, aby przemyć kolumnkę. Odrzucić przesącz wraz z probówką zbiorczą. Umieścić kolumnkę RNeasy w nowej 2 ml próbce zbiorczej. Dodać 500 μl buforu RPE9 i wirować jak poprzednio. Odrzucić przesącz i próbkę zbiorczą. Umieścić kolumnkę w nowej 2 ml próbce zbiorczej, otworzyć próbkę i nanieść na kolumnkę ponownie 500 μl buforu RPE i zwirować przez 2 minuty w 8000g dla osuszenia kolumnki. Po wirowaniu usunąć RNeasy kolumnkę z próbki zbiorczej uważając, aby kolumnka nie dotknęła przesączu, co mogłoby spowodować przeniesienie etanolu. Do wyplukania RNA, przenieść kolumnkę RNeasy do nowej 1,5 ml próbki zbiorczej (dołączonej). Napipetować 50 μl wolnej od RNaz wody (dołączonej) bezpośrednio na membranę żelowo-silikonową RNeasy. Nie dotykać membrany. Zamknąć próbkę i aby wyplukać, zwirować przez 1 minutę w 8000g. Roztwór RNA można użyć natychmiastowo w reakcji RT lub przechować do późniejszego użytku w -20°C .

Reakcja odwrotnej transkryptazy i łańcuchowa polimerazy (RT-PCR) (Protokół dwuetapowy).

Badać każdą próbkę dwukrotnie. Przygotować dwie oddzielne reakcje RT, jedną dla PSTVd i drugą dla wewnętrznej kontroli.

Wskazówki i rady dla obniżenia ryzyka wystąpienia kontaminacji

Mieszaniny reakcyjne (Master mixy) powinny być przygotowane w przeznaczonych do tego komorach lub stołach, które powinny być czyszczone i dekontaminowane regularnie z użyciem roztworów utleniających lub roztworu „RNase away” (Fisher Scientific) i/lub UV-C lampy. Używać pipet przeznaczonych jedynie do danego procesu tj. przygotowanie mieszaniny reakcyjnej (master mixu), do nakładania DNA (nie stosować pipet używanych do nakładania na żel lub do ekstrakcji, itp.). Regularnie dekontaminować pipety. Używać jedynie końcówek z filtrem, nową do każdego etapu pipetowania. Zamykać próbówki z odczynnikiem/próbką jednorazowo pobierając żądaną objętość. Używać bezpudrowe rękawiczki i zmieniać je każdorazowo, gdy ulegną kontaminacji. Używać jedynie sterylnych, jednorazowych, plastikowych akcesoriów. Wszystkie nowe odczynniki powinny być przed regularnym stosowaniem poporcjowane zestawem czystych pipet w przeznaczonej do tego celu komorze PCR. Poporcjowane „stoki” powinny być przechowywane w oddzielnym od innych odczynników pudełku. Wszystkie odczynniki powinny być przechowywane w czystej szufladzie zamrażarki w temperaturze -20°C i powinny natychmiastowo po użyciu trafiać do zamrażarki. Materiał roślinny, tak samo jak próbki cDNA/RNA nie powinny znajdować się w tej samej szufladzie. Odczynniki rozmrozić bezpośrednio przed użyciem, wszystkie dobrze wymieszać, (poprzez kilkakrotne odwracanie próbek lub przy małych objętościach kilkakrotne pukanie palcami), przede wszystkim inhibitory RNaz i odwrotną transkryptazę, ponieważ są one dostarczane w buforze zawierającym glicerol. Po mieszaniu, krótko zwirować (5s) w mikrowirówce. dNTPs nie powinny być rozmrażane więcej niż 2-3 razy. Wszystkie próbówki do reakcji powinny być ostrożnie oznakowane i/lub należy zaprojektować plan dla próbek, aby uniknąć pomyłek w identyfikacji próbek, użyć bloku termocyklera.

Przygotowanie reakcji odwrotnej transkryptazy (reakcja RT)

Użyć specjalnego zestawu pipet dla składników RT i oddzielnych dla próbek cDNA. Wykonać kalkulacje przed rozpoczęciem pracy dla mixu RT (patrz powyżej). Schłodzić mikrowirówkę i rotor do 4°C . Jako kontrola w reakcji RT jest używane RNA pochodzące ze znanej, zdrowej i zainfekowanej próbki. Zaplanować na odpowiednich statywach właściwą liczbę 0,2 ml próbek do PCR. Włączyć wystarczającą ilość próbek dla każdej próbki i wszystkich kontroli w dwóch powtórzeniach (każda próbka jest badana dwukrotnie). Przygotowywane są dwie reakcje RT, jedna dla PSTVd, druga dla kontroli wewnętrznej.

Denaturacja

Pobrać ostrożnie do próbek 5 μl „downstream” starterów 4 μM PSTVd lub rRNA (starter dla reakcji RT PSTVd: 5'-CCC TGA AGC GCT CCT CCG AG-3' (Weideman & Buchta, 1998), starter dla wewnętrznej kontroli reakcji RT PLANT-UNI 2: 5'-TGG GAA GTC CTC GTG TTG CA-3' (Kolchinsky et al., 1991)) i dodać 5 μl RNA każdej próbki (zachować ostrożność, aby uniknąć kontaminacji), zwortexować i krótko zwirować (5s) w mikrowirówce. Probówki umieścić w rozgrzanym termocyklerze z pokrywą grzewczą i przeprowadzić inkubację w 90°C przez 5 minut, aby całkowicie zdenaturować RNA i startery. Zaraz potem, próbówki krótko zwirować (5s) w schłodzonej mikrowirówce (4°C) i umieścić w lodzie lub na schłodzonych statywach i wkładach chłodzących (-20°C). Istotne jest przechowywanie próbek w niskiej temperaturze, aby uniknąć renaturacji (tworzenia nowej drugorzędowej struktury) RNA wiroida i starterów.

Przygotowanie mieszaniny reakcyjnej odwrotnej transkryptazy (RT)

Podczas etapu denaturacji, przygotować mieszaninę reakcyjną RT (wodę sterylną, ultra-czystą, wolną od RNaz 1,9 μl ; bufor odwrotnej transkryptazy „Superscript II” załączony do „Superscript II RT, Invitrogen”) 4 μl ; DTT 0,1M (załączony do „Superscript II RT, Invitrogen”) 2 μl ; RNAsin (Promega) (40U μl^{-1}) 0,5 μl ; dNTPs (25mM każdy) 0,8 μl ; Superscript II odwrotnej transkryptazy (Invitrogen) 200U μl^{-1} 0,8 μl ; objętość mieszaniny RT 10 μl ; objętość całkowita +starter i próbka 20(μl). Wyjąć wszystkie składniki z zamrażarki za wyjątkiem Superscript II RT (Invitrogen) i

pozwolić na rozmrożenie. Dla każdej próbki wymagana jest objętość 10µl mieszaniny reakcyjnej. Sporządzić odpowiednią ilość mieszaniny dla dwóch powtórzeń (duplikatów) dla każdej reakcji, np. wszystkich badanych próbek, pozytywnej kontroli (przynajmniej jedna), kontroli negatywnej (przynajmniej jedna). Dodać jedną objętość więcej dla błędów pipetowania. Odczynniki dodać w porządku i ilości podanej powyżej i przechowywać w probówce ze schłodzoną mieszaniną reakcyjną. Inhibitory RNaz należy dodać zgodnie z zaleceniami producenta. Wyjąć Superscript II-RT z zamrażarki bezpośrednio przed użyciem, wymieszać poprzez stukanie palcami lub przepipetowanie i krótkie zwirowanie. Sporządzić odpowiednią ilość Superscript II-RT. Po zakończeniu, zamknąć probówkę z mieszaniną reakcyjną RT, dokładnie wymieszać, krótko zwirować i umieścić w lodzie. Kontynuować postępowanie ze schłodzonymi próbkami bezpośrednio po etapie denaturacji. Ostrożnie dodać 10µl mieszaniny reakcyjnej RT do każdej probówki z próbką. Zmieszać przez wortexowanie i krótko zwirować w schłodzonej mikrowirówce (4°C). Kontynuować badanie z reakcją RT natychmiastowo (patrz poniżej).

Reakcja RT

Probówki umieścić w rozgrzanym (50 °C) termocyklerze z pokrywą grzewczą. Inkubować w celu syntezy cDNA przez 1 h w temperaturze 50 °C (50 °C jest konieczne dla właściwej denaturacji RNA wirusa podczas inkubacji). Następnie inkubować przez 3 minuty w 95 °C, aby zniszczyć aktywność Superscript II-RT i krótko zwirować. Kontynuować badanie z PCR lub przechować próbki cDNA w temp. -20 °C w celu późniejszego użycia.

Reakcja łańcuchowa polimerazy (PCR)

Przygotowanie Reakcji łańcuchowej polimerazy (PCR)

Stosować oddzielny zestaw pipet dla składników PCR oraz oddzielnych pipet dla próbek cDNA. Wcześniej schładzanie wirówki, rotoru, termocyklera do temperatury 4 °C nie jest potrzebne, ponieważ AmpliTaq Gold Polymerase (Applied Biosystems) jest aktywowana po ogrzaniu. Użyć cDNA ze znanych zdrowych i zainfekowanych próbek, tak samo jak ultra-czystą wodę wolną od nukleaz odpowiednio dla kontroli pozytywnej i negatywnej. Przed rozpoczęciem pracy przygotować kalkulację (patrz poniżej) dla mieszaniny reakcyjnej PCR (20µl mieszaniny reakcyjnej na próbkę). Zaplanować odpowiednią ilość probówek do PCR (podwójną ilość dla każdej próbki cDNA oraz dla kontroli przynajmniej jedną).

Przygotowanie mieszaniny reakcyjnej PCR

Wyjąć wszystkie odczynniki z zamrażarki za wyjątkiem AmpliTaq Gold Polymerase (Applied Biosystems) i pozwolić im na rozmrożenie. Przechowywać probówkę z mieszaniną reakcyjną w niskiej temperaturze, dodać odczynniki w następującej kolejności i ilości: ultra-czysta woda wolna od nukleaz 9,57µl; bufor AmpliTaq (bez MgCl₂) (Applied Biosystems) 2,2µl; MgCl₂ (Applied Biosystems) 25mM 1,32µl; dNTPs (1mM) 4,4µl; „downstream” starter (20uM) 1,1µl; „upstream” starter (20uM) 1,1µl. Wyjąć AmpliTaq Gold Polymerase (5U µl⁻¹) z zamrażarki. Odczynniki wymieszać poprzez stukanie palcami lub przepipetowanie i krótko zwirować. Napipetować enzym (0,11µl) do mieszaniny reakcyjnej. Po zakończeniu, zamknąć probówkę, dokładnie wymieszać, krótko zwirować i pozostawić w lodzie.

Ostrożnie napipetować 20µl mieszaniny reakcyjnej do każdej probówki PCR, a następnie ostrożnie dodać 2,2µl próbki cDNA (uważać na możliwą kontaminację). Zamknąć probówki, wymieszać, krótko zwirować i umieścić probówki w termocyklerze z pokrywą grzewczą. Rozpocząć w termocyklerze następujący program dla PCR: aktywacja AmpliTaq Gold Polymerase+denaturacja cDNA, 94 °C przez 9 minut 15s; 40 cykli 94 °C 45s, 62 °C 45s, 72 °C 60s (dla przejścia od 62 °C do 72

°C, progowaniem (ramping) 1 °C na 4s); 72 °C 10 minut. Program cykli termicznych jest przeprowadzany głównie według Weideman & Buchta (1998) z pojedynczą modyfikacją (aktywacją AmpliTaq Gold Polymerase przez ogrzanie przed PCRem). Po zakończeniu PCR, próbki krótko zwirować i kontynuować elektroforezę w żelu (patrz poniżej), lub przechować je w-20 °C w celu późniejszego użycia. Produkt PCR PSTVd ma długość 359 bp. Produkt rRNA dla ziemniaka ma długość około 260 bp.

Elektroforeza w żelu agarozowym

Odważyć agarozę do przygotowania 1,5% (w/v) żelu (grubość 5mm). Umieścić agarozę w kolbie Erlenmeyera i wlać odpowiednią ilość 1x stężonego buforu TAE (rozcieńczony z roztworu stoku 50 x stężonego TAE). Rozpuścić agarozę poprzez ogrzewanie zawiesiny, schłodzić na mieszadle magnetycznym 55-60 °C i ostrożnie dodać właściwą ilość roztworu bromku etydyny (0,5ug bromku etydyny na ml roztworu żelu). Wylać żel do przygotowanej, przepuszczalnej dla światła UV tacki elektroforetycznej, umieścić grzebień formujący studzienki dla próbek (4mm głębokość, 3mm szerokość).

Pobierać 10µl każdej próbki PCR, dodać 2µl 6x stężonego buforu obciążającego i całość wymieszać. Ostrożnie umieścić tackę w komorze elektroforetycznej i nanieść 9µl próbki z buforem obciążającym do studzienek w żelu agarozowym. Przynajmniej na pierwszą i ostatnią ścieżkę powinien być naniesiony standard DNA zgodnie z instrukcją producenta. Rozdzielać w 70-120V do momentu, kiedy barwnik przebędzie drogę na odległość 6cm. Przenieść i osuszyć.

Zalecany jest system dokumentacji żelu, aby dokonać dokumentacji fotograficznej wyników.

Załącznik 4 TAQMAN

Wstęp

Metoda łączy RT-PCR i detekcję fluorescencyjną w czasie rzeczywistym (Mumford *et al.*, 2000). Startery/sonda prawdopodobnie wykrywają większość izolatów PSTVd zamieszczonych w bazach sekwencji oraz kilka blisko spokrewnionych *Pospiviroid* (np. *Tomato chlorotic dwarf viroid*).

Oprócz opisu badania specyficznej detekcji PSTVd, protokół zawiera także badanie kontroli zaprojektowanej dla sekwencji genu roślinnej oksydazy cytochromowej (COX). Jako że COX jest uniwersalnym genem ulegającym ekspresji we wszystkich tkankach roślinnych, może być używany do monitorowania ilości i jakości wyekstrahowanego z każdej próbki kwasu nukleinowego, zapobiegając ryzyku wystąpienia fałszywie negatywnych wyników. Należy jednak zaznaczyć, iż badanie COX nie jest RNA-specyficzną kontrolą i może jednocześnie wykrywać DNA oczyszczane podczas metody ekstrakcji z CTAB. Pomimo takich ograniczeń stosowanie badania kontrolnego znacząco wpływa na poprawę ogólnej wiarygodności wykrywania PSTVd, tak samo jak wskazuje, iż został wyekstrahowany kwas nukleinowy oraz badanie jest wolne od działania inhibitorów.

Sekwencje starterów oraz sondy można otrzymać od Central Science Laboratory, York (GB).

Ekstrakcja kwasu nukleinowego

Postępować według metody CTAB przygotowanej na podstawie Lohdi *et al.*, (1994). Na wszystkich etapach stosować sterylne, jednorazowe plastikowe akcesoria. Torebki ekstrakcyjne powinny być sterylne i „niedotykane”, próbki powinny być autoklawowane i przechowywane w słoikach lub torebkach. Końcówki do pipet powinny być w postaci wkładów do raków (np. końcówki ATLAS, Alpha laboratoties) lub raków i autoklawowane (luźne końcówki bez filtra). Powinien być używany zestaw pipet przeznaczony jedynie do ekstrakcji. Próbki do ekstrakcji powinny obejmować próbki badane oraz kontrole pozytywną i negatywną RNA. Może to być materiał roślinny lub dla

pozytywnej kontroli wcześniej wyekstrahowane i przechowywane RNA, które dodawane jest do soku roślinnego lub tkanki liścia i ponownie wyekstrahowane. Umieścić tkankę 100-200mg w 10x15cm torebce ekstrakcyjnej i używając ręcznego homogenizatora zmiążyć. Wcześniejsze mrożenie (w -80°C lub w ciekłym azocie) może pomóc w rozdrobnieniu niektórych tkanek. Rozdrabniać do momentu, kiedy próbka utworzy postać jednolitej masy. Dodać 1-2ml (10 objętości) ekstrakcyjnego buforu CTAB (CTAB 20g, 100mM Tris-HCl pH 8,0, 20mM EDTA, NaCl 81,8g, woda destylowana do obj. 1 litra, autoklawować i przechowywać w temperaturze pokojowej; dodać 1% Na₂SO₃, 2% PVP-40 do porcjowanego stoku buforu, bezpośrednio przed ekstrakcją) i dokładnie wymieszać używając homogenizatora.

Aby upewnić się, że RNazy nie zdegradują RNA PSTVd, zmiążyć i dodać bufor w przeciągu 20-30s. Przełąć wyciśnięty sok do 1,5ml próbek i inkubować je w temperaturze 65°C przez 30 minut. Probówki wirować w mikrowirówce w prędkości 13 000 obr min⁻¹ przez 5 minut (w temperaturze pokojowej). Pobrać 700µl klarownego soku, przenieść do nowej próbki i dodać 700µl chloroformu:izoamylowego octanu (IAA) 24:1, całość wymieszać do uzyskania emulsji poprzez kilkukrotne odwrócenie próbek. Wirować jak poprzednio. Ostrożnie pobrać 500µl górnej warstwy (wodnej) i przenieść do nowej próbki. Dodać 500µl chloroformu:IAA (24:1), wymieszać i wirować jak poprzednio. Przenieść wodną warstwę, zachowując szczególną ostrożność, aby nie naruszyć powstałej interfazy. Dodać 0,5 objętości 5M NaCl i taką samą objętość schłodzonego izopropanolu (do wyboru można dodać 1µl dextranu blue 20mg ml⁻¹ w wodzie). Dobrze wymieszać i inkubować całą noc w temperaturze -20°C. Wirować przez 10 minut, tak jak poprzednio, aby wytrącić osad kwasu nukleinowego. Zawiesić osad w 200µl buforu TE zawierający 1% SDS (10mM Tris-HCl, pH 8,0; 1mM EDTA, 1% SDS). Dodać 100µl 5M NaCl i 300µl schłodzonego izopropanolu. Całość dobrze wymieszać i inkubować w temperaturze -20°C przez 30 minut. Wirować przez 10 minut jak poprzednio, aby wytrącić osad kwasu nukleinowego. Wylać sól i izopropanol i przemyć osad przez dodanie 400µl 70% etanolu, wirować przez 4 minuty. Wylać etanol i osuszyć osad z pozostałego etanolu. Zawiesić osad w 100µl ultra-czystej wody wolnej od nukleaz.

Przygotowanie badania TaqMan

Podczas przygotowywania wszystkich etapów reakcji, powinna być zachowana szczególna ostrożność w celu uniknięcia kontaminacji próbek i odczynników. Wszystkie odczynniki do badania TaqMan (Gold RT-PCR Kit; Applied Biosystems, N8080232) powinny być przechowywane w -20°C. Powinny być rozmrażane przed użyciem, a enzymy winny być przechowywane w lodzie. Wszystkie odczynniki dobrze wymieszać (poprzez kilkakrotne odwrócenie próbek lub przy małych objętościach poprzez stukanie palcami), krótko zwirować (5s) w mikrowirówce.

Przygotować dwie próbki (odpowiednio 0,5 lub 1,5ml) i oddzielnie przygotować pierwszy etap (7,5µm „reverse” startera 1µl, ultra-czystą wodę sterylną wolną od nukleaz 3µl, RNA 1µl) i drugi etap (10xPE Taq Gold Bufor A 2,5µl, 25mM MgCl₂ 5,5µl, 6,25 mM dNTPs 2,0µl; 7,5µM „forward” startera 1µl, TaqMan sondy (znakowanej FAM) 0,5µl, MMLV RTazy 0,05µl, AmpliTaq Gold DNA Polymerase 0,125µl, ultra-czystą wolną od nukleaz wodę 8,325µl) mieszanin reakcyjnych. Przygotować odpowiednią ilość mieszaniny dla dwóch powtórzeń każdej reakcji np. wszystkich testowanych próbek, pozytywnej kontroli RNA (przynajmniej jedna), kontroli negatywnej niezainfekowanego RNA (przynajmniej jedna). Dodać jedną objętość więcej dla błędu pipetowania. Dodać odczynniki w kolejności i ilości podanej powyżej. Po zakończeniu, zamknąć próbki i pozostawić w lodzie. Zaplanować odpowiednią ilość próbek PCR 0,2ml w odpowiednich statywach. Dodać 1 µl ekstraktu RNA lub materiału kontrolnego do każdej próbki. Dodać 4µl pierwszej mieszaniny reakcyjnej do każdej próbki, zamknąć wieczka i przenieść próbki do termocyklera. Uruchomić program „denaturacja 95” (95 °C, 3min, 1cykl). Pozostawić próbki, aż osiągną temperaturę 4 °C i chłodzić przez 5-10 minut przed dalszym postępowaniem. W międzyczasie dodać 20µl drugiej mieszaniny reakcyjnej do każdej studzienki 96-dołkowej płytki PCR. Po zakończonym etapie denaturacji, przepipetować mieszaniny reakcyjne z każdej próbki pierwszego etapu do odpowiedniej mieszaniny drugiego etapu, dobrze wymieszać, upewnić się, że mieszanina jest

naniesiona na dnie każdej studzienki. Zamknąć wszystkie wypełnione studzienki. Przenieść płytkę do ABI Prism 7700.

Dla oksydazy cytochromowej wymagana jest tylko jedna mieszanina reakcyjna. Etap denaturacji nie jest wymagany. RNA/kontrola są dodawane bezpośrednio do 24 μ l mieszaniny reakcyjnej zawierającej wszystkie odczynniki (10xPE *Taq* Gold Bufor A 2,5 μ l, 25mM MgCl₂ 5,5 μ l, 6,25 mM dNTPs 2,0 μ l; 7,5 μ M „forward” COX startera 1 μ l, 7,5 μ M „reverse” COX startera 1 μ l, COX TaqMan sondy (znakowanej VIC) 0,5 μ l, AmpliTaq Gold DNA Polymerase 0,125 μ l; MMLV RTazy 0,05 μ l, ultra-czystą wolną od nukleaz wodę 11,325 μ l; RNA 1 μ l).

Przeprowadzenie reakcji TaqMan

Zgodnie z instrukcją producenta.

Ryc. 1. Skarłowaciała roślina ze zwróconymi ku górze, pomarszczonymi liśćmi odm. Norgold Russet. Infekcja 3-ciego pokolenia Zdj.: SA Slack.



Ryc. 2. Infekcja bezobjawowa odm. La Chipper. Infekcja 3-ciego pokolenia Zdj.: SA Slack.



Ryc. 3. Wrzecionowatego kształtu bulwy z głęboko zaznaczonymi oczkami odm. Russet Burbank (po prawej stronie zdrowa bulwa). Zdjęcie: SA Slack.



Ryc. 4 Wrzecionowatego kształtu bulwy na górze, zdrowe na dole. Zdjęcie: J Bryan.



Ryc. 5. Wynik zwiększającej się liczby pokoleń na nasilenie symptomów na bulwach. Zdrowe bulwy (górny rząd), infekcja w bieżącym sezonie (drugi rząd), bulwy z trzeciego pokolenia zainfekowanych bulw (trzeci rząd) odmiany Norgold Russem i Russet Burbank. Zdjęcia: S.A. Slack.



Tłumaczenie z jęz. angielskiego:	Sprawdził:	Zatwierdził:
Ewa Hennig (GIORiN CL)	Justyna Moszczyńska (GIORiN CL)	Janina Butrymowicz (GIORiN CL)
15.10.2009	30.11.2009	