

Diagnostyka

Diagnostic

Phytophthora kernoviae

Zakres stosowania

Niniejszy standard opisuje protokół diagnostyczny dla *Phytophthora kernoviae*¹.

Zatwierdzenia i nowelizacje

Zatwierdzony we wrześniu, 2012 roku.

Wprowadzenie

Gatunek *Phytophthora kernoviae* został po raz pierwszy stwierdzony w roku 2003, w południowo-zachodniej Anglii podczas inspekcji prowadzonych pod kątem obecności *Phytophthora ramorum* (Brasier i wsp., 2005). Patogen został wyizolowany równocześnie z dużych krwawiących nekroz dorosłych drzew *Fagus sylvatica* i *Rhododendron ponticum* w innej części tego samego obszaru. Choroba jest również obecna na wrzosowiskach, gdzie występuje na porażonych roślinach *Vaccinium myrtillus*. Rozmiar uszkodzeń drzew, krzewów oraz roślin wrzosowatych i wyraźne rozprzestrzenianie się infekcji w porażonych miejscach wskazuje, że choroba stanowi poważne zagrożenie zarówno dla środowisk leśnych, jak i wrzosowisk.

Pierwsze objawy zamierania powodowane przez *P. kernoviae* obserwowano w październiku 2003 roku na wrzosowiskach, w ogrodach i w małej liczbie szkółek, głównie zlokalizowanych w południowo-zachodniej Anglii. Patogen jest również obecny w Szkocji, Irlandii i Nowej Zelandii. Od lutego 2010 roku *P. kernoviae* stwierdzono na *F. sylvatica* (buk zwyczajny), *R. ponticum* (i mieszańcach *Rhododendron*), *Aesculus hippocastanum*, *Castanea sativa*, *Drimys winteri*, *Gevuina avellana* (chilijski orzech laskowy), *Hedera helix*, *Ilex aquifolium*, *Liriodendron tulipifera* (tulipanowiec), *Lomatia myricoides*, *Magnolia* sp., *Michelia doltsopa*, *Pieris* spp., *Podocarpus salignus*, *Prunus laurocerasus*, *Quercus ilex* (dąb ostrolistny), *Q. robur* (dąb szypułkowy), *Sequoiadendron giganteum* i *Vaccinium myrtillus*. W Nowej Zelandii gospodarzem patogena jest *Annona cherimola*.

Na stronie internetowej DEFRA umieszczono aktualną listę roślin żywicielskich: <http://www.fera.defra.gov.uk/plants/plantHealth/pestsDiseases/phytophthora/documents/pKernoviaeHost.pdf>.

¹Użyte w standardach EPP/EPPO nazwy odczynników lub wyposażenia nie znaczą wykluczenia innych, które również mogą być przydatne.

Tożsamość

Nazwa: *Phytophthora kernoviae* Brasier, Beales & S. A. Kirk, sp. nov.

Synonimy: brak

Stanowisko taksonomiczne: *Chromista: Oomycota, Oomycetes, Peronosporales, Peronosporaceae*

Komputerowy kod EPPO: PHYTKE

Kategoria fitosanitarna: alertowa lista EPPO z 2011 roku

Wykrywanie

Objawy chorobowe

Objawy chorobowe powodowane przez *P. kernoviae* mogą być zróżnicowane. W niektórych przypadkach są one podobne do tych, powodowanych przez *P. ramorum*.

Zdjęcia objawów można zobaczyć w ulotce DEFRA na stronie internetowej:

<http://www.fera.defra.gov.uk/plants/publications/documents/factsheets/phytophthoraKernoviaeFactsheet.pdf>

Krzewy

Rhododendron ponticum, *R. catawbiense*, *R. yakushimanum* i ich mieszańce.

Wczesne objawy chorobowe na liściach to czernienie ogonków liściowych, które często rozszerza się u podstawy blaszki liściowej. Nekrozy mogą rozszerzać się na blaszkę liściową, a w zaawansowanych przypadkach obejmować cały liść. Czasami obserwuje się tylko czernienie wierzchołka liścia. Zarówno stare, jak i młode liście wydają się być porażane w równym stopniu i co jest niezwykle dla infekcji różanecznika powodowanych przez gatunki z rodzaju *Phytophthora* liście często opadają w ciągu kilku tygodni od infekcji. Zamieranie i nekroza pędów występują często, a kiedy otoczą one tkankę pędu liście powyżej nekrozy więdną. W przypadku poważnych infekcji mogą zamierać całe krzaki. Infekcja liści i pędów może występować na każdej wysokości lub miejscu krzaka różanecznika.

Pieris spp., *Michelia doltsopa*, *Hedera helix*, *Ilex aquifolium* i *Prunus laurocerasus*

Zamieranie liści podobne do tych, które obserwuje się na różaneczniku. Porażenie na *M. doltsopa* charakteryzuje się rozlewającymi nekrozami na wierzchołku liścia, które rozszerzają się na obrzeża liścia i obejmują blaszkę liściową. Nekrotyczna tkanka liścia ma charakterystyczny ciemny czarno-brązowy kolor. Typowe nekrozy na liściach *Pieris* spp. są zabarwione na kolor jasny do rudobrazowego. Nekrozy rozszerzają się w kierunku nerwów i nerwu głównego powodując widoczne zamieranie blaszki liściowej. Dotychczas, infekcję pędów obserwowano tylko na *H. helix*; ciemne, nekrotyczne plamy obserwowano na *I. aquifolium*, a infekcję liści i zamieranie pędów u *P. laurocerasus*.

Vaccinium myrtillus

Objawy chorobowe to wczesna defoliacja i wielokrotne infekcje pędów, które powodują pasiasty wygląd zdrowych i nekrotycznych części gałązek.

Drzewa

Fagus sylvatica

Początkowe objawy na pniach drzew to krwawiące raki, które obserwuje się powyżej 12 m od poziomu gruntu. Wycieki są zwykle zabarwione na kolor ciemnobrązowy do niebiesko-czarnego i podobne do tych, powodowanych przez *P. ramorum*. Po zdjęciu kory widoczne są pomarańczowo-różowe do różowo-brązowych nekrozy. Zgnilizna czasami obejmuje pierścieniem cały pień drzewa. Starsze raki mogą być lekko zapadnięte.

Quercus robur

Krwawiące raki pnia są podobne do tych, które występują na *F. sylvatica* i mogą być trudne do zaobserwowania zarówno na korze zewnętrznej, jak i wewnętrznej z powodu grubych pofałdowań i łusek kory zewnętrznej dębu. Wycieki mogą występować w miejscach porażonych tkanek i wydobywać się z pęknięć kory, ale jej grubość zapobiega zapadaniu się starszych raków.

Liriodendron tulipifera

Dotychczas stwierdzono tylko jedno porażone drzewo, ale objawy choroby występują na listowiu, gałęziach i pniu. Wielokrotne krwawiące raki tworzą się na pniu do 9 m od poziomu gruntu. Wewnętrzne nekrozy są koloru jasno czekoladowego poprzez ciemnoczekoladowe do niebiesko-czarnych. Raki wykazują tendencję do ograniczonych rozmiarów (średnio 15 x 20 cm), a kora w wyniku wielokrotnych nekroz staje się bardzo mocno pofałdowana. Plamy mogą również rozwijać się na liściach i w tych przypadkach są one ograniczone do ich wierzchołków (średnio 10-15 mm długie) oraz brzegów blaszki liściowej. Tkanki nekrotyczne wysychają i przybierają ciemno czarny kolor. Występuje również zamieranie gałęzi, które ulegają defoliacji.

Castanea sativa/Aesculus hippocastanum

Na kasztanie jadalnym obserwowano tylko objawy na liściach, włączając w to nekrozy wzdłuż nerwu głównego i dowody na to, że infekcja postępuje w kierunku brzegów blaszki liściowej i tworzy nekrotyczne plamy. Na Wyspach Brytyjskich symptomy te były widoczne pod koniec sezonu wegetacyjnego, kiedy liście zaczynają się starzeć. Objawy choroby również obserwowano na kasztanowcu, ale jak dotąd ograniczały się one do listowia.

Quercus ilex

Poważne nekrozy liści i zamieranie związane jest z powstawaniem pędów przybyszowych. Nie obserwowano zapadania kory lub krwawiących raków.

Magnolia spp.

Wyraźne objawy stwierdzono na porażonych pączkach i liściach. Do infekcji dochodzi na całej powierzchni blaszki liściowej, a wielokrotne infekcje są widoczne, jako liczne ciemno brązowe nekrotyczne plamy, które powodują przyszczatość liści. Występuje tendencja do łączenia się plam i przemieszczania infekcji w kierunku nerwu głównego. Kiedy nekrozy są dobrze rozwinięte, to liście stają się wyraźnie cętkowane. Cętki mogą mieć nieregularne

kszały, a nieporażona tkanka pomiędzy nimi staje się chlorotyczna. Infekcje, które mają miejsce na brzegu blaszki liściowej powodują ich zapadanie oraz tworzenie twardej i suchej obręczy. Ogonki liściowe mogą również ulegać infekcji i choroba często postępuje w kierunku podstawy liścia. Porażeniu ulegają również pączki, które przybierają jasno szarozielone zabarwienie.

Drimys winteri

Objawy na liściach są podobne do tych obserwowanych na różaneczniku. Możliwe jest wystąpienie krwawiących raków na pniach.

Procedury próbkobrania

W zależności od tego, jaki rodzaj materiału ma zostać pobrany stosuje się różne metody próbkobrania, które opisano poniżej.

Materiał roślinny

Drzewa (pnie/kłody): na obecność krwawiących raków, z miejsca bezpośrednio wokół wycieku usuwa się korę wewnętrzną aż do momentu, kiedy będzie widoczne pogranicze raka. Fragmenty floemu i ksylemu usuwa się, umieszcza w zamykanym kontenerze lub też małe kawałki wyklada się bezpośrednio na różne podłoża hodowlane.

Pędy/gałęzie: pobiera się kawałki pędu włączając w to pogranicze tkanki chorej i zdrowej, a następnie umieszcza w zamykanej torbie plastikowej z małym kawałkiem wilgotnego papieru w celu zapobieżenia wysychaniu.

Liście: pobiera się 4–6 liści wykazujących odpowiedni zakres objawów chorobowych i umieszcza w zamykanej plastikowej z małym kawałkiem wilgotnego papieru w celu zapobieżenia wysychaniu.

Jeśli to możliwe, wszystkie próbki materiału roślinnego powinny zostać przekazane do laboratorium dnia następnego. Należy zapobiec przegrzaniu lub wysuszeniu próbek przed ich wysyłką. W celu zwiększenia sukcesu w izolacji *P. kernoviae* z materiału roślinnego próbki powinny zostać poddane analizom tak szybko, jak to jest możliwe. Próbki można przechowywać w lodówce (4–10°C) do 7 dni, ale może to zmniejszać prawdopodobieństwo izolacji poszukiwanego organizmu. Przechowywanie przez dłuższy czas w niskich temperaturach może również ograniczać łatwość izolacji *P. kernoviae*.

Woda i gleba

P. kernoviae można wykryć w glebie i w wodzie z zastosowaniem metody pułapkowej z liśćmi różanecznika. Glebę umieszcza się w przezroczystym plastikowym pudełku i pokrywa roztworem soli Petriego lub wodą demineralizowaną (P. Giltrap, informacja ustna, S. Werres, informacja ustna, 2011). Całe, umyte liście różanecznika (odmiana Cunningham White lub *R. ponticum*) lub liście pocięte na małe fragmenty (np. średnio 1,5 x 2,0 cm) wyklada się na powierzchnię wody. Pudełko po przykryciu inkubuje się na stole laboratoryjnym przez 3-6 dni w temp. 18-23°C i świetle (12-16 godz.). Po inkubacji liście wyjmuje się, dezynfekuje ich powierzchnię i wyklada na pożywkę P₅ARPH lub inne odpowiednie podłoża pozwalające na izolację *P. kernoviae*. Liście mogą być również

bezpośrednio poddane badaniu za pomocą testów PCR lub real-time PCR. Warto podkreślić, że metody te są mniej wrażliwe dla *P. kernoviae* aniżeli dla *P. ramorum* (mniej niż 10 zoosporangia dla *P. ramorum*, ale 1000 dla *P. kernoviae*; Jennings, 2008).

Badanie wody w laboratorium można przeprowadzić w taki sam sposób tj. umieszczając liście różanecznika na powierzchni badanej wody. Alternatywnie, w miejscu badania można pocięte liście różanecznika umieścić w muślinowym worku, który następnie mocuje się i umieszcza na powierzchni badanej wody na okres do 3 dni. Następnie liście usuwa się, obmywa i wyklada na pożywki lub poddaje testom molekularnym.

Izolacja

Materiał roślinny

Istnieje wiele alternatywnych metod powierzchniowej dezynfekcji materiału roślinnego, które można zastosować w zależności od rodzaju substratu i analizy, jaka ma być przeprowadzona. Zabiegi z alkoholem, jak również obmywanie wodą sterylną może ograniczyć ilość mikroorganizmów kolonizujących powierzchnię badanego materiału, gdyż *P. kernoviae* jest obecna wewnątrz tkanek.

Wybór metody zależy od:

1. Rodzaju substratu: drobne korzenie lub delikatna blaszka liściowa nie może być traktowana alkoholem, ponieważ zabije on patogena zarówno w korzeniu, jak liściu,
2. Rodzaju metody, jaka ma być zastosowana: metoda hodowlana jest podatna na kontaminację przez inne mikroorganizmy, ale metody molekularne już mniej;
3. Ryzyko wyników fałszywie negatywnych: obmywanie wodą może częściowo usunąć kontaminację powodowaną przez nieposzukiwane organizmy, ale pozostające organizmy mogą hamować *P. kernoviae*, podczas gdy alkohol może usunąć zarówno kontaminanty, jak również *P. kernoviae*.

W Załączniku 1 przedstawiono alternatywne metody dla każdego rodzaju tkanki.

Podłoża hodowlane i inkubacja

Czasami, przy użyciu mikroskopu można obserwować *P. kernoviae* bezpośrednio na zebranych materiale (obecność typowych zoosporangiów). Jeśli nie, to materiał inkubuje się przez 3-5 dni w zamkniętych pudełkach, w których na dnie umieszcza się niewielką ilość wilgotnego papieru w celu indukcji zarodnikowania. W celu izolacji można stosować liczne podłoża hodowlane, które wymieniono w Załączniku 2.

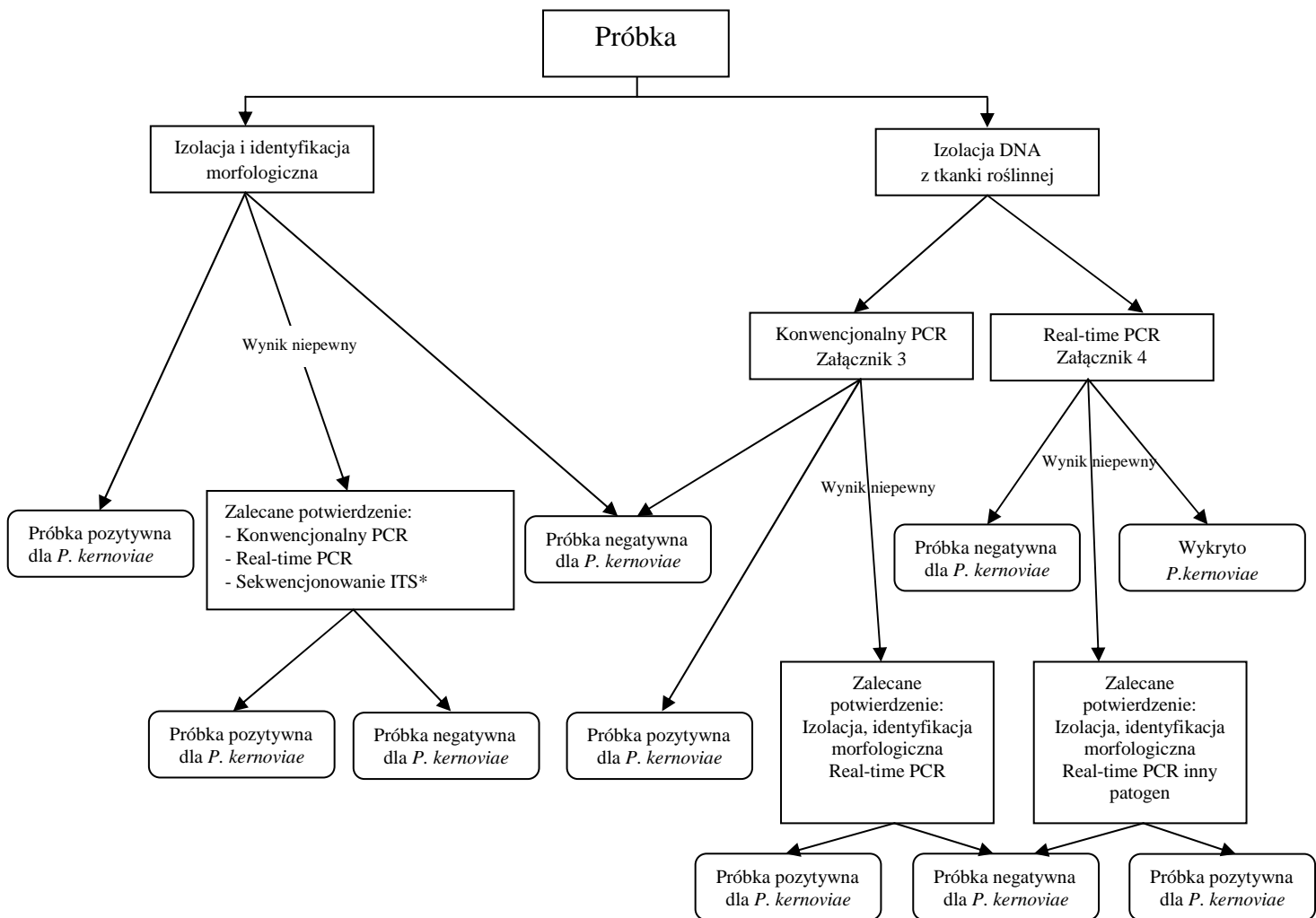
Powszechnie stosowanym jest P₅ARP[H] (Jeffers & Martin, 1986) jako pożywka półselektywna dla *Phytophthora* spp., na której z łatwością można obserwować typowe cechy *P. kernoviae*. Można stosować inne podłoża np. półselektywną pożywkę V8 (Jung i wsp., 1996), pożywkę z wywaru wiśniowego lub agar z kawałkami marchwi, których niskie pH zapobiega szybkiemu rozwojowi bakterii.

Podłoża wzrostu takie, jak V8, agar z kawałkami marchwi, agar z sokiem marchwiowym lub agar kukurydziany mogą być stosowane do przechowywania/badania cech morfologicznych (patrz Załącznik 2).

Po dekontaminacji próbki z użyciem jednej z opisanych wyżej metod, co najmniej 4 małe fragmenty (średnio 2 mm) tkanki z objawami chorobowymi wycina się sterylnym skalpelem i przenosi w aseptycznych warunkach na jedno lub więcej podłoży agarowych wymienionych wyżej. W celu umożliwienia bezpośredniej obserwacji wzrostu strzępek pod mikroskopem fragmenty należy wykładać ok. 2-3 cm od brzegu szalki, które można inkubować na stołach laboratoryjnych w normalnych warunkach światła lub w inkubatorze w świetle (np. 12 h światło/12 h ciemność) w temp. 18-23°C.

Identyfikacja

Dla pozytywnej diagnozy *P. kernoviae* powinna być oznaczana do gatunku na podstawie charakterystyki wzrostu kultury i morfologii lub przez użyciu metod molekularnych (patrz, ryc.1). W przypadkach wątpliwych zaleca się przeprowadzenie badań metodami uzupełniającymi (patrz, ryc.1). Tożsamość kultur wyizolowanych z nowych gospodarzy lub te kultury, które nie pasują do opublikowanych opisów można potwierdzić przez sekwencjonowanie. Do tego celu używa się czystych izolatów patogena.

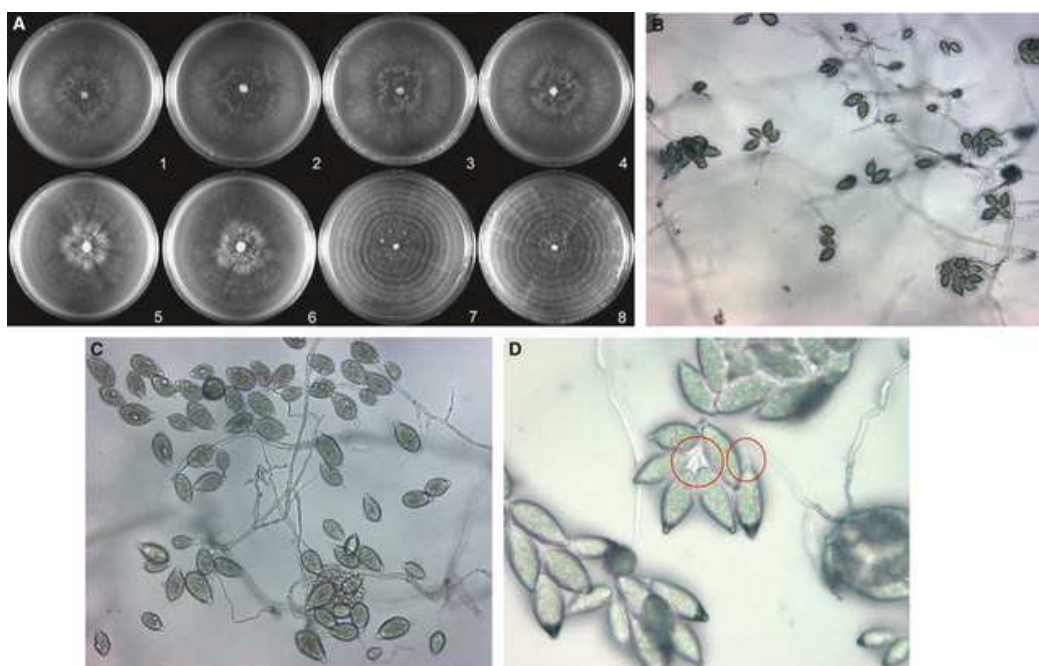


*Tożsamość izolatów *P. kernoviae* z nowych roślin żywicielskich niepasujące morfologicznie do opublikowanych opisów mogą być potwierdzone przez sekwencjonowanie

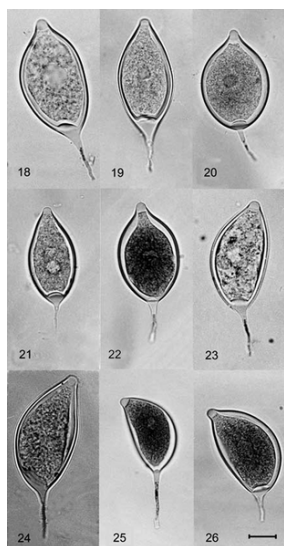
Rys. 1. Schemat decyzyjny do identyfikacji *P. kernoviae* z roślin i produktów roślinnych.

Charakterystyka wzrostu w kulturze i morfologia

Najbardziej istotne cechy morfologiczne obserwowane na selektywnych i półselektywnych podłożach przedstawiono w tabeli 1. Odnoszą się one zarówno do cech młodych kultur rosnących bezpośrednio z materiału roślinnego wyłożonego na agarze, jak i świeżo oczyszczonych kulturach. W celu utrzymania patogeniczności *P. kernoviae* i cech diagnostycznych w kulturach powinny one być regularnie (średnio, co 6-8 tygodni) poddawane inokulacji z użyciem świeżych liści różanecznika, następnie reizolowane z rozwiniętych nekroz i oczyszczane. W Fera (Wielka Brytania), oczyszczoną kulturę przeszczepia się na pożywkę z kawałkami marchwi i alternatywnie na 10% agar V8 w celu przedłużenia aktywności i wzmożonego zarodnikowania patogena. Brasier i wsp. (2005) oraz K. Heungens (informacja ustna) donoszą, że patogen dobrze zarodnikuje, kiedy inokulum z pożywki marchwiowej lub V8 zanurzy się w niesterylnej wodzie ze stawu lub w roztworze glebowym. W Załączniku 3 opisano dwie metody indukowania zarodnikowania. Do badania czystych kultur nie zaleca się stosowania P₅ARP[H], ponieważ zarodnikowanie po drugim i trzecim przeszczepieniu jest coraz słabsze. Na ogół unikalne cechy morfologiczne, opisane poniżej czynią *P. kernoviae* względnie łatwym organizmem do identyfikacji, kiedy rośnie on z materiału roślinnego na podłożach półselektywnych (np. P₅ARP[H] lub na pożywce z wywaru wiśniowego). W Fera, (Wielka Brytania), wszystkie cechy opisane poniżej obserwowano na ponad 2000 izolatów inkubowanych na stołach laboratoryjnych (18-23°C) w normalnych warunkach światła dziennego. Charakterystyka wzrostu na agarze i cechy morfologiczne opisane przez Brasier i wsp. (2005) można obserwować na następujących zdjęciach fot. 2A do 4.



Fot. 2. (A) Typy kolonii *P. kernoviae*. Szalki 1–4: po 10 dniach w 20°C na agarze marchwiowym w kompletnej ciemności. Szalki 5–6: po 10 dniach w 20°C na agarze marchwiowym z niewielką ekspozycją na światło przez 7 dni w celu wykonania pomiarów kolonii. Szalki 7–8: po 10 dniach na agarze marchwiowym w pokojowej temperaturze otoczenia (około 23°C) w świetle dziennym (temperatury jak podaje Brasier i wsp., 2005, zdjęcia dzięki uprzejmości Fera, Wlk. Brytania). (B) Widoczne pod 100x powiększeniem liczne zarodnikowanie na P₅ARP(H) z wyciętych nekroz (dzięki uprzejmości Fera, Wlk. Brytania). (C) Liczne odpadające zoosporangia pod powiększeniem 200x (dzięki uprzejmości Fera, Wlk. Brytania). (D) Grona zoosporangiów pod powiększeniem 200x (zbliżenie) odpadające zakreślone (dzięki uprzejmości Fera, Wlk. Brytania).



Fot.3. Reprezentatywne zoosporangia *P. kernoviae*. Fot. 18–22: regularne, jajowate, w kształcie cytryny. Fot. 23–26: asymetryczne lub kształtu myszy. Bar = 10 mm (z Brasier i wsp., 2005)



Fot. 4. Struktury generatywne *P. kernoviae* na agarze marchwiowym po 10 dniach inkubacji. Oogonia (śr. 23,5–25,5 μm); amfigeniczne anteridia i plerotyczne oospory (śr. 19–25 μm), średnia grubość ściany ok. 3,5 μm , zakres grubości 3,5–5 μm (dzięki uprzejmości A. Schlenzig, Science and Advice for Scottish Agriculture, GB).

Tabela 1. Charakterystyczne cechy wzrostu młodych kultur *Phytophthora kernoviae* na podłożach selektywnym i półselektywnym oraz cechy morfometryczne (wymiary wg Brasier i wsp. 2005).

Cecha	P ₅ ARP(H) ^a (wycięte z nekroz)	Agar z kawałkami marchwi ^b
	^a Na P ₅ ARP(H) można obserwować cechy po upływie 4–6 dni inkubacji na stole laboratoryjnym w temp. ok. 18–23°C, świetle dziennym. Typowe cechy są widoczne najlepiej, kiedy <i>P. kernoviae</i> wyrasta z fragmentów nekroz porażonego materiału roślinnego wyłożonych na podłoża agarowe.	
	^b Na agarze z kawałkami marchwi po upływie 3–5 dni w temp. ok. 20°C.	
	^c Zgrubienia plechy obserwowano na agarze kukurydzianym (N. Schenck, ustna informacja, 2010).	
Kolonia	Relatywnie szybko rosnąca, ok. 2–4 mm na dzień	Słaby wzór podobny do róży, wyraźne koncentryczne pierścienie, zobacz fot.2A w dziennym świetle, wzrost średnio 3,8–4,6 mm na dzień w ciemności.
Plecha	Lekko gruzełkowata rosnąca wewnątrz pożywki ze słabym wzrostem powierzchniowym, bez zgrubień strzępkowych ^c	Strzępki powierzchniowe zwarte, generalnie bez zgrubień strzępkowych
Zarodnie pływkowe	Tworzą się licznie na powierzchni agaru, ale czasami w agarze. Brodawkowe, regularne, jajowate, lub cytrynkowate do wyraźnie asymetrycznych i kształtu myszy. Wielkość: zakres wielkości: 38,5–45,5 x 22,5–27 μm , średnia wielkość: 34–52 x 19–31 μm ; średni stosunek długości do szerokości 1,5 μm . Odpadające, długość trzonka – zakres wielkości: 8,6–14,1 μm , średnia długość: 5–19 μm (fot. 3). Wiele zarodni posiada wyraźną wakuolę.	
Chlamydospory	Nie obserwowano	Nie obserwowano
Struktury generatywne	Homotaliczny, gametangia tworzą się już po 10 dniach na agarze marchwiowym lub z kawałkami marchwi. Oogonia: średnio 23,5–25,5 μm , zakres wielkości 21–28 μm . Anteridia amfigeniczne. Oospory: plerotyczne, średnio 21,1–22,5, zakres wielkości 19–25 μm (fot. 4), grubościennie: średnio ok. 3,5 μm , zakres wielkości od 3,5 do 5 μm .	

^a Na P₅ARP(H) cechy można obserwować po 4–6 dniach inkubacji na stole laboratoryjnym w temp. ok. 18–23°C i świetle dziennym. Typowe cechy są najlepiej widoczne kiedy *P. kernoviae* wyrasta z porażonych fragmentów wyłożonych na podłoża agarowe.

^b Na agarze z kawałkami marchwi cechy są widoczne po 3–5 dniach inkubacji, w temp. ok. 20°C.

^c Zgrubienia strzępkowe obserwowano na agarze kukurydzianym (N. Schenck, informacja ustna, 2010).

Metody molekularne

Do wykrywania *P. kernoviae* z kultur, próbek gleby i wody, jak również bezpośrednio z roślin opracowano i wykorzystano kilka metod molekularnych. Do celów niniejszego protokołu zwalidowano tylko technikę PCR i real-time PCR.

Dalsze potwierdzenie, włączając w to sekwencjonowanie regionu ITS (używając izolatów z czystych kultur) przedstawiono w Załączniku 6. Należy zauważyć, że dotychczas poddane sekwencjonowaniu izolaty *P. kernoviae* pochodzące z Nowej Zelandii (Ramsfield i wsp., 2007) różnią się jedną parą zasad od sekwencji autentycznego typu *P. kernoviae*, którą zdeponowano w Banku Genów (AY940661).

Materiał referencyjny

Izolaty:

p1553	z kory <i>Fagus sylvatica</i>	Forest Research <i>Phytophthora</i> Collection
2166	z <i>Rhododendron</i> sp. Kornwalia, Wielka Brytania	FERA <i>Phytophthora</i> Culture Collection
2444	z <i>R. catawbiense</i> , Cheshire, Wielka Brytania	FERA <i>Phytophthora</i> Culture Collection
2528	ICMP 14761 Mark Braithwaite	MAF, New Zealand and FERA <i>Phytophthora</i> Culture Collection

Bank Genów numery akcesyjne: izolat Wielka Brytania: AY940661; izolat Nowa Zelandia: EU909457

Sprawozdawczość i dokumentacja

Wskazówki dotyczące sprawozdawczości i dokumentacji przedstawiono w standardzie EPPO PM 7/77 (1) *Sprawozdawczość i dokumentowanie wyników badań*.

Kryteria walidacji

Jeśli kryteria walidacji są dostępne, to przedstawiono je z wraz z opisem metody. Dane walidacyjne są również umieszczone w bazie danych ekspertyz diagnostycznych EPPO (<http://dc.eppo.int>). Zaleca się korzystanie z bazy danych, jako dodatkowego źródła informacji (np. więcej szczegółowych danych dotyczących analitycznej specyficzności, pełne raporty walidacji).

Informacje dodatkowe

Więcej informacji o tym organizmie można uzyskać od: (zachowana wersja angielska (przyp. tłum.)) Food and Environment Research Agency, York YO4186 1LZ, England, GB (fax: 44 1904 462111, tel: 44 1904 462000, email: paul.beales@fera.gsi.gov.uk)

Opinie dotyczące niniejszego protokołu diagnostycznego

Jeśli macie Państwo jakieś opinie dotyczące niniejszego protokołu diagnostycznego albo opisanych metod, lub też możecie dostarczyć dodatkowe dane z ich walidacji do udostępnienia, prosimy o kontakt e-mail: diagnostics@eppo.int.

Rewizja protokołu

Każdego roku protokoły diagnostyczne poddawane są przeglądom w celu określenia potrzeby wniesienia poprawek. Te, które zostaną zidentyfikowane, jako ich wymagające są oznaczone na stronie internetowej EPPO. Kiedy spis literówek i omyłek znajduje się już w druku, to również taka informacja umieszczona zostaje na stronie internetowej EPPO.

Podziękowania

Protokół oryginalnie został opracowany przez (zachowana wersja angielska (przyp. tłum.)) P. Giltrap, K. Webb and J. Tomlinson, Food and Environment Research Agency, York, GB.

Materiały źródłowe (zachowana wersja angielska (przyp. tłum.))

- Brasier C.M., Beales P.A., Kirk S.A., Denman S. & Rose J., (2005) *Phytophthora kernoviae* sp. nov., an invasive pathogen causing bleeding stem lesions on forest trees and foliar necrosis of ornamentals in the UK. *Mycological Research* 109, 853–859.
- Hughes K.J.D., Tomlinson J.A., Griffin R.L., Boonham N., Inman A.J. & Lane C.R., (2006) Development of a one-step real-time PCR assay for diagnosis of *Phytophthora ramorum*. *European Journal of Plant Pathology* 96, 975–981.
- Hughes K.J.D., Tomlinson J.A., Giltrap P.M., Barton V., Hobden E., Boonham N. & Lane C.R., (2011b) Development of a real-time PCR assay for detection of *Phytophthora kernoviae* and comparison of this method with a conventional culturing technique. *European Journal of Plant Pathology* 131, 695–703.
- Jeffers S.N. & Martin S.B., (1986) Comparison of two media selective for *Phytophthora* and *Pythium* species. *Plant Disease* 70, 1038–1043.
- Jung T., Blaschke H. & Neumann P., (1996) Isolation, identification and pathogenicity of *Phytophthora* species from declining oak stands. *European Journal of Forest Pathology* 26, 253–272.
- Jennings P., (2008) Investigation of dry-heat treatment methods for sanitization of *P. ramorum* and *P. kernoviae* on/in plants. Defra Project PHE/2122B. Final Report.
- Kröber H., (1985) Erfahrungen mit *Phytophthora* de Bary und *Pythium* Pringsheim. *Mitteilungen der Biologischen Bundesanstalt für Land- und Forstwirtschaft Berlin-Dahlem* 225, 12, 18–22, 31–90.
- Robin C., Desprez-Loustau M.L., Capron G. & Delatour C., (1998) First record in France and pathogenicity of *Phytophthora cinnamomi* on cork and holm oak. *Annals of Forest Science* 55, 869–883.
- Ramsfield T.D., Dick M.A., Beever R.E. & Horner I.J., (2007). *Phytophthora kernoviae* - of Southern Hemisphere Origin 4th IUFRO *Phytophthoras* in Forests & Natural Ecosystems, August, 2007.
- Schena L., Hughes K.J.D. & Cooke D.E.L., (2006) Detection and quantification of *Phytophthora ramorum*, *P. kernoviae*, *P. citricola* and *P. quercina* in symptomatic leaves by multiplex real-time PCR. *Molecular Plant Pathology* 7, 365-379.
- Schlenzig A., (2011) A duplex PCR method for the simultaneous identification of *Phytophthora ramorum* and *Phytophthora kernoviae*. *Bulletin OEPP/EPPO Bulletin* 41, 27-29.
- Werres S., Marwitz R., Man i't Veld W.A., de Cock A.W.A.M., Bonants P.J.M., de Weerd M., Themann K., Ilieva E. & Baayen R.P., (2001) *Phytophthora ramorum* sp. nov., a new pathogen on *Rhododendron* and *Viburnum*. *Mycological Research* 105, 1155 -1165.

- Werres S. & Ziehlke B. (2003) First studies on the pairing of *Phytophthora ramorum*. Journal of Plant Diseases and Protection 110, 129-130.
- White T.J., Bruns T., Lee S. & Taylor J.W., (1990) Amplification and direct sequencing of fungal ribosomal RNA genes for phylogenetics. In PCR Protocols: A Guide to Methods and Applications (eds. Innis M.A., Gelfand D.H., Sninsky J.J., White T.J.), pp. 315-322. Academic Press, Inc., New York, NY.

Załącznik 1. Techniki mycia i dezynfekcji

Techniki mycia i dezynfekcji nadziemnych części rośliny

Przecieranie alkoholem

Powierzchnię wybranej tkanki roślinnej szybko przetrzeć wataż zamoczoną w 70% etanolu, pobrać drobne fragmenty materiału i przenieść w warunkach aseptycznych na pożywkę selektywną. Ze zdrewniałych pędów usunąć korę przed wyłożeniem materiału na pożywkę.

Obmywanie wodą

Odpowiednie części roślin (zawierające pograniczne tkanki zdrowej i chorej), umieścić w torbie plastikowej i dodać ok. 20-50 ml wody destylowanej. Moczyć próbkę przez kilka minut, wstrząsać próbkę w torbie przez 10 sekund, usunąć wodę, powtórzyć obmywanie i przenieść materiał roślinny na podłoże selektywne.

Zabieg z podchlorynem sodu

Umieścić materiał w roztworze aktywnego podchlorynu sodu (stężenie od 0,5 do 1%) na 2-5 min. w komorze laminarnej, dwukrotnie obmyć wodą destylowaną sterylną, ostrożnie wysuszyć (z użyciem bibuły filtracyjnej) i przenieść w warunkach aseptycznych na podłoże wymienione poniżej w 'Podłoża i inkubacja'.

Pędy: przygotować, co najmniej trzy fragmenty, jeden z ciemnobrązowej części pędu, jeden z pogranicza tkanki zdrowej i chorej i jeden ze zdrowo wyglądającej tkanki zaraz poniżej nekrozy.

Liście: z pogranicza nekrozy lub plamy wyciąć fragmenty o średniej wielkości 0,5 x 0,5 cm.

Techniki dezynfekcji/obmywania materiału z podstawy pnia/korzeni lub silnie skontaminowanych próbek

Opłukiwanie wodą

Metoda ta produkuje duże ilości skontaminowanej wody i powinna być stosowana tylko wówczas, kiedy może zostać poddana sterylizacji po obmywaniu. Pobrane odpowiednie fragmenty tkanki, włączając w to pograniczne tkanki zdrowej i chorej umieścić w 250 ml kolbie z bocznym tubusem, a otwór przykryć porowatym materiałem (np. muślinem, sitkiem o drobnych oczkach, parafilmem z drobnymi dziurkami). Podłączyć kolbę do wody wodociągowej pod ciśnieniem i opłukiwać wodą, przez co najmniej 2 godz. W warunkach aseptycznych, przenieść co najmniej cztery fragmenty na odpowiednie podłoże hodowlane.

Obmywanie w worku polietylenowym

Pobrane odpowiednie fragmenty tkanki, włączając pograniczne tkanki zdrowej i chorej, umieścić w małej torbie plastikowej i dodać ok. 50 ml wody. Dobrze wymieszać, a następnie wodę usunąć i pozostawić fragmenty tkanki w torbie. Dodać 50 ml wody i obmywać

ponownie. Powtarzać obmywanie do czasu, kiedy woda jest czysta. W warunkach aseptycznych przenieść fragmenty tkanki na podłoże półselektywne.

Dezynfekcja z użyciem alkoholu

Pędy: pobrać większe fragmenty (min.10x10cm) i wysłać do laboratorium. W laboratorium zanurzyć fragmenty w 70% alkoholu, pozwolić im wyschnąć, a następnie wyciąć drobne fragmenty i umieścić przez zagłębienie w selektywnym podłożu (w przeciwieństwie do umieszczenia na powierzchni pożywki). Ewentualnie, wyciąć drobne fragmenty ze strefy kambium i (w miejscu pobrania próbki) umieścić je bezpośrednio na agarze z kawałkami marchwi lub na podłożu selektywnym.

Załącznik 2. Podłoża

Podłoża do izolacji *Phytophthora kernoviae*

Wszystkie podłoża sterylizuje się w autoklawie przez 15 min., w temperaturze 121°C.

P₅ARP[H] (Jeffers & Martin, 1986)

Agar kukurydziany	17,0 g
Pimaricin	5,0 mg
Ampicillin (sól sodowa)	250 mg
Rifampicin (rozpuścić w 1 ml 95% etanolu)	10 mg
PCNB	100 mg
Hymexazol (30% substancji aktywnej) (końcowe stężenie 22,5 ppm)	75 mg
Uzupełnić wodą destylowaną do	1000 ml

Oziębic podłoże w łaźni wodnej w temp. 50°C. Przygotować pimaricin, ampicillin (sól sodowa), rifampicin, PCNB, hymexazol i rozpuścić wszystko w 10 ml wody destylowanej sterylnej. Dodać do schłodzonego podłoża i rozlać do szalek. W celu optymalnego użycia przechowywać szalki w ciemności, przez 7 dni w temp.4°C. P₅ARP: jeśli hymexazol nie jest dostępny, wówczas można użyć PARP.

PARB [H] (Robin i wsp., 1998)

Agar	20,0 g
Maltoza	15,0 g
Pimaricin	10,0 mg
Ampicillin (sól sodowa)	250 mg
Rifampicin (rozpuścić w 1 ml 95% etanolu)	10 mg
Benlate (50% Benomyl)	15,0 mg
Tachygaren (75% Hymexazol)	50 mg
Uzupełnić wodą destylowaną do	1000 ml

Oziębic podłoże w łaźni wodnej w temp. 50°C. Następnie przygotować pimaricin, ampicillin, rifampicin, benlate, tachygaren i rozpuścić w 10 ml wody destylowanej sterylnej. Dodać do schłodzonego podłoża.

Półselektywne podłoże V8: (Jung i wsp., 1996, zmodyfikowane)

Agar	20,0 g
CaCO ₃	3,0 g
Sok wielowarzywny V8	100 ml
Pimaricin	0,02 g
Ampicillin	0,2 g
Rifampicin	0,01 g
PCNB	0,025 g
Nystatin	0,05 g
Hymexazol	0,05 g
Woda destylowana	900 ml

Po oziębieniu do 50°C dodać pimaricin, ampicillin, rifampicin, PCNB, nystatin i hymexazol.

Pożywka z wywaru wiśniowego (Cherry decoction agar (CHA))

Agar	60,0 g
Sok wiśniowy	400 ml
Woda destylowana	3600 ml

Przefiltrować sok wiśniowy przez muślin i doprowadzić pH do 4,4 z użyciem KOH. Najpierw rozpuścić agar, a następnie dodać sok wiśniowy. Autoklawować w 102°C, przez 5 min.

Agar marchwiowy (Carrot agar (CA))

Agar	20,0 g
Marchew	400 g
Woda destylowana	900 ml

Obmyć marchew i pociąć na drobne kawałki. Autoklawować przez 10 min. w 400 ml wody. Marchew i płyn tworzą jednolitą mieszanę. Dodać 500 ml wody, 20 g agaru i autoklawować.

Agar z kawałkami marchwi (Carrot piece agar (CPA)) (Werres i wsp. 2001)

Agar	22,0 g
------	--------

Marchew	50 g
Woda destylowana	1000 ml

Roztwór soli Petri

Azotan wapnia ($\text{Ca}(\text{NO}_3)_2$)	0,4 g
Siarczan magnezu ($\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$)	0,15 g
Diwodorofosforan potasu (KH_2PO_4)	0,15 g
Chlorek potasu (KCl)	0,06 g
Woda destylowana	1000 ml

Podłoża do badań taksonomicznych i utrzymania kultur

Wszystkie autoklawowane przez 15 min., w temperaturze 121°C.

Agar z kawałkami marchwi (zobacz wyżej)

Agar z 5% sokiem marchwiowym (Carrot juice agar 5% (CJA) (Kröber, 1985)

Agar	15 - 22 g
Sok z marchwi (bez miodu)	50 ml
Woda destylowana	950 ml

Ciemny agar marchwiowy (Dark carrot agar (DCA) (przepis Fera)

Marchew	200 g
Agar Oxoid nr 3	15 g
Woda destylowana	1000 ml

Plasterki świeżej marchwi zmiksować w blenderze z 500 ml wody destylowanej na najwyższych obrotach, przez 1 min. Przefiltrować przez cztery warstwy gazy i wycisnąć sok z pozostałości. Filtrat uzupełnić wodą do 1000 ml i dodać agar. Rozgrzać w celu rozpuszczenia agaru, rozlać do butelek i autoklawować.

Agar V8 10% (przepis Fera)

Sok V8	100 ml
Agar Oxoid nr 3	20 g
0,1M KOH (0,14 g w 25 ml H_2O)	25 ml
CaCO_3	1,0 g
Woda destylowana	875 ml

Załącznik 3. Metody stymulacji zarodnikowania

Metoda stosowana w Instytucie Juliusza Kühn (S. Werres, informacja ustna, 2012)

Inokulum pobrane z krawędzi rosnącej kolonii *P. kernoviae* umieścić w centrum szalki Petriego z agarem z kawałkami marchwi. Inkubować w temp. ok. 20°C i świetle (16 godz.). Po 7 dniach inkubacji sprawdzić obecność zoosporangiów z użyciem mikroskopu. Jeśli stwierdzono wystarczającą liczbę zoosporangiów, to dodać na powierzchnię kolonii 0,5 ml wody demineralizowanej sterylnej i rozprowadzić ostrożnie szpatułką Drigalskiego (głaszczką) po całej kolonii i powierzchni agaru (jest ważne, aby zoosporangia było dobrze rozprzestrzenione). Ponownie inkubować w temp. ok. 20°C i świetle przez 16 godz. Po następnych 7 dniach inkubacji, otworzyć szalkę Petriego i dodać 5–7 ml demineralizowanej wody sterylnej na powierzchnię. Inkubować szalkę Petriego w lodówce (w 4–8°C) w ciemności przez ok. 1 godz. Następnie inkubować w temperaturze pokojowej (ok. 20°C) przez 30 min. do 1 godz. (sprawdzić wzrost widocznej mętności w celu monitorowania postępu uwalniania się zoospor: maksymalne uwalnianie ma miejsce zwykle po 1 godz.). Należy zauważyć, że uwolnione zoosporozycyony zaczynają bardzo szybko kiełkować, zatem inkubacja dłuższa niż 1 godz. w temp. pokojowej jest niesprzyjająca, jeśli potrzebne są zoosporozycyony. Zebrać supernatant i określić liczbę zoosporozycyony. Zwykle stwierdza się średnią liczbę ok. 1×10^6 zoosporozycyony ml⁻¹ (w pierwszych badaniach [*n*=9] liczba zoosporozycyony mieściła się pomiędzy 37 500 i $2,45 \times 10^6$).

Metoda stosowana w Fera (P. Giltrap, informacja ustna, 2012)

1. Inokulować szalkę zarodnikującą kulturą *P. kernoviae* rosnącą na 10% agarze V8 przez 12 godz. świetle i temp. ok. 20°C.
2. Do szalki dodać 10 ml demineralizowanej wody sterylnej i rozprowadzić zoosporangia sterylną głaszczką. Przenieść 100 µl zawiesiny zoosporangiów do nowej szalki z 10% agarem V8 i rozetrzeć na powierzchni agaru.
3. Inkubować w temp. ok. 20°C, a przez 3 doby utrzymywać 12 godz. naświetlanie. (Badania prowadzone w Fera wykazały, że z wiekiem zoosporangia uwalniają mniej zoosporozycyony. Metoda ta pozwala, aby inokulowane zoosporangia kiełkowały, produkowały zoosporangia w podobnym wieku, z których zoosporozycyony mogą być uzyskiwane. Nie używać rozartych szalek, starszych niż 5 dni.
4. Po 3–5 dniach inkubacji, zalać rozartą szalkę 15 ml demineralizowanej wody sterylnej, schłodzić szalki w –20°C przez 5 min. tylko i inkubować w temperaturze pokojowej przez 1 godz.
5. Sprawdzić uwalnianie zoosporozycyony pod mikroskopem, a następnie przefiltrować zawiesinę przez bibułę Whatman nr 113V (rozmiar przepływu >30 µm). Jeśli technika ta jest niedostępna, to zastosować 8 warstw chusteczek do okularów.
6. Zwykle stwierdza się średnią liczbę $3,4 \times 10^5$ zoosporozycyony ml⁻¹ na szalkę.

Załącznik 4. Identyfikacja do gatunku za pomocą konwencjonalnego PCR (Schlenzig, 2011)

1. Informacje ogólne (Schlenzig, 2011)

1.1. Startery PCR i sondy zostały zaprojektowane do wykrywania wewnętrznych sekwencji niekodujących (ITS) *P. kernoviae*.

1.2. Źródło kwasu nukleinowego: czysta kultura. Test nie został w pełni zwalidowany na tkance roślinnej (patrz pkt.4).

1.3. Wielkość amplikonu wynosi 469 par zasad.

1.4. Oligonukleotydy do wykrywania *P. kernoviae*:

Starter (forward) Pkern60F: 5'-TCCTCGTTGGCAGTTTCGAC-3'

Starter (reverse) PkernR1: 5'-CACAACCTACATTCTGCACAGC-3'

1.5. PCR może być przeprowadzony z użyciem polimerazy *Taq* DNA (Sigma Aldrich) w stężeniu 0,65 U na 20 µl reakcji (końcowe stężenie wynosi 0,0325 U µl⁻¹).

1.6. Końcowe stężenie każdego nukleotydu powinno wynosić 0,125 mM.

1.7. Bufor PCR dostarczony razem z polimerazą powinien być użyty w stężeniu końcowym 1x.

1.8. PCR może być przeprowadzony na każdym odpowiednim termocyklerze.

2. Metody

2.1. Ekstrakcja kwasu nukleinowego

Ekstrakcję DNA z czystych kultur można przeprowadzić z użyciem komercyjnego zestawu np. NucleoSpin Plant kit do ekstrakcji (Macherey & Nagel, Düren, Niemcy) lub DNeasy Plant kit (Qiagen, Hilden, Niemcy), zgodnie z instrukcjami producenta. DNA może być przechowywane w temp. -20°C.

2.2. Reakcja łańcuchowa polimerazy (PCR)

Mieszanka reakcyjna (master mix)

Odczynnik	Stężenie robocze	Objętość na reakcję (µl)	Stężenie końcowe
Woda do analiz molekularnych	-	14,2	-
Bufor PCR	10x	2	1x
dNTPs	10 mM	0,25	0,125 mM
Pkern60F	10 µM	0,4	0,2 µM
PkernR1	10 µM	0,4	0,2 µM
Taq DNA polymerase	5 U µl ⁻¹	0,13	0,65 U
Suma częściowa		18	
DNA		2	
Suma całkowita		20	

2.3. Parametry PCR: początkowa denaturacja w 94°C przez 2 min.; 30 cykli denaturacji w 94°C przez 30 sek., przyłączanie w 57°C przez 30 sek., wydłużanie w 72°C przez 30 sek.; i końcowe wydłużanie w 72°C przez 5 min.

3. Istotne informacje proceduralne

3.1. Kontrole

W celu uzyskania miarodajnych wyników badań następujące (zewnętrzne) kontrole powinny zostać włączone do każdej serii izolacji kwasu nukleinowego i amplifikacji odpowiednio poszukiwanego organizmu i badanego kwasu nukleinowego.

- Negatywna kontrola izolacji (NKI) służy do monitorowania kontaminacji podczas procesu ekstrakcji kwasu nukleinowego: ekstrakcji kwasu nukleinowego i następującej amplifikacji czystego buforu ekstrakcyjnego.
- Pozytywna kontrola izolacji (PKI) służy do zapewnienia jakości i ilości izolowanego kwasu nukleinowego: ekstrakcja kwasu nukleinowego i następująca amplifikacja poszukiwanego organizmu lub próbki zawierającej poszukiwany organizm (np. naturalnie porażona tkanka roślinna lub tkanka roślinna skontaminowana przez poszukiwany organizm).
- Negatywna kontrola amplifikacji (NKA) służy do wykluczenia fałszywie pozytywnych próbek z powodu ich kontaminacji podczas przygotowania mieszaniny reakcyjnej: do przygotowania mieszaniny reakcyjnej została użyta woda wolna od nukleaz.
- Pozytywna kontrola amplifikacji (PKA) służy do monitorowania efektywności amplifikacji: amplifikacja kwasu nukleinowego badanego organizmu. Może ona włączać kwas nukleinowy wyizolowany z badanego organizmu, całkowity kwas nukleinowy wyizolowany z porażonej tkanki roślinnej, całe genomowe amplifikowane DNA lub syntetyczną kontrolę (np. sklonowany produkt PCR).

Interpretacja wyników

Weryfikacja kontroli:

- NKI i NKA nie powinny produkować amplikonów.
- PKI and PKA powinny dać amplikony o wielkości 469 pz.

Kiedy warunki te zostały spełnione:

- Test będzie uznany za pozytywny, jeśli obserwuje się amplikon o wielkości 469 pz.
- Test będzie uznany za negatywny, jeśli nie obserwuje się prążków lub mają one inną wielkość.
- Test należy powtórzyć, jeśli uzyskane wyniki są sprzeczne lub niejasne.

4. Dostępne kryteria walidacji

4.1. Czulość analityczna: zbadana seria rozcieńczeń DNA wyizolowanego z czystej kultury *P. kernoviae* wykazała, że granica wykrywalności na reakcję wynosi ok. 2 pg DNA. Czulość analityczna nie została dotychczas ustalona dla ekstraktu roślinnego, ale dalsza walidacja będzie prowadzona w celu jej ustalenia.

4.2. Specyficzność analityczna: nie obserwowano reakcji krzyżowych podczas badania DNA wyizolowanego z kultur następujących gatunków:

P. citrophthora, *P. heveae*, *P. citricola*, *P. nicotianae*, *P. cryptogea*, *P. gonapodyides*, *P. cactorum*, *P. drechsleri*, *P. syringae*, *P. ideai*, *P. cambivora*, *P. cinnamomi*, *P. infestans*, *P. rubi* i *P. ramorum*.

Załącznik 5. Identyfikacja do gatunku metodą łańcuchowej reakcji polimerazy w czasie rzeczywistym (real-time PCR)

A) Badanie spokrewnionego regionu białek ras (*Ypt1*) (Skena i wsp., 2006)

1. Informacje ogólne

1.1. Skena i wsp., (2006) opracował multiplex real-time PCR oparty na genie (*Ypt1*) spokrewnionych białek ras do wykrywania *P. ramorum*, *P. kernoviae*, *P. citricola* i *P. quercina* w porażonym materiale roślinnym. Odnośnie *P. kernoviae*, to gatunek ten tworzy w teście amplikon o wielkości 78 pz ze starterami Yptc3F (forward) i Yptc4R (reverse) i przy użyciu sondy (YptcP) Taqman znakowanej barwnikiem fluorescencyjnym (reporter) przy końcu 5' i na końcu 3' przyłączonym wygaszaczem (Black Hold Quencher (BHQ)).

1.2. Źródło kwasu nukleinowego: materiał roślinny i czyste kultury.

1.3. Sekwencja starterów i sondy:

- Yptc3F: 5' GCT CCA AAT TGT ACG TCT CCG 3'
- Yptc4R: 5' AAC CAA TTA GTC ACG TGC TGA TAT AAA 3'
- YptcP: Fluorophore -5' ATC ATA GCC CTT CCC AGA AGC TGT CAC A 3'-BHQ

1.4. Real-time PCR można przeprowadzić stosując odczynniki w zestawach handlowych gotowych do użycia mieszanin reakcyjnych lub z samodzielnie przygotowanej mieszaniny reakcyjnej i na każdym termocyklerze do PCR w czasie rzeczywistym. Do znakowania sond takich, jak FAM, YakimaYellow[®] mogą być użyte odmiany barwników fluorescencyjnych.

2. Metoda

2.1. Ekstrakcja kwasu nukleinowego

Drobne fragmenty tkanki roślinnej wycina się z pogranicza podejrzanych nekroz i poddaje homogenizacji. Można zastosować różne metody rozcierania takie, jak młynki i tłuczek z ciekłym azotem, homogenizator z kulkami lub Homex firmy Bioreba, które dostarczą jednorodnie rozartą próbkę. Ekstrakcję DNA można przeprowadzić z użyciem komercyjnych zestawów np. kit do ekstrakcji NucleoSpin Plant (Macherey & Nagel) lub kit DNeasy Plant kit (Qiagen), zgodnie z instrukcją producenta. Do izolacji DNA z kultur można zastosować te same procedury. DNA przechowujemy w temperaturze -20°C.

2.2. Łańcuchowa reakcja polimerazy w czasie rzeczywistym (real-time PCR)

Mieszanina reakcyjna (Master mix)

Odczynnik	Stężenie robocze	Objętość na reakcję (µl)	Stężenie końcowe
Woda do analiz molekularnych	-	7,915	-
Bufor reakcyjny (qPCR TM Core Kit, Eurogentec)	10x	1,5	1x
MgCl ₂	25 mM	3,0	5 mM
dNTPs	10 mM	0,3	0,2 mM
Yptc3F F	10 µM	0,495	0,33 µM
Yptc4R	10 µM	0,495	0,33 µM

YptcP	10 μM	0,195	0,13 μM
Taq polymerase (qPCR Core Kit)	5 U μl^{-1}	0,1	0,5 U
Suma częściowa		14	
DNA		1	10 ng μl^{-1}
Suma całkowita		15	

2.2.1. Warunki dla reakcji real-time PCR są następujące: początkowa denaturacja w 95°C przez 10 min; 40 cykli denaturacji w 95°C przez 20 sek. i przyłączanie/wydłużanie w 62,5°C przez 60 sek.

3. Istotne informacje proceduralne

3.1. Kontrole

W celu zapewnienia miarodajności wyników należy włączyć do procedury różne kontrole:

- Negatywna kontrola izolacji (NKI) służy do monitorowania kontaminacji podczas procesu ekstrakcji kwasu nukleinowego: ekstrakcji kwasu nukleinowego i następującej amplifikacji szczególnie próbek nieporażonych lub jeśli nie są one dostępne czystego buforu ekstrakcyjnego.
- Pozytywna kontrola izolacji (PKI) służy do zapewnienia jakości i ilości izolowanego kwasu nukleinowego (np. liście różanecznika sztucznie zainfekowane *P. kernoviae* przechowywane w temp. ok. -20°C).
- Negatywna kontrola amplifikacji (NKA) służy do wykluczenia wyników fałszywie pozytywnych z powodu kontaminacji podczas przygotowania mieszaniny reakcyjnej (np. woda do analiz molekularnych)
- Pozytywna kontrola amplifikacji (PKA) służy do monitorowania efektywności amplifikacji (np. ogólna ilość DNA z porażonego materiału lub sklonowany produkt PCR w określonym stężeniu).
- Brak obecności inhibitorów PCR podczas ekstrakcji DNA powinien być oszacowany poprzez użycie wewnętrznej kontroli pozytywnej (WKP) na przykład przez badanie ekstraktu z uniwersalnymi starterami roślinnymi opisanymi w literaturze lub przez skontaminowanie ekstraktu DNA, który ma być badany znaną ilością poszukiwanego DNA (najlepiej na granicy wykrywalności).

3.2. Interpretacja testu

Wartość progowa cyklu dla *P. kernoviae* wynosi 36 i została otrzymana przy zastosowaniu sprzętu/materiału oraz odczynników chemicznych opisanych przez Schena i wsp. (2006). Wartość progowa powinna zostać zweryfikowana w każdym laboratorium podczas wprowadzania metody po raz pierwszy.

Weryfikacja kontroli

- Krzywe amplifikacji PKI i PKA powinny wykazywać wykładniczy wzrost ilości produktu.
- NKI i NKA powinny być negatywne ($C_t >$ wartości progowej cyklu).
- PKI, PKA i wewnętrzna kontrola pozytywna (WKP) powinny być poniżej wartości progowej cyklu.

Kiedy warunki te zostały spełnione:

- Test będzie uznany za pozytywny, jeśli tworzy wykładniczą krzywą amplifikacji a wartość progowa cyklu jest poniżej wartości odcięcia.
- Test będzie uznany za negatywny, jeśli nie tworzy wykładniczej krzywej amplifikacji i wartość progowa cyklu jest równa lub powyżej wartości odcięcia.
- Test należy powtórzyć, jeśli uzyskano wyniki niejasne lub sprzeczne.

4. Dostępne kryteria walidacji (z Schena i wsp., 2006)

4.1. Czulość analityczna: zbadana seria rozcieńczeń DNA wyizolowanego z kultury *P. kernoviae* wykazała granicę wykrywalności ok. 100 fg DNA na reakcję.

4.2. Specyficzność analityczna: nie obserwowano reakcji krzyżowych, kiedy badano DNA wyizolowane z plechy następujących gatunków: *P. alni*, *P. cactorum*, *P. cambivora*, *P. capsici*, *P. cinnamomi*, *P. citricola*, *P. citrophthora*, *P. cryptogea*, *P. drechsleri*, *P. gonapodyides*, *P. europaea*, *P. fragariae*, *P. ilicis*, *P. infestans*, *P. inundata*, *P. lateralis*, *P. nemorosa*, *P. nicotianae*, *P. pseudosyringae*, *P. quercina*, *P. ramorum* i *P. sojae*.

B) Badanie regionu ITS (Hughes i wsp. 2006)

1. Informacje ogólne

1.1. Startery i sondy Taqman do PCR w czasie rzeczywistym zostały zaprojektowane do wykrycia wewnętrznych sekwencji niekodujących (ITS) *P. kernoviae* (numer akcesyjny DQ002008, 615-702 zasad).

1.2. Wielkość amplikonu wynosi 88 pz.

1.3. Do wykrywania *P. kernoviae* stosuje się następujące oligonukleotydy:

- Starter forward *Pkern* 615F: 5'-CCGAACAATCTGCTTATTGTGGCT-3'
- Starter reverse *Pkern* 722R: 5'-GTTCAAAAGCCAAGCTACACACTA-3'
- Sonda *Pkern* 606T: FAM-5'-TGCTTTGGCGTTTGCGAAGTTGGT-3' TAMRA
- 1.4. Do wykrywania oksydazy cytochromu w roślinach (COX), jako wewnętrzną kontrolę testu stosuje się następujące oligonukleotydy:
 - Starter forward COX F: 5'-CGTCGCATTCCAGATTATCCA-3'
 - Starter reverse COX RW: 5'-CAACTACGGATATATAAGRCCRRAACTG-3'

1.4. Sonda COX: VIC-5'-AGGGCATTCCATCCAGCGTAAGCA-3' TAMRA

PCR w czasie rzeczywistym może być przeprowadzony z użyciem polimerazy AmpliTaq Gold DNA (Applied Biosystems) o stężeniu 0,625 U na 25 µl reakcji (końcowe stężenie 0,025 U na µl).

1.5. Nukleotydy powinny być użyte w końcowym stężeniu 0,2 mM każdy.

1.6. Bufor A dostarczony z AmpliTaq Gold powinien być użyty w stężeniu końcowym 1x.

1.7. Reakcję można przeprowadzić na odpowiednim urządzeniu do PCR w czasie rzeczywistym jak np. ABI Prism 7500 lub 7900HT (Applied Biosystems).

2. Metody

2.1. Ekstrakcja kwasu nukleinowego

Drobne fragmenty tkanki roślinnej wycina się z pogranicza podejrzanych nekroz i homogenizuje. Można zastosować różne metody rozcierania takie, jak móżdziej i tłuczek z ciekłym azotem, homogenizator z kulkami lub Homex firmy Bioreba, które dostarczą jednorodnie rozartą próbkę. Ekstrakcję DNA można przeprowadzić z użyciem komercyjnych

zestawów np. kit do ekstrakcji NucleoSpin Plant (Macherey & Nagel) lub kit DNeasy Plant kit (Qiagen), zgodnie z instrukcją producenta. Do izolacji DNA z kultur można zastosować te same procedury. DNA przechowujemy w temperaturze -20°C .

2.2. Reakcja PCR w czasie rzeczywistym

2.2.1. Mieszanina reakcyjna (master mix)

Odczynnik	Stężenie robocze	Objętość na reakcję (μl)	Stężenie końcowe
Woda do analiz molekularnych	-	11,875	-
Bufor reakcyjny A	10x	2,5	1x
MgCl ₂	25 mM	5,5	5,5 mM
dNTPs	10 mM	0,5	0,2 mM
Pkern 615F	10 μM	0,75	0,3 μM
Pkern 722R	10 μM	0,75	0,3 μM
Pkern 606T	10 μM	0,25	0,1 μM
COX F	10 μM	0,75	0,3 μM
COX RW	10 μM	0,75	0,3 μM
COX sonda	10 μM	0,25	0,1 μM
Taq polimeraza	5 U μl^{-1}	0,125	0,625 U
Suma częściowa		24	
DNA		1	
Suma całkowita		25	

2.2.2. Warunki real-time PCR są następujące: początkowa denaturacja w 95°C przez 10 min; 40 cykli denaturacji w 95°C przez 15 sek. i przyłączanie/wydłużanie w 60°C przez 1 min.

4. Istotne informacje proceduralne

3.1. Kontrole

W celu uzyskania miarodajnych wyników następujące kontrole (zewnętrzne) powinny być włączone do każdej serii izolacji kwasu nukleinowego i amplifikacji poszukiwanego organizmu i odpowiednio jego kwasu nukleinowego.

- Negatywna kontrola izolacji (NKI) w celu monitorowania kontaminacji podczas ekstrakcji kwasu nukleinowego i następującej amplifikacji próbki z nieporażonej tkanki gospodarza, (kiedy pracuje się z próbką roślinną) lub czystym buforem ekstrakcyjnym, (kiedy pracuje się z czystymi kulturami).
- Pozytywna kontrola izolacji (PKI) służy do zapewnienia jakości i ilości izolowanego kwasu nukleinowego: ekstrakcja kwasu nukleinowego i następująca amplifikacja badanego organizmu lub matryca próbki która zawiera badany organizm (np. naturalnie zainfekowane tkanki roślinne lub tkanki roślinne sztucznie zainfekowane badanym organizmem).
- Negatywna kontrola amplifikacji (NKA) służy do wykluczenia wyników fałszywie pozytywnych z powodu kontaminacji podczas przygotowania mieszaniny reakcyjnej:

amplifikacja wody do analiz molekularnych, która została użyta do przygotowania mieszaniny reakcyjnej.

- Pozytywna kontrola amplifikacji (PKA) służy do monitorowania efektywności amplifikacji: amplifikacji kwasu nukleinowego poszukiwanego organizmu. Zawiera ona kwas nukleinowy wyizolowane z badanego organizmu, ogólną ilość kwasu nukleinowego wyekstrahowanego z porażonych tkanek roślinnych, cały genom namnożonego DNA lub syntetycznych kontroli (np. sklonowanych produktów PCR). Dla PCR przeprowadzonego na materiale roślinnym pozytywna kontrola amplifikacji powinna być bliska granicy wykrywalności.

Ponadto, do pozytywnych kontroli opisanych wyżej, kiedy badamy materiał roślinny należy użyć wewnętrzną kontrolę pozytywną (WKP) w celu wykrycia roślinnego DNA (gen oksydazy cytochromu, COX) w celu weryfikacji, że izolacja DNA została przeprowadzona pomyślnie dla próbek, które dały negatywne wyniki real-time PCR dla *P. kernoviae*.

3.3. Interpretacja wyników

Interpretacja wyników testu oparta jest na wartości progowej cyklu (Ct): za negatywne uznaje się próbki, których Ct jest powyżej wartości progowej. Dla *P. kernoviae* wynosi ona 30 przy zastosowaniu sprzętu/materiałów i odczynników opisanych w tym Załączniku. Wartość cyklu progowego musi zostać zweryfikowana w każdym laboratorium, podczas wprowadzania tej metody do badań po raz pierwszy.

Weryfikacja kontroli

- Krzywe amplifikacji PKI i PKA powinny wykazywać wykładniczy wzrost ilości produktu.
- NKI i NKA powinny być negatywne (Ct > wartości progowej cyklu).
- PKI, PKA i wewnętrzna kontrola pozytywna (WKP) powinny być poniżej wartości progowej cyklu.

Kiedy warunki te zostały spełnione:

- Test będzie uznany za pozytywny dla *P. kernoviae* jeśli wartość Ct wynosi <30, a zastosowane kontrole negatywne są negatywne.
- Test z wartością Ct >30 i nawet test z Ct równym 40 i COX Ct ≥28, wymaga izolacji na odpowiednie podłoża hodowlane takie, jak P₅ARP-H w celu potwierdzenia wyniku.
- Test będzie uznany za negatywny, jeśli wartość Ct >40. Dla materiału roślinnego gdzie wartość Ct dla COX wynosi <28 wymaga się, aby próbka była uznana za negatywną dla *P. kernoviae*.
- Test należy powtórzyć, jeśli uzyskane wyniki są niejasne lub sprzeczne.

4. Dostępne kryteria walidacji (z Hughes i wsp., 2006)

4.1. Dane dotyczące czułości analitycznej: zbadana seria rozcieńczeń DNA wyizolowanego z kultury *P. kernoviae* wykazała granicę wykrywalności na poziomie ok. 1,2 pg DNA na reakcję.

4.2. Dane dotyczące specyficzności analitycznej: nie obserwowano reakcji krzyżowych, kiedy badano DNA wyizolowane z plechy następujących gatunków *Phytophthora*: *P. boehmeriae*, *P. botryosa*, *P. cactorum*, *P. cambivora*, *P. cinnamomi*, *P. citricola*, *P. citrophthora*, *P. cryptogea*, *P. erythroseptica*, *P. europaea*, *P. rubi*, *P. gonapodyides*, *P. heveae*, *P. hibernalis*, *P. insolita*, *P. ilicis*, *P. lateralis*, *P. macrochlamydospora*, *P. megasperma*,

P. nemorosa, *P. nicotianae*, *P. palmivora*, *P. parasitica*, *P. pseudosyringae*, *P. quercina*, *P. ramorum*, *P. richardiae*, *P. syringae* and *P. uliginosa*.

4.3. Dane dotyczące diagnostycznej czułości: uznano, że test posiada czułość diagnostyczną na poziomie 93,3% w bezpośrednim porównaniu z izolacją 468 próbek na podłoża hodowlane.

4.4. Dane dotyczące diagnostycznej specyficzności: uznano, że test posiada specyficzność diagnostyczną na poziomie 99,8% w bezpośrednim porównaniu z izolacją 468 próbek na podłoża hodowlane.

Załącznik 6: Identyfikacja do gatunku na podstawie sekwencjonowania części regionu ITS

1. Informacje ogólne

1.1. Tożsamość izolatów *P. kernoviae* uzyskanych z nowych roślin żywicielskich lub izolatów, których charakterystyka morfologiczna nie pasuje do opublikowanych opisów można potwierdzić za pomocą sekwencjonowania. Tylko DNA pochodzące z czystych kultur może być badane tą metodą, w przeciwnym razie sekwencja pochodząca z wielu organizmów zostanie amplifikowana w tej samej reakcji.

1.2. Wytyczne na temat sekwencjonowania grzybów zostaną przedstawione w standardzie EPPO PM 7/XXX dotyczącym *metkowania genetycznego (barcoding) DNA jako narzędzia do identyfikacji agrofagów roślinnych, w szczególności w Załączniku 4*

1.3. Sekwencje starterów stosowanych w sekwencjonowaniu są następujące:

- ITS 1: 5'-TCC GTA GGT GAA CCT GCG G-3' i
- ITS 4: 5'-TCC TCC GCT TAT TGA TAT GC-3' (White i wsp., 1990).

2. Amplifikacja i analiza

Odczynnik	Stężenie robocze	Objętość na reakcję	Stężenie końcowe
Woda do analiz molekularnych	-	60,5	-
Bufor reakcyjny 15 mM MgCl ₂ (Applied Biosystems)	10x	10	1x
dNTPs	10 mM	8,0	0,8 mM
ITS 1	5 μM	10	0,5 μM
ITS 4	5 μM	10	0,5 μM
AmpliTaq (Applied Biosystems)	5 U μl ⁻¹	0,5	2,5 U
Suma częściowa		99	
DNA		1	
Suma całkowita		100	

2.1. Amplifikację przeprowadza się w cienkościennych probówkach PCR i termocyklerze o następujących parametrach reakcji: 2 min. w 94°C; następnie 30 cykli w 94°C przez 1 min., 1 min. w 53°C, 1,5 min. w 72°C. Jeden cykl w 72°C przez 10 min. Próbkę rozdziela się na 1,5% żelu agarozowym, jak opisano powyżej. Stosując tę metodę próbki zawierające DNA *Phytophthora* tworzą pojedynczy amplikon o średniej wielkości 900 pz.

Sekwencjonowanie i przeglądanie baz danych

Wytyczne na temat sekwencjonowania i przeglądania baz danych Q-bank zostaną przedstawione w Załączniku 7 standardu EPPO PM 7/XX dotyczącym *metkowania genetycznego (barcoding) DNA jako narzędzia do identyfikacji agrofagów roślinnych*. Konsensus sekwencji można również dla badanych próbek porównywać z sekwencją oryginalnie opisanej kultury patogena o numerze akcesji AY940661 zdeponowanej w Banku Genów (www.ncbi.nlm.nih.gov):w celu uznania próbki za pozytywną wymagana jest 100% zgodność sekwencji (homologia). Inne bazy danych zostaną wskazane ww. standardzie EPPO dotyczącym metkowania genetycznego. Należy podkreślić, że sekwencjonowane izolaty *P. kernoviae* pochodzące z Nowej Zelandii różnią się 1 parą zasad od oryginalnie opisanej kultury *P. kernoviae* zdeponowanej w Banku Genów (AY940661). Dlatego też jest ważne, aby porównać stwierdzenia patogena z obiema kulturami tj. oryginalną (AY940661) i pochodzącą z Nowej Zelandii (numer akcesyjny EU909457.1).