

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 7/25



## **Zatwierdzanie**

Standardy są zatwierdzane przez Radę EPPO. Na każdym ze standardów umieszczona jest data zatwierdzenia. W znaczeniu Artykułu II IPPC, Standardy EPPO uznaje się za Regionalne Standardy dla członków EPPO.

## **Przegląd**

Standardy EPPO są przedmiotem okresowych przeglądów i nowelizacji. Data następnego przeglądu danego Standardu zostaje uzgodniona na spotkaniu grupy roboczej EPPO dotyczącym działań fitosanitarnych.

## **Nowelizacja**

Standardy zostaną poddane nowelizacji, ponumerowane i datowane, jeśli zaistnieje taka konieczność. Na każdym ze standardów, (jeśli to konieczne) umieszcza się daty nowelizacji.

## **Dystrybucja**

Dystrybucja Standardów EPPO do wszystkich państw członkowskich odbywa się poprzez Sekretariat EPPO. Egzemplarze standardów dostępne są wg szczegółowych zasad na indywidualną prośbę skierowaną do Sekretariatu EPPO.

## **Zakres**

Protokoły diagnostyczne EPPO dotyczące agrofagów podlegających przepisom są przeznaczone do stosowania przez Państwowe Organizacje Ochrony Roślin (NPPO), jako ciała odpowiedzialnych za prowadzenie działań fitosanitarnych w celu wykrycia i zidentyfikowania agrofagów podlegających przepisom w EPPO i/lub liście Unii Europejskiej.

W 1998 EPPO rozpoczęła nowy program przygotowywania protokołów diagnostycznych dla agrofagów podlegających przepisom w regionie EPPO (włączając kraje Unii Europejskiej). Pracą kieruje Panel Diagnostyczny EPPO oraz inne specjalistyczne Panele. 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 napisane zgodnie z „ogólnym formatem i zawartością protokołu diagnostycznego”, zatwierdzone przez Panel Diagnostyczny, dostosowane odpowiednio do poszczególnych agrofagów, jeśli to konieczne. Główną rolą protokołu jest wskazanie szczegółowych sposobów wykrywania lub identyfikacji, które zostały uznane za lepsze (niezawodność, łatwość w użyciu itd.) od innych metod. Inne metody mogą być również wymienione, wskazując na ich wady i zalety. Jeśli jest wykorzystywana jakaś metoda niewymieniona w protokole należy to wytłumaczyć.

We wszystkich EPPO Standardach dotyczących diagnostyki mają zastosowanie następujące ogólne warunki:

- testy laboratoryjne mogą wymagać użycia odczynników lub urządzeń, które stanowią określone zagrożenie. We wszystkich przypadkach należy ściśle stosować lokalne procedury dotyczące bezpieczeństwa
- użyte w standardach EPPO nazwy odczynników lub wyposażenia nie znaczą 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 źródłowe** (w nawiasach kwadratowych podana oryginalna pisownia (przyp. tłum.))

- EPPO/CABI (1996) Agrofagi kwarantannowe Europy, Wydanie II. CAB International, Wallingford (Wielka Brytania). [EPPO/CABI (1996) Quarantine Pests for Europe, 2nd edn. 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 no. 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 no. 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 Główne 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 występuje na tym obszarze lub obecny, ale nierozprzestrzeniony 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 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, wykrywania/ metody ekstrakcji, metod badania).

### Standardy EPPO z tej serii

Do tej pory zostało zatwierdzonych i opublikowanych dziewiętnaście standardów i protokołów diagnostycznych EPPO. Każdy ze standardów jest ponumerowany w następujący sposób PM 7 / 4 (1), co oznacza, że jest 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 7/1 (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 protokołu. Projekt DIAGPRO został utworzony na bazie pełnej wiedzy równoległych działań Grupy Roboczej EPPO dotyczącej Przepisów Fitosanitarnych w projektach protokołów diagnostycznych i obejmującej 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 przeznaczone do poprawy przez procedury EPPO w tym samym czasie jak inne z tej samej serii.

## Protokoły diagnostyczne dotyczące agrofagów podlegających przepisom<sup>1</sup> Protocoles de diagnostic pour les organismes réglementés

### *Glomerella acutata*

#### Zakres

Niniejszy standard opisuje protokół diagnostyczny dla *Glomerella acutata*.

#### Zatwierdzenia i nowelizacje

Zatwierdzony we wrześniu, 2003.

#### Wprowadzenie

*Glomerella acutata* jest patogenem znanym głównie w stadium konidialnym (anamorfa) *Colletotrichum acutatum*, w którym jest rozróżniany od innych gatunków *Colletotrichum* głównie na podstawie względnie wąskich (o szerokości mniejszej niż 5 µm) i ostro zakończonych obu końców konidiów. Jednakże, kształt konidiów i ich wielkość są znamienne zróżnicowane i nie są łatwe do odróżnienia od tych, które tworzy *Glomerella cingulata* (Stoneman) Sapulding & von Schrenk (anamorfa *Colletotrichum gloeosporioides* Penzig). Stadium doskonałe (teleomorfa) patogena zostało stwierdzone w warunkach *in vitro* (Guber & Correl, 2001), ale nie w warunkach *in vivo*. Przez ponad 30 lat patogen został szeroko rozprzestrzeniony na świecie. Powoduje on antraknozę u szerokiej grupy roślin żywicielskich szczególnie jabłoni, anemona, cyklamena, łubinu i sosny. Jednakże, jego znaczenie fitosanitarne ogranicza się do truskawki, u której powoduje zgniliznę owoców znaną, jako czarna plamistość (EPPO/CABI, 1997).

#### Tożsamość

**Nazwa:** *Glomerella acutata* Gerber & Correll

**Anamorfa:** *Colletotrichum acutatum* Simmonds (typ gatunku cytowany przez Simmonds w 1968 roku; gatunek opisany w 1965 roku)

**Synonim:** *Colletotrichum xanthii* Halsted

**Stanowisko taksonomiczne:** Grzyby: Workowce: *Phyllachorales*

**Komputerowy kod Bayera:** COLLAC

**Kategoria fitosanitarna:** Załącznik UE II/A2, na truskawce

---

<sup>1</sup> Ryciny w niniejszym standardzie oznaczone „Web Fig.” zostały opublikowane na stronie internetowej EPPO [www.eppo.org](http://www.eppo.org).

## Wykrywanie

### Objawy chorobowe

Głównym źródłem patogena jest porażony materiał nasadzeniowy truskawki, ale objawy chorobowe są zazwyczaj niewidoczne, bowiem grzyb jest zwykle nieaktywny w żywych tkankach wegetatywnych. Czasami aktywne infekcje obserwuje się w postaci małych, czarnych, wydłużonych i zapadniętych nekroz na ogonkach, liściach i ogonkach kwiatowych lub w postaci nieregularnych plam na liściach, ale nie zawsze są one widoczne, gdyż są niepozorne lub z łatwością mylone, jako uszkodzenia spowodowane przez inne czynniki. Owoce z wiekiem stają się bardziej wrażliwe na patogena, a obserwowane objawy chorobowe mają charakter uszkodzeń o znaczeniu gospodarczym. Ciepłe i wilgotne warunki (optymalna temperatura 25°C) sprzyjają gromadzeniu się zarodników na owocach, które są przenoszone wraz z kroplami wody, owadami, podczas zbierania owoców itp. powodując w ciągu 3 dni powstanie brązowych, okrągłych, początkowo podmokłych nekroz, o średnicy około 1 cm. Rzadko, infekcja niedojrzałych owoców powoduje nieregularne nekrozy i zniekształcenia owoców. Owoce porażone podczas zbioru mogą rozwijać objawy chorobowe zanim zostaną zużyte przez konsumenta. Symptomy czarnej plamistości można odróżnić od oparzeń słonecznych poprzez brak jasnych plam, a od *Botryotinia fuckeliana* poprzez bardziej okrągłe, zapadnięte nekrozy i obecność łososiowej masy zarodników produkowanej obficie przez acerwulusy położone wewnątrz nekroz. W warunkach suszy masa zarodników może zastygać w postaci skorupki. Ta masa zarodników również odróżnia czarną plamistość truskawki od innej czarnej plamistości truskawki spowodowanej przez grzyb *Alternaria alternata*, który infekuje przejrzałe owoce.

## Morfologia

### *In vivo*

W wilgotnych warunkach, w centrum nekroz zazwyczaj tworzy się lepka masa zarodników o zabarwieniu od łososiowego do brązowego, która w warunkach suszy wysycha i tworzy formę skorupki. Zarodniki (konidia) tworzą się w licznych acerwulusach (o średnicy do 0,5 mm) umieszczonych pod skórka. Szczecinki obserwuje się rzadko, a jeśli są one obecne, to zabarwione na brązowo, o gładkiej powierzchni, podzielone, proste do lekko zakrzywionych, zwężające się na wierzchołku; o wymiarach 46-85 x 3-4 μm. Komórki konidiotwórcze (fialidy) powstają w górnej warstwie komórek acerwulusa. Pozostałe cechy jak te, które obserwuje się w warunkach *in vitro* (opis poniżej).

### *Stymulacja zarodnikowania, jako pomoc w wykrywaniu*

Ogonki liściowe oraz materiał rozmnożeniowy, taki jak rozłogi mogą być źródłem patogena w stadium ukrytym lub w postaci nietypowych nekroz, które podczas wizualnej inspekcji nie są łatwe do wykrycia. Do tego rodzaju materiału niezbędne jest zastosowanie specjalnych procedur do wykrywania patogena. Badanie można przeprowadzić w dwóch etapach: (1) wykrywanie grzyba poprzez jego namnażanie (pułapka, stymulacja zarodnikowania, hodowla na podłożach półselektywnych); (2) identyfikacja na podstawie morfologii, testów ELISA i PCR. Przeprowadzono i porównano różne metody wykrywania ukrytej infekcji włączając w to izolację patogena na selektywne podłoża agarowe, pułapki z użyciem jabłka i pomidora, stymulowanie zarodnikowania parakwatem i badanie z użyciem przeciwciał monoklonalnych (Cook, 1993; Morzeries & Baudry, 1993).

Zabieg z parakwatem spełnia większość wymagań, bowiem stymuluje zarodnikowanie patogena na ogonkach i acerwulusy można wykryć w wyniku oceny wizualnej<sup>2</sup>. Chociaż patogen

<sup>2</sup> Jeśli nie można użyć parakwatu to patogen w końcu będzie zarodnikował, jeśli materiał będzie inkubowany przez dłuższy czas, np. co najmniej 5 tygodni w komorze wilgotnej.

może być obecny we wszystkich częściach rośliny, to można go w niezawodny sposób wykryć z podstawy starszych ogonków. Do celów próbkobrania zaleca się pobierać najstarsze, jeszcze żywe ogonki, z co najmniej 300 reprezentatywnych roślin z badanej partii towaru. Teoretycznie pozwala to na wykrycie 1% infekcji z 95% stopniem prawdopodobieństwa. Szczegóły procedury w Załączniku 1.

## Identyfikacja

Mikolog z wcześniejszym doświadczeniem w pracy z tym patogenem może potwierdzić *G. acutata* na podstawie oceny struktur mikroskopowych i określeniu wielkości oraz kształtu konidiów (Ryc. 1). Czasami jednak konidia *G. acutata* mają mniej zaokrąglone wierzchołki i bardziej zaokrąglone końce, stąd przypominają *G. cingulata* (Ryc. 2), patogena rzadko występującego na truskawce. Z tego powodu oraz braku wcześniejszego doświadczenia w pracy z patogenem jego obecność na ogonkach i owocach powinna być potwierdzona testem ELISA (Załącznik 2). Jeśli test ELISA daje wynik wątpliwy to należy wyizolować grzyba na podłoża agarowe (Załącznik 3), określić cechy morfologiczne *in vitro* (Załącznik 4) i ponownie zbadać testem ELISA. Jeśli wynik jest nadal wątpliwy, to grzyb powinien zostać podany badaniu techniką PCR (załącznik 5). Proces podejmowania decyzji przedstawiono na Ryc.3.

## Materiał odniesienia

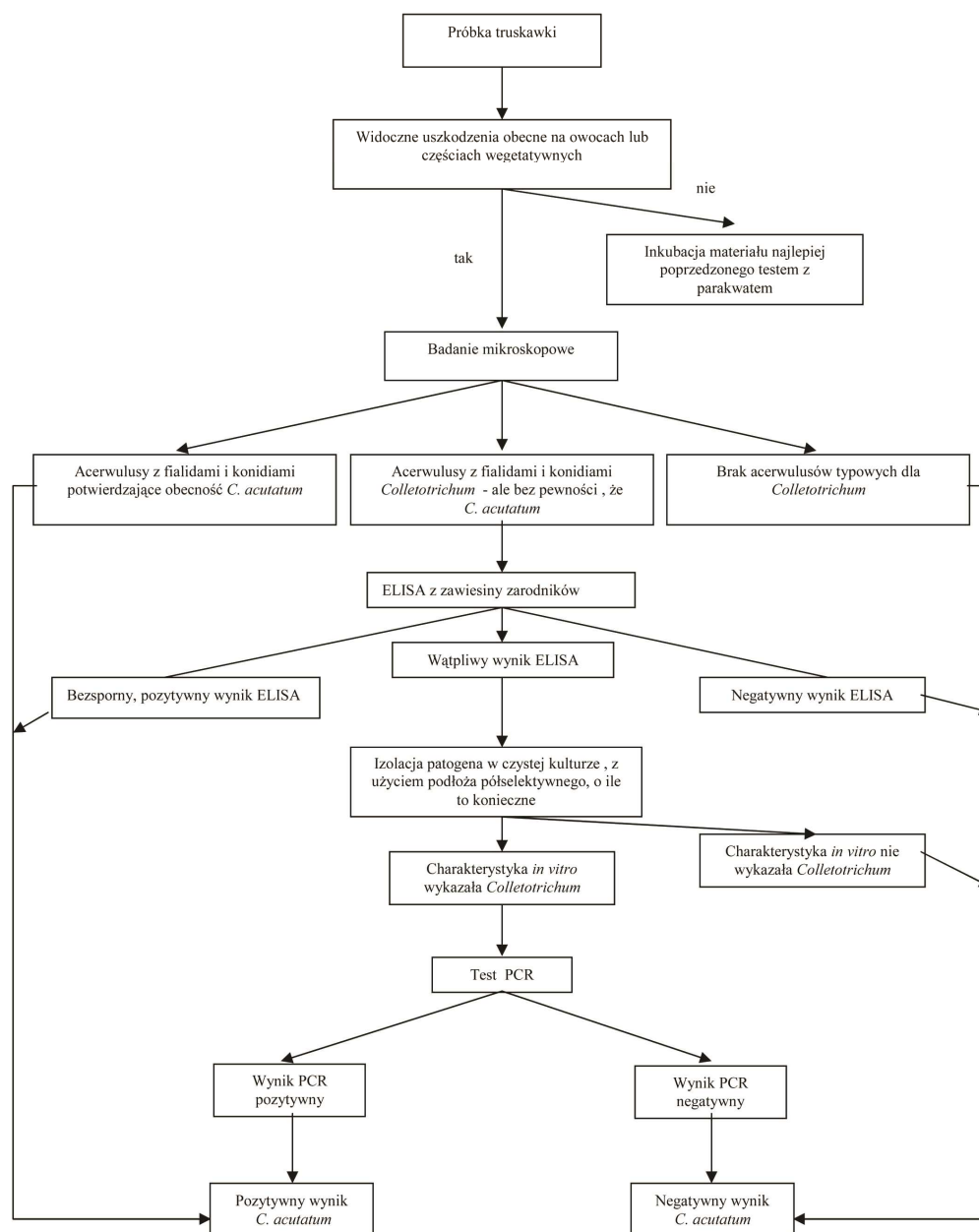
Kultura IMI 351247 wyizolowana z *Fragaria x ananassa*. Typ gatunku IMI 117617 wyizolowany z *Carica papaya*. Izolaty te zdeponowano w Centrum CABI Bioscience, Bakeham Lane, Egham TW20 9TY, w Wielkiej Brytanii.

## Możliwość pomyłki z gatunkami podobnymi

Acerwulusy *G. acutata* powinny być odróżniane od owocników innych grzybów takich jak: *Hainesia lythri* (Sutton & Gibson, 1977), stadium *Zythia* gatunku *Gnomonia comari* (Punithalingam, 1982), *Fusarium* itp. Najczęściej pomyłki dotyczą mikrokonidiów *Fusarium* sp., szczególnie gatunku *F. oxysporum*. W przypadku wątpliwości przygotowuje się preparat mikroskopowy struktur grzyba w wodzie i analizuje pod mikroskopem złożonym. Mikrokonidia *F. oxysporum* mają cieńsze ściany niż *G. acutata* i w części są łukowatego kształtu (jedna strona jest prosta, druga zagięta). Konidia *G. acutata* są względnie wąskie i wrzecionowate (Ryc. 1) i można je odróżnić od *G. cingulata*, które są jednolite w kształcie, szersze i cylindryczne, z bardziej zaokrąglonymi końcami (Ryc. 2; Mordue, 1971; Desnoyes & Baudry, 1995). Z kolei, *G. cingulata* jest nie do odróżnienia od *C. fragariae*, który powoduje zgniliznę owoców truskawki, ale głównie zgniliznę korony w USA (Howard i wsp., 1992). W przypadku wątpliwości należy wyizolować czystą kulturę grzyba. Kolonie *G. cingulata* rosną szybciej i są bardziej watowate, mogą również produkować perytecja (ostatnio wykryte u *G. acutata*, dlatego przypuszcza się, że są one rzadkie). Rewers kolonii stanowi cechę diagnostyczną, szczególnie jego charakterystyczne całkowicie kremowe zabarwienie (patrz: Morfologiczna identyfikacja). Optymalna temperatura wzrostu dla *G. acutata* wynosi 25°C, podczas gdy optimum dla *G. cingulata* jest zwykle wyższe (Simmonds, 1965). Zawiesinę zarodników można poddać badaniu z przeciwciałami Mab MAFF 26, które rozpoznają tylko zarodniki *G. acutata* (Hughes i wsp., 1997). Alternatywnie (Załącznik 5) identyfikację można potwierdzić za pomocą analizy DNA (Sreenivasaprasad i wsp., 1996; Grondona i wsp., 1998; Buddie i wsp., 1999).

## Wymagania w przypadku pozytywnej identyfikacji

Objawy chorobowe, wzrost i morfologia grzyba powinny być zgodne z opisem niniejszego Standardu. Symptomy choroby, jeśli są obecne na dojrzałych owocach, powinny składać się z brązowych pierścieni, nasiąkniętych nekroz, co najmniej o średnicy 1 cm z typową zaschniętą lub świeżą masą zarodników w centrum, zabarwionych na kolor łososiowy do brązowego. Konidia powinny być hialinowe, niepodzielone, proste, gładkie o wymiarach 8-16 (20) x 2, 5-5  $\mu\text{m}$  i co najmniej część z nich powinna być wrzecionowatego kształtu (Ryc. 1). Konidia powinny tworzyć się na konidioforach z typowymi komórkami konidiotwórczymi typu fialidy. Część konidiów powinno się obserwować w acerwulusie i powinno się wykryć przycistki (brązowe z gładkim brzegiem, o średnicy 6-11 x 4-8  $\mu\text{m}$ )<sup>2</sup>. W czystych kulturach.



Rys. 3. Schemat decyzyjny do identyfikacji *Glomerella acutata* na truskawce

<sup>2</sup> Niektóre izolaty produkują wyjątkowo długie konidia, np. >20  $\mu\text{m}$



W czystych kulturach wzrost grzyba (preferowany PDA) powinien być stosunkowo wolny. Kolonie powinny być jasnoszare (okazyjnie różowe). Jeśli takie cechy nie zostały stwierdzone jednoznacznie to należy postępować zgodnie ze Schematem Decyzyjnym (Rys. 3).

### **Raport z badania**

Raport z badań przeprowadzonych zgodnie z Protokołem powinien zawierać:

- Informacje o pochodzeniu porażonego materiału
- Opis objawów choroby, (jeśli obserwowano), jeśli to możliwe ze zdjęciami
- Pomiary i rysunki lub fotografie, (jako równoważne) struktur grzybowych
- Podanie procenta infekcji przesyłki, o ile to możliwe
- Stosowny komentarz, co do pewności lub niepewności identyfikacji, szczególnie jego odróżnienie od gatunku *G. cingulata*.

Zaleca się zachowanie kultury patogena lub materiału zielnikowego (np. ogonki lub owoce) z acerwulusami *G. acutata*. Jednakże, bardziej praktycznie może być zachowanie preparatów mikroskopowych.

### **Informacje dodatkowe**

Informacje dodatkowe dotyczące tego organizmu można uzyskać:

- Plant Disease Diagnostics, Central Science Laboratory, Sand Huston, York YO041 1LZ, UK;
- Plantenziektenkundige Dienst, Postbus 9102, 6700 HC Wageningen, the Netherlands.

### **Podziękowania**

Niniejszy protokół został w oryginale opracowany przez R.T.A. Cook i K.J.D. Hughes z Centralnego Laboratorium Naukowego (Central Science Laboratory) w Yorku, Wielka Brytania.

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

- Barker I, Brewer D, Cook RTA, Crossley S & Freeman S (1994) Strawberry black spot disease (*Colletotrichum acutatum*). In: Modern Assays for Plant Pathogenic Fungi: Identification, Detection and Quantification (Ed. Schots A, Dewey FM & Oliver RP), pp. 179–183. CAB International, Wallingford (GB).
- Barker I & Pitt D (1987) Selective medium for the isolation from soil of the leaf curl pathogen of anemones. Transactions of the British Mycological Society 88, 553–555.
- Batta Y (1991) L'antracnose du fraisier dû à *Colletotrichum acutatum*: épidémiologie de la maladie et sensibilité de l'hôte. PhD Thesis, Institut National, Paris-Grignon (FR).
- Buddie AG, Martínez-Culebras P, Bridge PD, García MD, Querol A Cannon PF & Monte E (1999) Molecular characterization of *Colletotrichum* strains derived from strawberry. Mycological Research 103, 385–394.
- Cook RTA (1993) Strawberry black spot caused by *Colletotrichum acutatum*. In: Plant Health and the European Single Market (Ed. Ebbels D), pp. 301–304. British Crop Protection Council, Farnham (GB).

- Desnoyes B & Baudry A (1995) Species identification and pathogenicity study of French *Colletotrichum* strains isolated from strawberry using morphological and cultural characteristics. *Phytopathology* 85 , 53–57.
- Dyko BJ & Mordue JEM (1979) *Colletotrichum acutatum*. CMI Descriptions of Pathogenic Fungi and Bacteria, no. 630. CAB International, Wallingford (GB).
- EPPO/CABI (1997) *Colletotrichum acutatum*. Quarantine Pests for Europe, 2nd edn, pp. 692–697. CAB International, Wallingford (GB).
- Grondona I, Suarez MB, Martínez-Culebras P, Querol A, García MD & Monte E (1998) *Colletotrichum acutatum* detection by direct PCR in strawberry plants. Abstracts of the 7th International Congress of Plant Pathology, No. 3.3.22. Edinburgh (GB).
- Guerber JE & Correll JC (2001) Characterization of *Glomerella acutata*, the teleomorph of *Colletotrichum acutatum*. *Mycologia* 93 , 216–229.
- Howard CM, Maas JL, Chandler CK & Albregts EE (1992) Anthracnose of strawberry caused by the *Colletotrichum* complex in Florida. *Plant Disease* 76, 976–981.
- Hughes KJD, Lane CR & Cook RTA (1997) Development of a rapid method for the detection and identification of *Colletotrichum acutatum*. In: *Diagnosis and Identification of Plant Pathogens* (Ed. Dehne HW, Adam G, Diekmann M, Frahm J, Mauler-Machnik A & van Halteren P), pp. 113–116. Kluwer, Dordrecht (NL).
- Mordue JEM (1971) *Glomerella cingulata*. CMI Descriptions of Pathogenic Fungi and Bacteria, no. 315. CAB International, Wallingford (GB).
- Morzières JP & Baudry A (1993) Comparison of three methods to assess latent contamination of *Colletotrichum acutatum* on frozen strawberry plants. *Acta Horticulturae* no. 348, 504–508.
- OEPP/EPPO (1999a) First find of *Colletotrichum acutatum* in Slovenia. EPPO. Reporting Service 99/118. EPPO, Paris (FR).
- OEPP/EPPO (1999b) First finding of *Colletotrichum acutatum* in Austria. EPPO . Reporting Service 99/065. EPPO, Paris (FR).
- Punithalingam E (1982) *Gnomonia comari*. CMI Descriptions of Pathogenic Fungi and Bacteria, no. 737. CAB International, Wallingford (GB).
- Simmonds JH (1965) A study of the species of *Colletotrichum* causing ripe fruit rots in Queensland. *Queensland Journal of Agricultural and Animal Sciences* 22, 437–459.
- Simmonds JH (1968) Type specimens of *Colletotrichum gloeosporioides* var. *minor* and *Colletotrichum acutatum*. *Queensland Journal of Agricultural and Animal Sciences* 25, 178a.
- Sreenivasaprasad S, Sharada K, Brown AE & Mills PR (1996) PCR-based detection of *Colletotrichum acutatum* on strawberry. *Plant Pathology* 45, 650–655.
- Sutton BC & Gibson IAS (1977) *Pezizella oenotherae*. CMI Descriptions of Pathogenic Fungi and Bacteria, no. 535. CAB International, Wallingford (GB).
- White TJ, Bruns T, Lee S & Taylor J (1990) Amplification and direct sequencing of fungal ribosomal RNA genes for phylogenetics. In: *PCR Protocols: a Guide to Methods and Applications* (Ed. Innis MA, Gelfand DA, Sninsky JJ & White TJ), pp. 315–322. Academic Press, San Diego (US).

### **Załącznik 1. Procedura wykonania testu z parakwatem**

Badaniu poddać próbkę o wielkości 300 ogonków. Jeśli próbkę stanowią całe rośliny, to z korony każdej rośliny usunąć większość zewnętrznych, jeszcze żywych liści; pozostawić podstawę ok. 2 cm od strony przylistka, a blaszkę liściową odrzucić. Podstawy ogonków w celu usunięcia wszystkich śladów piasku i cząsteczek gleby dokładnie obmyć w kilka razy zmienianej wodzie wodociągowej. Powierzchnie ogonków zdezynfekować przez 4 min. w 1 litrze rozcieńczonego podchlorynu sodu NaOCl (1:10 rozcieńczonego dostępnego w handlu wybielacza, zawierającego mniej niż 5 % chloru - substancji aktywnej). Dwukrotnie wypłukać w wodzie wodociągowej.

Następnie, ogonki zamoczyć w 1 litrze rozcieńczonego parakwatu (1:40 dostępnego w handlu produktu lub w postaci zalecanej w praktyce rolniczej); mieszać przez 1 minutę. Parakwat usunąć. Wypłukać jeden raz w 1 litrze wody. Rozłożyć ogonki pojedynczą warstwą w wilgotnej

komorze i inkubować w stałym świetle w temp. 25°C przez 6 dni. Ogonki badać pod mikroskopem stereoskopowym na obecność owocników (acerwulusów) z konidioforami i charakterystycznymi dla *G. acutata* konidiami (Dyko & Mordue, 1979). Długość okresu inkubacji jest krytyczna. Jeśli przekroczy ona 7 dni, to acerwulusy mogą ulec degeneracji a organizmy saprofityczne przerosnąć struktury badanego organizmu.

Do celów rutynowych lustracji, wykrywanie i identyfikację można przeprowadzić w sposób bardziej ekonomiczny i szybszy poprzez potraktowanie popłuczyn z inkubowanych ogonków bezpośrednio przeciwciałami monoklonalnymi Mab MAFF 26, specyficznymi dla konidiów *G. acutata* (patrz poniżej procedura ELISA; Hughes i wsp., 1997). Alternatywnie (Batta, 1991), po zabiegu z parakwatem, próbki można homogenizować w móżdżerku z 0,1% agarem wodnym. Homogenat umieszcza się w gazie i poddaje serii rozcieńczeń (1, 1/10, 1/100), a następnie rozciera na podłożu półselektywnym - MBC (4,5% mąka owsiana, 1,3% agar, 7 ppm benomyl, 250 ppm chloramphenicol, woda destylowana). Po 6 dniach inkubacji w 25°C, w świetle UV (Morzeries & Baudry, 1993) obserwuje się wzrost kolonii grzyba, identyfikuje na podstawie morfologii, testem ELISA lub PCR. Po upływie 6 dni kolonie na pożywce MBC rozmieszczone są punktowo (kilka mm szerokości), białe z łososiowo-różową masą zarodników wypływającą z centrum. Rzadko obserwuje się acerwulusy z typowymi dla rodzaju szczecinkami. Chociaż *G. cingulata* nie rośnie na tym podłożu, to wzrost innych grzybów może maskować *G. acutata*. Wśród nich wymienia się *Mucor*, *Alternaria*, *Fusarium* spp. (A. Baudry, informacja ustna).

## **Załącznik 2. Procedura identyfikacji serologicznej *Glomerella acutata* w kulturze lub w porażonych ogonkach (ELISA)**

Przeciwciała monoklonalne MAFF 26 (25/164.32) są wysoko specyficzne do antygenów produkowanych przez konidia *G. acutata* (Barker i wsp., 1994) i zostały wykorzystane jako narzędzie w celu potwierdzenia tożsamości izolatów (metoda A poniżej; EPPO 1999a) i grzyba w porażonych ogonkach (metoda B i C poniżej; EPPO 1999b). Przeciwciała monoklonalne można również wykorzystać do wykrywania patogena w popłuczynach uzyskanych z porażonych owoców, z podejrzanyymi o czarną plamistość objawami (metoda D, poniżej).

### *Przygotowanie próbki*

Czyste kultury patogena, które rosną na PDA przez 6 dni (opisano powyżej) lub do czasu, aż będzie widoczne łososiowo zabarwiona masa zarodników. W warunkach aseptycznych pobrać fragment 1 cm<sup>2</sup> z masą konidiów i umieścić w próbówce z 1 ml buforu powlekającego (0,05M węglan sodowy i 0,03M kwaśny węglan sodu o pH 9,6), mieszać przez 10 sek. na wortexie.

Pojedyncze ogonki potraktować parakwatem i inkubować przez 6 dni (Załącznik 1). Ogonki z acerwulusami umieścić przylistkiem do dołu w 10 ml przezroczystej próbówce z nakrętką zawierającej 1 ml buforu powlekającego i mieszać na wortexie, co najmniej 10 sek. tak, aby obmyć wszystkie ogonki. W przypadku większej ilości ogonków po zabiegu z parakwatem pogrupować je po 50 szt. i umieścić je oddzielnie w plastikowej torebce, o wymiarach 20x20, zawierającej 10 ml buforu powlekającego. Ogonki rozetrzeć w torebce za pomocą gumy.

Owoce – umieścić pojedynczo np. na naczynku wagowym i używając pipety obmyć 0,5ml buforu powlekającego.

Powyższe procedury powtórzyć ze zdrowym i porażonym materiałem w celu przygotowania kontroli pozytywnej i negatywnej, które można przechowywać w temp. -20°C i używać w następnych badaniach. Kontrole są dostępne w Adgen Diagnostic Systems (Auchincruive, Scotland, GB).

### *Nakładanie na płytki immunoabsorpcyjne*

Do studzienek 96 otworowej płytki Nunc Polysorp (Life Technologies, Paisley, Scotland, GB) pipetą nanieść minimum dwa powtórzenia, każde po 100  $\mu$ l kontroli negatywnej i pozytywnej (patrz wyżej). Pozostałe, do 46 studzienek wypełnić powtórzeniami nieznanych próbek, a puste wypełnić buforem powlekającym. Płytkę owinąć folią polietylenową i inkubować w temp. 33°C przez 1 godz. lub całą noc w temp. 4°C. Szybkim ruchem usunąć próbki z płytki do 10% roztworu chloru. Używając tryskawki obmyć płytkę izotonicznym buforem fosforanowym zawierającym Tween 20 (PBSt)(0,137M NaCl, 0,003 M KCl, 0,021M  $\text{Na}_2\text{PO}_4$ , 0,0015M  $\text{K}_2\text{PO}_4$  i 0,05% Tween 20 doprowadzone do pH 7,4). Obmywanie powtórzyć dwukrotnie pozostawiając PBSt w studzienkach przez 3 min. Płytkę suszyć uderzając kilka razy o ręcznik papierowy.

### *Nakładanie przeciwciał*

Na każdą płytkę rozcieńczyć 1 ml przeciwciał Mab MAFF 26 Adgen, Diagnostic Systems (Auchincruive, Scotland, GB) w 9 ml buforu blokującego (0,05% surowicza albumina wołowa w PBSt), roztwór wymieszać i dodać po 100  $\mu$ l do każdej studzienki. Płytkę owinąć folią polietylenową i inkubować w 33°C przez 1 godz. Powtórzyć procedurę obmywania opisaną powyżej.

Dla każdej płytki immunosorbcyjnej rozcieńczyć 2 $\mu$ l konjugatu fosfatazy alkalicznej z przeciwciałami IgG (produkt A-6066, SIGMA) w 10ml buforu blokującego i dodać po 100 $\mu$ l do każdej studzienki. Płytkę owinąć folią polietylenową i inkubować przez 1 godz. w 33°C, a następnie powtórzyć procedurę obmywania opisaną powyżej.

### *Nakładanie substratu*

Dla każdej płytki rozpuścić 7,5mg p-nitrofenolu w 10ml 1M dwuetyloaminy (pH 9,8), następnie substrat w ilości 100  $\mu$ l nanieść pipetą do każdej studzienki. Płytkę przykryć folią polietylenową i pozostawić na stole laboratoryjnym przez 1 godzinę.

### *Obliczanie wyniku pozytywnego*

Z płytki usunąć folię i zmierzyć absorbancję dla każdej studzienki przy długości fali 405 nm używając czytnika do płytek immunosorbcyjnych. Obliczyć średnią wartość absorbancji dla każdej próbki, a za wynik pozytywny dla *G. acutata* uznać ten, którego średnia wartość przekracza dwukrotnie średnią wartość absorbancji dla kontroli negatywnej.

## **Załącznik 3. Procedura izolacji**

Izolacje można przeprowadzać zarówno na PDA bez suplementów lub z ich dodatkiem 60  $\mu$ g  $\text{L}^{-1}$  soli sodowej penicyliny G (SIGMA) około 1650 jednostek na mg i 200  $\mu$ g  $\text{L}^{-1}$  siarczanu streptomycyny (PDA<sup>+</sup>) lub na podłoże półselektywne (Barker & Pitt, 1987). Wybór podłoża zależy od spodziewanego poziomu kontaminacji innymi organizmami. Zaszczepione szalki Petriego inkubuje się w 25°C przez 12 godz. w świetle bliskim UV i 12 godz. w ciemności. Na bezpośrednią izolację patogena pozwala również pożywka selektywna MBC.

### *Bezpośrednia izolacja z acerwulusów na ogonkach liściowych i owocach*

W warunkach aseptycznych przenieść konidia z acerwulusów pochodzących z porażonego materiału roślinnego na odpowiednie podłoże agarowe (patrz wyżej). Zainokulowane płytki inkubować w warunkach opisanych powyżej i jeśli to niezbędne przeprowadzić reizolację w celu uzyskania czystej kultury *C. acutatum*.

### *Izolacja poprzez obmywanie ogonków z testu z parakwatem*

Porażone ogonki umieścić pojedynczo w małej 10ml zakręcaniej butelce z 0,5ml sterylnej destylowanej wody (lub buforem powlekającym, patrz: procedura serologiczna) i mieszać co najmniej przez 10sek., upewniając się, że powierzchnia wszystkie ogonków została obmyta. Zawiesinę w ilości 10 µl przenieść do sterylnych 1,5ml probówek z 90µl sterylnej wody destylowanej i rozcieńczyć 1:10. Następnie zawiesinę 1:10 rozcieńczyć wodą sterylną tak, aby otrzymać serię rozcieńczeń  $1 \times 10^4$  i  $1 \times 10^5$ . Z rozcieńczeń seryjnych przenieść 25µl na płytki z pożywką PDA<sup>+</sup> i inkubować w warunkach jw. Płytki kontrolować codziennie pod kątem pojawienia się pojedynczych kolonii *C. acutatum*, a ich tożsamość potwierdzić jak opisano powyżej. Uzyskać czystą kulturę poprzez przeszczepienie potwierdzonej kolonii *G. acutata* na nową płytkę z PDA.

### **Załącznik 4. Morfologiczna identyfikacja *in vitro***

Stosuje się następującą charakterystykę kultury *C. acutatum* na podłożu PDA (Oxoid): jasnoszare, wolno rosnące kolonie z równomiernym białym brzegiem, przebarwiają się w centrum na pomarańczowo, z zarodnikowaniem na strzępkach grzybni i w acerwulusach; występują także kultury o zabarwieniu jasnoróżowym lub równomiernie karminowym; często obserwuje się sektory jaśniejsze lub ciemniejsze; generalnie grzybnia powietrzna jest zwarta, zwykle nie puszysta; rewers zazwyczaj o jasnokremowym i często również łososiowym lub różowym odcieniu i szarawym centrum; plamy lub łatki (o średnicy 1-5 mm) z ciemniejszej, ciasno utkanej grzybni są rozrzucone nieregularnie lub układają się w mniej lub bardziej koncentryczne pierścienie; optymalna temp. wzrostu 25°C.

#### *Morfologia*

Poniższy charakterystyka morfologii *G. acutata* w dużej mierze opiera się na opisie Dyko i Mordue (1979), który również zawiera ilustracje struktur patogena: grzybnia powierzchniowa i substratowa rozgałęziona, podzielona, hialinowa do ciemnobrązowej; strzępki czasami skręcone lub w supłach tworzących tzw. zygzaki; szczecinki występują rzadko, ale kiedy są obecne, to są krótkie i często zagięte oraz mają 0-2 przegrody; acerwulusy zwykle są obecne w centrum kolonii; konidiofory hialinowe, podzielone, czasami rozgałęzione u podstawy; komórki konidiotwórcze typu fialidy, hialinowe, gładkie, cylindryczne; konidia hialinowe bezprzegrodowe, proste, gładkie, czasami wrzecionowate, o wymiarach 8-16(20) x 2, 5-5µm, w masie o zabarwieniu łososiowym (Załącznik I, Ryc.1); przycistki (appresoria, formują się wtedy, kiedy strzępka kielkowa konidiów lub wierzchołek strzępki dotyka twardej powierzchni np. mikroskopowego szkiełka podstawowego) względnie rzadkie, jasno do średnio brązowych, maczugowate do odwrotnie jajowatych, o gładkim brzegu i wymiarach 6,5-11 x 4,5-7,5µm.

### **Załącznik 5. Procedura identyfikacji kultur PCR**

Kilku badaczy opracowało startery do identyfikacji *G. acutata* (Sreenivasaprasad i wsp. 1996; Grondona i wsp. 1998). Obecnie dostępny jest tylko jeden zestaw (Sreenivasaprasad i wsp. 1996), a technika ta nie została jeszcze udoskonalona do bezpośredniego wykrywania patogena w porażonym materiale roślinnym.

Do badań, jako kontrolę pozytywną i negatywną używa się DNA pochodzące ze znanej kultury *G. acutata* oraz odpowiednio innego gatunku grzyba. Na życzenie kontrole można pozyskać z CSL (York). Kontrolę negatywną powinien stanowić tylko bufor TE w celu wykazania, że mieszanina reakcyjna PCR i użyte pipety nie stanowią źródła kontaminacji.

Do ekstrakcji DNA z kultur patogena można również stosować komercyjny zestaw do ekstrakcji DNA. Umieszczenie za pomocą sterylnej igły kilku strzępek badanej grzybni w mieszaninie

reakcyjnej PCR może dać precyzyjny wynik, chociaż dodanie za dużej ilości badanej grzybni może prowadzić do otrzymania wyników fałszywych.

### *Przygotowanie próbek*

Badaną kulturę wszczepić na płytkę z PDA i inkubować przez 5 dni w 25°C i w świetle bliskim UV przez 12 godz. i 12 godz. w ciemności. Używając sterylnego szkiełka podstawowego zeskrobać 1g badanej grzybni i przenieść do sterylnego moździerza. Następnie dodać po 100µl 1% Na<sub>2</sub>SO<sub>3</sub>, 1% nierozpuszczalnego PVP, 4% surowiczej albuminy wołowej i 1ml buforu ekstrakcyjnego (20mM sodowe EDTA, 100mM Tris-HCl doprowadzone do pH 8,0 z użyciem HCl, 1,4M NaCl i 2% CTAB). Próbkę rozetrzeć w moździerzu, a następnie przenieść do sterylnej, zakręcanej 2 ml próbówki wirówkowej. Próbówkę zakręcić i odwracać dwukrotnie. Następnie umieścić w bloku grzejnym w temp. 65°C i podgrzewać przez 20 min, zawartość próbówki mieszać okresowo poprzez jej odwracanie. Reakcję podgrzewania schłodzić umieszczając próbówkę w lodzie na 2min., a następnie odwirować w 11 000 g przez 5 min. Do dalszych badań zachować supernatant.

### *Oczyszczanie DNA*

Przygotować mieszaninę do oczyszczenia DNA w butelce uniwersalnej: do 12ml zimnego chloroformu (-20°C) dodać 0,5ml alkoholu izoamyłowego. Butelkę zamknąć nakrętką i odwrócić kilka razy w celu wymieszania i umieścić na lodzie. Pobrać jedną objętość (400-600µl) supernatantu badanej próbki i 0,8 objętości mieszaniny oczyszczającej do 2 ml próbówki. Zamknąć próbówkę i odwrócić kilka razy w celu wymieszania zawartości. Odwirować w 11 000g, przez 5min. Supernatant przenieść do czystej próbówki, a resztę usunąć do butli z odpadami rozpuszczalnymi. Postępowanie powtórzyć w celu zapewnienia podwójnego oczyszczenia supernatantu.

### *Wytrącanie DNA*

Do czystej 2 ml próbówki zawierającej 0,5 objętości 5M NaCl i 1,5 objętości izopropanolu dodać 350-400µl (1 objętość) podwójnie oczyszczonego DNA. Próbówkę zamknąć i kilka razy odwrócić. W celu wytrącenia DNA próbówkę umieścić na 20 min. w zamrażarce w temp. -20°C. Następnie odwirować w 11 000g przez 5min. Supernatant usunąć do butli z odpadami rozpuszczalnymi. Pozostały osad DNA obmyć w 400µl 70% alkoholu etylowego i odwirować. Ponownie usunąć supernatant, a sztykę próbówki oprzeć na papierze absorpcyjnym. Aby wysuszyć DNA próbówkę pozostawić otwartą w komorze z laminarnym przepływem. Rozpuścić DNA w 50µl buforu TE (10mM Tris-HCl, pH 8,0 1mM EDTA).

### *Amplifikacja DNA (PCR)*

Przygotować dwie próbówki z 49µl mieszaniny reakcyjnej PCR dla każdej badanej próbki: woda sterylna destylowana 24,75µl; 10x stężony bufor PCR (Perkin Elmer) z 15mM MgCl<sub>2</sub> 5,0µl; starter *CaInt2* (5'-GGG GAA GCC TCT CGC GG-3') (5µM) 5,0µl; starter *ITS4* (5'-TCC TCC GCT TAT TGA TAT GC-3') (5µM) 5,0µl; surowicza albumina wołowa (10 mg/ml) 5,0µl; DATP (10mM) 1,0µl; DCTP (10mM) 1,0µl; DGTP (10mM) 1,0µl; DTTP (10mM) 1,0µl; Ampli Tag polimeraza 5U µl<sup>-1</sup> (Perkin Elmer) 0,25µl. Mieszaninę reakcyjną umieścić w dwóch osobnych 200µl próbówkach reakcyjnych i do każdej z nich dodać 1µl wyizolowanego DNA badanej próbki. Tę samą czynność powtórzyć z mieszaniną reakcyjną, zamieniając starter *CAInt2* starterem uniwersalnym *ITS1* (5'- TCC GTA GGT GAA CCT GCG G-3') (White i wsp. 1990). Ta reakcja PCR potwierdzi, czy w próbce jest namnożone DNA i wystąpi w roli kontroli procesu ekstrakcyjnego. Mieszaninę reakcyjną podgrzać w termocyklerze używając następującego programu: 2 min w 94°C; 30 cykli po 30 sek. w 94°C, 30 sek. w 55°C, 30 sek. w 72°C; 10 min w 72°C.

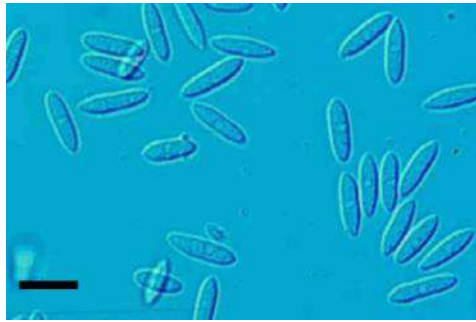
### Wykrywanie produktu amplifikacji

Na arkuszu parafilmu wymieszać 10 $\mu$ l każdej próbki PCR z 2 $\mu$ l buforu obciążającego (0,25% błękit bromofenolowy, 0,25% xylene cyanol FF w 30% glicerolu w wodzie). Wymieszane próbki oraz marker 100-1000 pz. nanieść do oddzielnych kieszonek 1,5% żelu agarozowego przygotowanego w 1x TBE o pH 8,0 (9,0mM Tris, 8,9mM kwasu borowego i 2,5mM EDTA). Żel rozwinąć przez 1 godz. i napięciu 80V, a następnie wybarwić przez 30 min. w wodnym roztworze bromku etydyny (0,5  $\mu$ g mL<sup>-1</sup>). Po wybarwieniu żel umieścić w kuwecie z czystą wodą w celu wypłukania nadmiaru bromku etydyny, a następnie wizualizować w świetle o długości fali 312 nm i dokumentować obraz badania.

### Ocena wyników

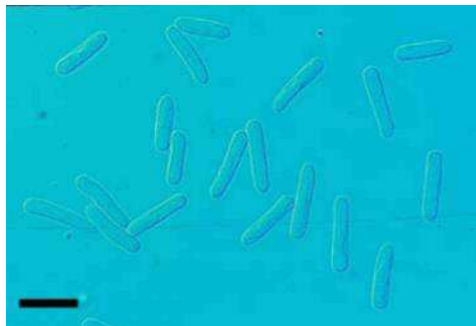
Badany ekstrakt, zawierający namnożone DNA *G. acutata* ze starterami *CaInt2* i *ITS4*, produkuje pojedynczy amplikon o wielkości 490 pz. Jeśli próbka nie tworzy tej wielkości prążka, ale produkuje pojedynczy amplikon o wielkości 550 pz. z uniwersalnymi starterami *ITS1* i *ITS4* wówczas obecność *G. acutata* nie została udowodniona. Ekstrakt, który nie produkuje ani jednego ani drugiego prążka należy rozcieńczyć 10x stężonym buforem TE i ponownie badać testem PCR. Jeśli próbki nadal nie tworzą żadnego prążka to należy ponownie wyekstrahować i zbadać DNA. Identyfikację amplikonów z reakcji PCR można następnie potwierdzić, o ile jest to wymagane, przez sekwencjonowanie i porównać ze znaną sekwencją *G. acutata*, zdeponowaną w Banku Genów (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/>).

**Ryc. 1. i 2.** Konidia *Colletotrichum acutatum* stadium *Glomerella acutata* i *C. gloeosporioides* stadium *G. cingulata*.



**Ryc. 1.** Konidia *Colletotrichum acutatum*

*Uwaga:* Na tej ilustracji większość konidiów ma charakterystyczny wrzecionowaty kształt i zaostrome oba końce. Jednakże, stosunek konidiów z zaostrozonymi końcami jest różny i zależy od izolatu. W niektórych izolatach wiele konidiów ma zaokrąglony jeden koniec lub oba. Niektóre izolaty mają niespotykane długie konidia (np., 20  $\mu\text{m}$  długie). (Bar = 10  $\mu\text{m}$ ).



**Ryc. 2.** Konidia *Colletotrichum gloeosporioides* stadium *Glomerella cingulata*

*Uwaga:* Na tej ilustracji większość konidiów ma charakterystyczny cylindryczny kształt (nie wrzecionowaty) i zaokrąglone oba końce, ale u niektórych izolatów konidia mogą być zaostrome na jednym końcu. (Bar = 10  $\mu\text{m}$ ).

<b>Tłumaczenie z jęz. angielskiego:</b>	<b>Sprawdził:</b>	<b>Zatwierdził:</b>
Grażyna Szkuta (GIORiN CL)	Janina Butrymowicz (GIORiN CL)	Janina Butrymowicz (GIORiN CL)
15.10.2009		