

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 7/32



Organisation Européenne et Méditerranéenne pour la Protection des Plantes  
1, rue Le Nôtre, 75016 Paris, France

## **Zatwierdzanie**

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

## **Przegląd**

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

## **Nowelizacja**

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

## **Dystrybucja**

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

## **Zakres**

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

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

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

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

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

### **Materiały źródłowe<sup>1</sup>**

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

### **Definicje**

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

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

### **Zarys wymagań**

Protokoły diagnostyczne EPPO dotyczące agrofagów podlegających przepisom dostarczają wszystkich niezbędnych informacji dotyczących określonego agrofaga w celu jego wykrycia i prawidłowej identyfikacji dokonanej przez eksperta (np. specjalisty w dziedzinie entomologii, mikologii, wirusologii, bakteriologii itp.). Każdy protokół rozpoczyna się krótką ogólną informacją dotyczącą agrofaga (jego występowania, stosunku do innych organizmów, zakresu żywicieli,

<sup>1</sup> W nawiasach kwadratowych podana oryginalna pisownia. (przyp. tłum.)

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, metody wykrywania lub ekstrakcji, metod badawczych).

### **Standardy EPPO z tej serii**

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

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

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

## Protokoły diagnostyczne dotyczące agrofagów podlegających przepisom<sup>2</sup> Protocoles de diagnostic pour les organismes réglementés

### *Plum pox potyvirus* (*Wirus ospowatości śliwy*)

#### Zakres

Standard opisuje protokół diagnostyczny dla *Plum pox potyvirus*.

#### Zatwierdzenie i nowelizacja

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

#### Wprowadzenie

Szarka (ospowatość śliwy) uważana jest za jedną z chorób powodujących najwięcej zniszczeń wśród drzew pestkowych, zarówno z powodu wpływu choroby na rolnictwo jak i jej znaczenia ekonomicznego (Dunez & Sutic, 1988; Németh, 1994). Choroba ta jest niezwykle szkodliwa dla drzew moreli, brzoskwini i śliwy, gdyż powoduje obniżenie jakości oraz przedwczesne opadanie owoców. Powodowana jest przez *Plum pox virus* (PPV), należącego do rodzaju *Potyvirus* w rodzinie *Potyviridae* (López-Moya & García, 1999).

PPV ma swoje korzenie we wschodniej Europie. Po raz pierwszy choroba opisana została około 1917 roku na śliwach, a w roku 1933 na morelach w Bułgarii (Atanasoff, 1932, 1935). Od tamtego czasu wirus rozprzestrzenił się na znaczny obszar kontynentu europejskiego, wokół basenu Morza Śródziemnego oraz na Bliskim i Środkowym Wschodzie. Znaleziono go również w Indiach i Ameryce (Chile, USA i Kanada).

Wprowadzanie zainfekowanego rozmnożeniowego materiału roślinnego uważane jest za najważniejszy sposób umożliwiający rozprzestrzenianie się PPV na duże odległości. Dodatkowo, wirus przenoszony jest w sposób nietrwały przez egzystujące w każdym regionie liczne gatunki mszyc (Kunze & Krczal, 1971; Labonne *i wsp.*, 1995). Opisane zostały również izolaty przenoszone drogą inną, aniżeli mszyce (Maiss *i wsp.*, 1989; López-Moya *i wsp.*, 1995).

Cząsteczki PPV mają postać nitkowatych pałeczek (flexuous rods) wielkości około 700 x 11 nm, zbudowanych z pojedynczej, jednoniciowej cząsteczki RNA wielkości blisko 10 000 nukleotydów, opłaszczonej do 2000 podjednostkami białek płaszcza (CP). Strategia ekspresji PPV, tak jak i innych potywirusów, sprowadza się do translacji unikalnej długiej otwartej ramki odczytu (ORF), co w następstwie prowadzi do uzyskania wirusowych produktów. W ciągu ostatnich lat wiedza na temat biologii molekularnej PPV w szczególności, ale i potywirusów ogółem (Riechmann *i*

---

<sup>2</sup> Ryciny w niniejszym standardzie oznaczone „Web Fig.” zostały opublikowane na stronie internetowej EPPO [www.eppo.org](http://www.eppo.org).

wsp., 1992; Shukla *i wsp.*, 1994; Revers *i wsp.*, 1999), znacząco wzrosła. Przeróżne biotechnologiczne aspekty odnoszą się do PPV, włączając w to nowe techniki diagnostyczne ułatwiające wykrywanie i klasyfikowanie według typów izolatów wirusa, strategie pozyskiwania pochodzącej od patogena odporności poprzez transformację roślin, potencjalne możliwości użycia elementów genetycznych pochodzących z organizmu wirusowego, oraz wektorów ekspresyjnych PPV (López-Moya *i wsp.*, 2000). Liczne izolaty PPV różnią się biologicznymi i epidemiologicznymi właściwościami, takimi jak zjadliwość, zdolność przenoszenia przez mszyce oraz symptomatologia. Dwie główne grupy: Dideron (D) i Marcus (M) ustabilizowały się serologicznie (Kerlan & Dunez, 1976). Izolaty PPV należące do grupy D lub M wykazują zróżnicowane zachowania epidemiologiczne. Izolaty z grupy M rozprzestrzeniane są przez mszyce dużo łatwiej, aniżeli izolaty D i powodują zdecydowanie silniejsze objawy na brzoskwiach. Izolaty z grupy D w naturalny sposób infekują morele i śliwy i rzadko rozprzestrzeniają się z tych żywicieli na brzoskwinię. Istnienie tych dwóch grup oparte jest również na: (1) odmiennym wzorze serologicznym lub reakcji z D- bądź M-specyficznymi przeciwciałami monoklonalnymi (Cambra *i wsp.*, 1994; Boscia *i wsp.*, 1997); (2) elektroforetycznej mobilności wirusowych CP (Ravelonandro *i wsp.*, 1988; Bousalem *i wsp.*, 1994; Pasquini & Barba, 1994); (3) informacji zawartej w sekwencji nukleotydowej całkowitej, bądź częściowej, zawierającej 3'-terminalny region genomu kilku izolatów PPV (Ravelonandro *i wsp.*, 1988; Laín *i wsp.*, 1989; Maiss *i wsp.*, 1989; Teycheney *i wsp.*, 1989; Wetzel *i wsp.*, 1991a; Cervera *i wsp.*, 1993; Palkovics *i wsp.*, 1993); (4) analizie powstałych w wyniku łańcuchowej reakcji polimerazy (PCR) fragmentów sekwencji odpowiadających C- terminalnemu regionowi białka CP PPV oraz powstałych w wyniku cięcia *RsaI* polimorficznej długości fragmentów restrykcyjnych (RFLP) (Wetzel *i wsp.*, 1991b; Bousalem *i wsp.*, 1994; Candresse *i wsp.*, 1994); (5) różnych wariantach PCR, hemi-nested PCR, nested PCR oraz Co-operational PCR (Co-PCR) z użyciem specyficznych starterów (Candresse *i wsp.*; Olmos *i wsp.*, 1997, 1999, 2002), włączając kolorymetryczną detekcję amplikonów z D- lub M-specyficznymi sondami. Dwie dodatkowe grupy izolatów PPV to: El Amar (EA) i Cherry (C). Izolaty PPV-EA różnią się nukleotydową sekwencją (Wetzel *i wsp.*, 1991a) i mieszczą w swej grupie specyficzne epitopy (Myrta *i wsp.*, 1998). Grupa C została opisana stosunkowo niedawno, po odkryciu, że niektóre izolaty PPV zdolne do infekowania czereśni oraz wiśni, były molekularnie i serologicznie odmienne od innych grup (Nemchinov & Hadidi, 1996; Nemchinov *i wsp.*, 1996) i dawały specyficzne reakcje z przeciwciałami monoklonalnymi (Myrta *i wsp.*, 2000).

Wykrycie któregośkolwiek z izolatów PPV (uniwersalne) może być osiągnięte poprzez użycie przeciwciał monoklonalnych 5B-IVIA (Cambra *i wsp.*, 1994) lub przeciwciał poliklonalnych. Czułe i specyficzne wykrycie izolatów PPV-D (Cambra *i wsp.*, 1994), PPV-M (Boscia *i wsp.*, 1997), PPV-C (Myrta *i wsp.*, 2000) i PPV-EA (Myrta *i wsp.*, 1998) możliwe jest poprzez użycie dostępnych kitów do testu ELISA. Techniki molekularnej hybrydyzacji (Varveri *i wsp.*, 1988) oraz różne oznaczenia oparte na PCR zostały opracowane w celu wykrywania (Korschineck *i wsp.*, 1991; Wetzel *i wsp.*, 1991b, 1992; Candresse *i wsp.*, 1994, 1995; Levy *i wsp.*, 1994; Olmos *i wsp.*, 1996) oraz jednoczesnego wykrywania i typowania izolatów PPV (Olmos *i wsp.*, 1997). Zostały opracowane różne systemy przygotowania materiału wirusowego do reakcji PCR oparte na serologicznym wyłapywaniu wirusa (immunocapture) (Wetzel *i wsp.* 1992), na „print” i „squash” odciskaniu (Olmos *i wsp.*, 1996), co usuwa potrzebę przygotowywania ekstraktów. Użycie immobilizowanych na bibule obiektów (Cambra *i wsp.* 1997) pozwoliło na wykrywanie PPV w pojedynczych osobnikach mszyc (Olmos *i wsp.*, 1997) przy użyciu squash-capture PCR. Nested PCR w pojedynczej zamkniętej próbówce (Olmos *i wsp.*, 1999) został wprowadzony celem czulej detekcji cząsteczek PPV w materiale roślinnym i pojedynczych osobnikach mszyc. Opisany został również system Co-PCR z użyciem uniwersalnej sondy do hybrydyzacji (Olmos *i wsp.*, 2002), dający czułość metody porównywalną do czułości nested PCR. Charakterystyka serologiczna i molekularna izolatów PPV bardzo dobrze ze sobą korelują (Candresse *i wsp.*, 1998).

## Tożsamość

**Nazwa:** *Plum pox potyvirus*

**Synonimy:** Sharka virus

**Akronim:** PPV

**Stanowisko taksonomiczne:** Potyviridae, *Potyvirus*

**Komputerowy kod Bayera:** PPV000

**Kategoria fitosanitarna:** EPPO - lista A2, nr 96; UE - Załącznik II/A2

## Wykrywanie

W naturalnych warunkach, PPV z łatwością poraża owocujące drzewa z rodzaju *Prunus* używane jako odmiany komercyjne i podkładki korzeniowe: morela (*Prunus armeniaca*), śliwa domowa (*Prunus domestica*), śliwa japońska (*Prunus salicina*), brzoskwinia (*Prunus persica*), *Prunus cerasifera* oraz *Prunus cerasifera x munsoniana*. Sporadycznie infekowane mogą być: wiśnia (*Prunus cerasus*) i czereśnia (*Prunus avium*) oraz migdał (*Prunus dulcis*). Wirus ten infekuje również wiele dzikich i ozdobnych gatunków z rodzaju *Prunus*, takich jak: *Prunus besseyi*, *Prunus insititia*, *Prunus tomentosa*, *Prunus triloba* i *Prunus spinosa*.

Możliwe jest sztuczne przeniesienie PPV na liczne gatunki *Prunus* spp., *Sorbus domestica* i niektóre rośliny zielne. *Nicotiana benthamiana*, *Nicotiana glutinosa*, *Pisum sativum* oraz *Chenopodium foetidum* często używane są jako eksperymentalne rośliny żywicielskie w różnych celach.

## Objawy

Objawy chorobowe mogą występować na liściach, płatkach, owocach i pestkach (Web Fig. 1, 2). Na liściach są one szczególnie wyraźne wiosną: delikatne jasnozielone odbarwienia, chlorotyczne plamy, pasy lub pierścienie, przejaśnienie żyłek lub ich żółknięcie, a nawet deformacja liści. U niektórych odmian brzoskwiń objawy mogą wystąpić na płatkach kwiatu (odbarwienia). Zainfekowane owoce wykazują chlorotyczne plamy lub jasno pigmentowane, żółte pierścienie, bądź pasiaste wzory. Owoce mogą być zdeformowane lub nieregularne w kształcie, dodatkowo mogą wystąpić drobne brązowienia lub nekrozy powierzchni. Porażone owoce mogą wykazywać wewnętrzne brązowienie miąższu i obniżoną jakość. W niektórych przypadkach porażone owoce opadają przedwcześnie z drzewa. Zasadniczo, wczesne odmiany są zdecydowanie bardziej podatne na ekspresję objawów na owocach, aniżeli odmiany późniejsze. Na pestkach porażonych moreli widoczne są jasne pierścienie lub plamy.

## Identyfikacja

### Pobieranie próbek

Właściwe pobieranie próbek ma decydujące znaczenie dla detekcji serologicznej lub molekularnej. Do badania należy w pierwszej kolejności pobierać kwiaty, liście lub owoce z widocznymi objawami. W przypadku gdy roślina nie wykazuje objawów choroby, standardowa próbka powinna składać się z 5 pędów lub 10 w pełni wykształconych liści pobranych wokół korony każdego indywidualnego drzewa, ze środkowej części każdej głównej gałęzi, przed pojawieniem się wysokich temperatur na początku lata. W klimacie śródziemnomorskim należy unikać pobierania próbek w okresie od lipca do początku września. Materiał roślinny powinien pochodzić z wewnętrznej struktury drzewa. Próbkę wiosenne mogą stanowić kwiaty, młode pędy lub niewielkie owoce. Jesienią natomiast do analizy mogą być pobierane dojrzałe liście. Próbkę mogą być przechowywane w

temperaturze 4°C przez okres nie dłuższy niż 7 dni przed rozpoczęciem badania. Owoce mogą być przechowywane przez 1 miesiąc w temperaturze 4 °C. Uspione pąki lub kora z pędów lub gałęzi może być pobierana zimą.

### *Przygotowanie próbki do badania*

Należy odważyć około 1 g materiału roślinnego, pociąć go na drobne kawałki i umieścić w odpowiedniej probówce lub plastikowej torebce do dalszej obróbki. Dodać około 20 objętości buforu ekstrakcyjnego (Cambra *i wsp.*, 1994) i homogenizować próbkę w probówce używając Polytron (Kinematica) lub podobnego urządzenia. Alternatywnie, próbka może być homogenizowana w plastikowej torebce przy użyciu urządzenia Homex 6 (Bioreba) lub homogenizera ręcznego, młotka albo podobnego narzędzia. Skład buforu ekstrakcyjnego: bufor fosforanowy (PBS) pH 7,2–7,4 (Załącznik 1)<sup>3</sup>, wzbogacony o 2% Polywinylopyrrolidone (PVP-10) i 0.2% sodium diethyl dithiocarbamate (DIECA). Próbkę do testów serologicznych mogą być przygotowywane zarówno w probówkach, jak i w plastikowych torebkach. Próbkę do testów molekularnych powinny być przygotowywane w indywidualnych, plastikowych torebkach.

### **Testy biologiczne**

Celem testów biologicznych jest wykrycie obecności PPV w roślinach wprowadzanych do obiegu lub poddawanych selekcji, lub w próbkach, dla których winien być określony status fitosanitarny. Głównymi roślinami wskaźnikowymi używanymi w badaniach nad PPV są: sadzonki *Prunus persica* GF 305 lub Nemaguard albo *Prunus tomentosa*. Rośliny testowe powinny zostać zaszczepione według konwencjonalnych metod (Desvignes, 1999), w 4 – 6 powtórzeniach i utrzymywane w standardowych warunkach. Objawy powinny zostać porównane z pozytywną i negatywną rośliną kontrolną.

### **Testy serologiczne**

Test DAS-ELISA (Double Antibody Sandwich Indirect ELISA) lub Triple Antibody Sandwich (TAS), wykonywany jest zgodnie z Cambra *i wsp.* (1994) według szczegółowego protokołu opisanego w Załączniku 3 oraz materiałów (specyficzne monoklonalne przeciwciała 5B-IVIA) opisanych w Załączniku 1, dla uniwersalnej detekcji któregośkolwiek izolatu PPV. Charakterystyka lub typowanie PPV-D lub PPV-M może zostać wykonane zgodnie z protokołem opisanym w Załączniku 3 i materiałami (D lub M specyficzne przeciwciała monoklonalne) opisanymi w Załączniku 1.

Standardowy test DAS-ELISA (układ biotyna/streptawidyna) wykonywany jest zgodnie z Clark & Adams (1977), według szczegółowego protokołu opisanego w Załączniku 3 oraz materiałów (specyficzne monoklonalne przeciwciała 5B-IVIA lub przeciwciała poliklonalne) opisanych w Załączniku 1, dla uniwersalnej detekcji któregośkolwiek izolatu PPV.

---

<sup>3</sup> W wersji oryginalnej protokołu numeracja załączników w tekście nie odpowiada numerom załączników dołączonych do dokumentu. Błędy te nie zostały poprawione w tłumaczeniu i odpowiadają wersji oryginalnej dokumentu. (przyp. tłum)



## Testy molekularne

### *Immunocapture RT-PCR (IC-RT-PCR)*

Etap serologicznego wyłapywania wirusa (immunocapture phase) oraz RT-PCR wykonywane są zgodnie z Wetzel *i wsp.* (1991b, 1992), Olmos *i wsp.* (1997) oraz Rosner *i wsp.* (1998), według szczegółowego protokołu opisanego w Załączniku 4 oraz materiałów opisanych w Załączniku 2 (oligonukleotydowe sekwencje starterów i bufory), dla uniwersalnej detekcji któregośkolwiek izolatu PPV.

Charakterystyka lub typowanie PPV-D, bądź PPV-M może zostać wykonane zgodnie z protokołem opisanym w Załączniku 4 i materiałami (PD i PM specyficznymi starterami) opisanymi w Załączniku 2. Charakterystyki można również dokonać poprzez molekularną hybrydyzację zamplifikowanych produktów reakcji IC-RT-PCR (startery P1/P2) używając D i M specyficznych sond jak opisano w Załączniku 4 i Załączniku 2.

### *Co-operational PCR (Co-PCR)*

Co-PCR z użyciem oczyszczonego RNA wykonywany jest zgodnie z Olmos *i wsp.* (2002), według szczegółowego protokołu opisanego w Załączniku 4 oraz materiałów opisanych w Załączniku 2 (oligonukleotydowe sekwencje starterów, bufory i sondy), dla uniwersalnej detekcji któregośkolwiek izolatu PPV. Charakterystyka lub typowanie PPV-D, bądź PPV-M może być wykonana według protokołu opisanego w Załączniku 4 z użyciem materiałów (sondy D i M specyficzne) opisanych w Załączniku 2.

## Możliwość pomyłki z podobnymi gatunkami

Brak.

## Wymagania dla pozytywnej diagnozy

Jeśli PPV diagnozowany jest po raz pierwszy, lub w przypadkach krytycznych (import/eksport), powinno zostać wprowadzone i zapewnione co następuje (zobacz również Ryc. 3):

- Oryginalna próbka (z etykietami, o ile ma to zastosowanie) powinna być przechowywana w odpowiednich warunkach tak długo, jak to możliwe. Ekstrakt z próbki oraz produkt po amplifikacji PCR należy przechowywać w temperaturze – 80 °C przez okres 3 miesięcy (lub dłużej do celów prawnych).
- Kombinacja dwóch różnych testów przesiewowych, opartych na testach biologicznych (inokulacja zdrewniałych roślin wskaźnikowych), testach serologicznych lub na detekcji molekularnej (z użyciem zwalidowanych protokołów i odczynników) wymagana jest w celu potwierdzenia pozytywnej detekcji PPV.
- W celu określenia typu izolatu PPV z zainfekowanej PPV rośliny żywicielskiej, wymagana jest metoda umożliwiająca charakterystykę, oparta na DASI-ELISA, IC RT-PCR, bądź molekularnej hybrydyzacji, przy użyciu określonych odczynników. W przypadku pierwszych wykryć PPV należy zsekwencjonować przynajmniej białko płaszczu PPV (CP) w celu porównania z wcześniej opisanymi izolatami D, M, EA oraz C.

## **Raport z badania**

Sprawozdanie z badań przeprowadzonych zgodnie z niniejszym protokołem powinno zawierać:

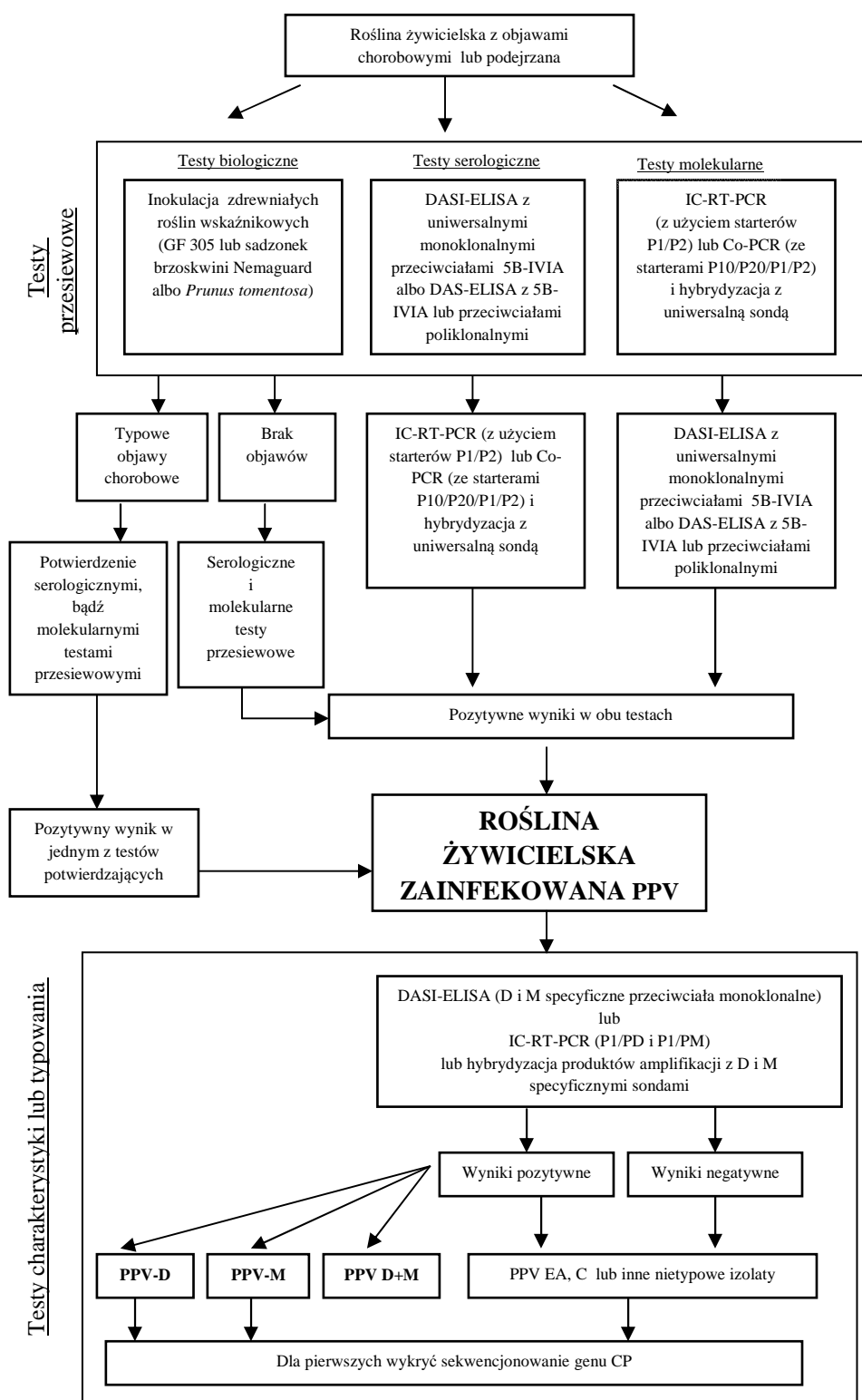
- wyniki uzyskane z zastosowaniem zalecanych procedur
- informacje oraz dokumentację dotyczącą pochodzenia zainfekowanego materiału roślinnego
- opis objawów chorobowych
- informacje o rozmiarze infekcji
- właściwe komentarze co do pewności lub niepewności identyfikacji.

## **Informacje dodatkowe**

Dodatkowe informacje dotyczące tego organizmu można uzyskać od: Instituto Valenciano de Investigaciones Agrarias (IVIA), Department Protección Vegetal y Biotecnología, Carretera de Moncada-Náquera km 5, 46113 Moncada (Valencia) Hiszpania. E-mail: *mcambra@ivia.es*

## **Podziękowania**

W oryginale protokół ten został napisany przez: M. Cambra, A. Olmos i M. T. Gorris, Instituto Valenciano de Investigaciones Agrarias (IVIA), Department Protección Vegetal y Biotecnología, Carretera de Moncada-Náquera km 5, 46113 Moncada (Valencia), Hiszpania.



**Ryc. 3** Schemat decyzyjny wykrycia i identyfikacji wirusa ospowatości śliwy *Plum pox potyvirus*.

Protokół ten poddawany był porównaniom międzylaboratoryjnym w różnych europejskich laboratoriach<sup>4</sup>.

<sup>4</sup> E Grabensteiner and B Suárez (OsterreichischeAgentur für Gesundheit und Ernährungssicherheit GmbH, Wien, AT); J Kummert, S Steyer and E Demonty (Centre de Recherches Agronomiques, Gembloux, BE); P Gentit, N Grasseau & F Chappoux (CTIFL, Prignonieux, FR); VMJ Boeglin, ENSA-INRA, Montpellier, FR); T Candresse, MJ Delucq & L Svanella-Dumas, INRA, Villenave d'Ornon, (FR); W Jarusch & G Krczal, Centrum Grüne Gentechnik, SLFA Neustadt,

Dalszy ciąg przypisu na następnej stronie.

## Materiały źródłowe<sup>5</sup>

- Atanasoff D (1932) Plum pox. A new virus disease. Yearbook University of Sofia Faculty of Agriculture 11, 49–69.
- Atanasoff D (1935) Mosaic of stone fruits. *Phytopathologische Zeitschrift* 8, 259–284.
- Boscia D, Zeramdini H, Cambra M, Potere O, Gorris MT, Myrta A, DiTerlizzi B & Savino V (1997) Production and characterization of a monoclonal antibody specific to the M serotype of plum pox potyvirus. *European Journal of Plant Pathology* 103, 477–480.
- Bousalem M, Candresse T, Quiot-Douine L & Quiot JB (1994) Comparison of three methods for assessing plum pox virus variability: further evidence for the existence of two major groups of isolates. *Journal of Phytopathology* 142, 163–172.
- Cambra M, Asensio M, Gorris MT, Pérez E, Camarasa E, García JA, Moya JJ, López-Abella D, Vela C & Sanz A (1994) Detection of plum pox potyvirus using monoclonal antibodies to structural and non-structural proteins. *Bulletin OEPP/EPPO Bulletin* 24, 569–577.
- Cambra M, Olmos A, Gorris MT, Durán N, Román MP, Camarasa E & Dasí MA (1997) Sensitive detection of plant pathogens by using immobilized targets in tissue imprinted membranes. In: *Diagnosis and Identification of Plant Pathogens* (Ed. Dehne HW et al.), pp. 95–99. Kluwer, Dordrecht (DE).
- Candresse T, Cambra M, Dallot S, Lanneau M, Asensio M, Gorris MT, Revers F, Macquaire G, Olmos A, Boscia D, Quiot JB & Dunez J (1998) Comparison of monoclonal antibodies and polymerase chain reaction assays for the typing of isolates belonging to the D and M serotypes of plum pox potyvirus. *Phytopathology* 88, 198–204.
- Candresse T, Macquaire G, Lanneau M, Bousalem M, Quiot-Douine L, Quiot JB & Dunez J (1995) Analysis of plum pox virus variability and development of strain-specific PCR assays. *Acta Horticulturae* no. 386, 357–369.
- Candresse T, Macquaire G, Lanneau M, Bousalem M, Wetzel T, Quiot-Douine L, Quiot JB & Dunez J (1994) Detection of plum pox potyvirus and analysis of its molecular variability using immunocapture-PCR. *Bulletin OEPP/EPPO Bulletin* 24, 585–594.
- Cervera MT, Riechmann JL, Martín MT & García JA (1993) 3'-Terminal sequence of the plum pox virus PS and o6 isolates: evidence for RNA recombination within the potyvirus group. *Journal of General Virology* 74, 329–334.
- Clark MF & Adams AN (1977) Characteristics of the micro-plate method of enzyme-linked immunosorbent assay for the detection of plant viruses. *Journal of General Virology* 34, 475–483.
- Desvignes JC (1999) *Virus Diseases of Fruit Trees*. CTIFL, Paris, France. Dunez J & Sutic D (1988) Plum pox virus. *European Handbook of Plant Diseases*, pp 44–46 Blackwell, Oxford (GB)
- Kerlan C & Dunez J (1976) Some properties of plum pox virus and its nucleic acid and protein components. *Acta Horticulturae* no. 67, 185–192.
- Korschineck I, Himmler G, Sagl R, Steinkellner H & Kattinger HWD (1991) A PCR membrane spot assay for the detection of plum pox virus RNA in bark of infected trees. *Journal of Virological Methods* 31, 139–146.

---

DE; C Varveri, Benaki. Phytopathological Institute, Kifissia, (GR); L Krizbai, D Sebestyén, I Ember & M Kölber, Central Laboratory for Pest Diagnosis, Gödollo, (HU); A Myrta & N Abou-Ghanem, Istituto Agronomico Mediterraneo, Valenzano, (IT); O Potree, D Boscia, A Minafra, L Barbarossa & M Al Rwahnih, Istituto di Virologia Vegetale del CNR, Bari, (IT); G Pasquinic & M Barba, Istituto Sperimentale per la Patologia Vegetale, Roma, (IT); P Martínez-Gómez, M Rubio & F Dicenta. Campus Universitario de Espinardo, Murcia, (ES); RF González & C Muñoz Noguera, Laboratorio de Sanidad Vegetal de Sevilla, Montequinto, (ES); MÁ Cambra & ML Palazón, Centro de Protección Vegetal, Zaragoza, (ES); E Bertolini, MC Martínez & MT Gorris, IVIA, Laboratorio de Serología, Moncada, Valencia, (ES); R Mumford, A Blockley, B Jarvis & V Harju, Central Science Laboratory, York, (GB)

<sup>5</sup> Została zachowana oryginalna pisownia. (przyp. tłum.)

- Kunze L & Krczal H (1971) Transmission of sharka virus by aphids. *Annales de Phytopathologie H.S.*, 255–260.
- Labonne G, Yvon M, Quiot JB, Avinent L & Llácer G (1995) Aphids as potential vectors of plum pox virus: comparison of methods of testing and epidemiological consequences. *Acta Horticulturae* no. 386, 207–218.
- Laín S, Riechmann JL & García JA (1989) The complete nucleotide sequence of plum pox potyvirus RNA. *Virus Research* 13, 157–172.
- Levy L, Lee IM & Hadidi A (1994) Simple and rapid preparation of infected plant tissue extracts for PCR amplification of virus, viroid and MLO nucleic acids. *Journal of Virological Methods* 49, 295–304.
- López-Moya JJ, Canto T, Díaz-Ruíz JR & López-Abella D (1995) Transmission by aphids of a naturally non-transmissible plum pox virus isolate with the aid of potato virus Y helper component. *Journal of General Virology* 76, 2293–2297.
- López-Moya JJ, Fernández-Fernández MR, Cambra M & García JA (2000) Biotechnological aspects of plum pox virus. *Journal of Biotechnology* 76, 121–136.
- López-Moya JJ & García JA (1999) Potyviruses (Potyviridae). In: *Encyclopaedia of Virology*, 2nd edn (Ed. Webster RG & Granoff A), Vol. 3, pp. 1369–1375. Academic Press, London (GB).
- Maiss E, Timpe U, Briske A, Jelkmann W, Casper R, Himmler G, Mat-tanovich D & Katinger HWD (1989) The complete nucleotide sequence of plum pox virus RNA. *Journal of General Virology* 70, 513–524.
- Myrta A, Potere O, Boscia D, Candresse T, Cambra M & Savino V (1998) Production of a monoclonal antibody specific to the El Amar strain of plum pox virus. *Acta Virologica* 42, 248–250.
- Myrta A, Potere O, Crescenzi A, Nuzzaci M & Boscia D (2000) Production of two monoclonal antibodies specific to cherry strain of plum pox virus (PPV-C). *Journal of Plant Pathology* 82 (Suppl. 2), 95–103.
- Nemchinov L & Hadidi A (1996) Characterization of the sour cherry strain of plum pox virus. *Phytopathology* 86, 575–580.
- Nemchinov L, Hadidi A, Maiss E, Cambra M, Candresse T & Damsteegt V (1996) Sour cherry strain of plum pox potyvirus (PPV): molecular and serological evidence for a new subgroup of PPV strains. *Phytopathology* 86, 1215–1221.
- Németh M (1994) History and importance of plum pox in stone-fruit production. *Bulletin OEPP/EPPO Bulletin* 24, 525–536.
- Olmos A, Bertolini E & Cambra M (2002) Simultaneous and Co-operational amplification (Co-PCR) for detection of plant viruses. *Journal of Virological Methods* 106, 51–59.
- Olmos A, Cambra M, Dasí MA, Candresse T, Esteban O, Gorris MT & Asensio M (1997) Simultaneous detection and typing of plum pox potyvirus (PPV) isolates by hemi-nested PCR and PCR-ELISA. *Journal of Virological Methods* 68, 127–137.
- Olmos A, Cambra M, Esteban O, Gorris MT & Terrada E (1999) New device and method for capture, reverse transcription and nested PCR in a single closed tube. *Nucleic Acids Research* 27, 1564–1565.
- Olmos A, Dasí MA, Candresse T & Cambra M (1996) Print capture PCR: a simple and highly sensitive method for the detection of plum pox virus (PPV) in plant tissues. *Nucleic Acids Research* 24, 2192–2193.
- Palkovics L, Burgyán J & Balázs E (1993) Comparative sequence analysis of four complete primary structures of plum pox virus strains. *Virus Genes* 7, 339–347.
- Pasquini G & Barba M (1994) Serological characterization of Italian isolates of plum pox potyvirus. *Bulletin OEPP/EPPO Bulletin* 24, 615–624.
- Ravelonandro M, Varveri C, Delbos R & Dunez J (1988) Nucleotide sequence of the capsid protein gene of the plum pox potyvirus. *Journal of General Virology* 69, 1509–1516.
- Revers F, Gall OL, Candresse T & Maule AJ (1999) New advances in understanding the molecular biology of plant: potyvirus interactions. *Molecular Plant–Microbe Interactions* 12, 367–376.

- Riechmann JL, Laín S & García JA (1992) Highlights and prospects of poty-virus molecular biology. *Journal of General Virology* 73, 1 – 16.
- Rosner A, Shilboleth Y, Spiegel S, Krisbai L & Kölber M (1998) Evaluating the use of immunocapture and sap-dilution PCR for the detection of Prunus necrotic ringspot virus. *Acta Horticulturae* no. 472, 227 – 233.
- Shukla DD, Ward CW & Brunt AA (1994) Genome structure, variation and function. In: *The Potyviridae* (Ed. Shukla DD; Ward CW & Brunt AA), pp. 74 – 112. CAB International, Wallingford (GB).
- Teycheney PY, Tavert G, Delbos R, Ravelonandro M & Dunez J (1989) The complete nucleotide sequence of plum pox virus RNA (strain D). *Nucleic Acids Research* 17, 10115– 10116.
- Varveri C, Candresse T, Cugusi M, Ravelonandro M & Dunez J (1988) Use of a <sup>32</sup>P labelled transcribed RNA probe for dot hybridization detection of plum pox virus. *Phytopathology* 78, 1280–1283.
- Wetzel T, Candresse T, Macquaire G, Ravelonandro M & Dunez J (1992) A highly sensitive immunocapture polymerase chain reaction method for plum pox potyvirus detection. *Journal of Virological Methods* 39, 27–37.
- Wetzel T, Candresse T, Ravelonandro M & Dunez J (1991b) A polymerase chain reaction assay adapted to plum pox virus detection. *Journal of Virological Methods* 33, 355–365.
- Wetzel T, Candresse T, Ravelonandro M, Delbos RP, Mazyad H, Aboul-Ata AE & Dunez J (1991a) Nucleotide sequence of the 3' terminal region of the RNA of the El Amar strain of plum pox potyvirus. *Journal of General Virology* 72, 1741–174

## **Załącznik 1. Materiały**

### **Materiały do detekcji i charakterystyki PPV w tkance roślinnej przy użyciu testów serologicznych.**

Standardowe kontrole pozytywne PPV i kontrole negatywne oraz specyficzne względem PPV monoklonalne przeciwciała, są komercyjnie dostępne, lub alternatywnie instytucje non-profit mogą je uzyskać w Instituto Valenciano de Investigaciones Agrarias (IVIA), Carretera Moncada-Náquera km 5. 46113 Moncada (Valencia), Hiszpania oraz w Instituto di Virologia Vegetale del CNR, Sezione di Bari, via Amendola 165/A, I-70126 Bari, Włochy. (Dr D. Boscia, E-mail: [csvvdb08@area.ba.cnr.it](mailto:csvvdb08@area.ba.cnr.it))

Kompletne kity do testu DAS-ELISA oraz DASI-ELISA oparte na specyficznych monoklonalnych przeciwciałach 5B-IVIA (PPV uniwersalne), 4D (PPV-D specyficzne) oraz AL (PPV-M specyficzne), do wykrywania i charakterystyki PPV, są komercyjnie dostępne w REAL (zwalidowane w porównaniach międzylaboratoryjnych), CE Durviz S.L., Parque Tecnológico de Valencia, Leonardo Da Vinci 10, 46980 Paterna (Valencia), Hiszpania <http://www.durviz.co>; Grittiest S.R. (zwalidowana w porównaniach międzylaboratoryjnych), Str. Prove. Per Casamassima Km. 3, I-70010 Valenzano, Italy <http://www.agritest.it>; Agdia Incorporated, 30380 County Road 6, 46514 Elkart, USA <http://www.agdia.com>.

Kompletne kity do DAS-ELISA (standardowe) do uniwersalnej detekcji PPV, oparte na poliklonalnych lub monoklonalnych przeciwciałach (innych aniżeli 5B-IVIA) można komercyjnie uzyskać od: Adgen Limited, Nellies Gate. Anchincruive, Ayr KA6 5HW (GB) <http://www.adgen.co.uk>; BIORAD Laboratories-SANOFI, Rue Raimond Poincaré 3-BD, 92430 Marnes La Coquette (FR) <http://www.bio-rad.com>; Bioreba, Chr. Merian-Ring 7, 4153 Reinach BL1 (CH) <http://www.bioreba.ch>; DSMZ, Deutsche Sammlung von Mikroorganismen und Zellkulturen GmbH, Messenweg 11/12, 38104 Braunschweig (DE) <http://www.dsmz.de/nf-plvirus>; Hortitech, Hortitech Diagnostic & Crop Protection Services, Horticulture Research International, Stockbridge House, Cawood, YO8 3TZ Selby (GB) E-mail: [plantclinic.sh@hri.ac.uk](mailto:plantclinic.sh@hri.ac.uk); LOEWE Biochemica GmbH, Mühiweg 2a, D-82054 Sauerlach (DE) <http://www.loewe-info.com>; Plant Research International B.V., PO Box 16, 6700 AA Wageningen (NL) <http://www.plant.wagenin-gen-ur.nl>.

Dla systemu biotyna/streptawidyna są one dostępne od: INGENASA, Hermanos García Noblejas 41, 2<sup>a</sup> planta, 28037 Madrid (ES) <http://www.ingenasa.es>.

Koźle antymysie przeciwciała skoniugowane z alkaliczną fosfatazą dostępne są w Sigma (Steinhein), Niemcy, pod numerem katalogowym A-3562, a koźle antymysie przeciwciała skoniugowane ze streptawidyną i alkaliczną fosfatazą o numerze katalogowym 1089 161 można uzyskać od Roche Diagnostics GmbH, Mannheim, Germany.

### **Bufory**

*Bufor fosforanowy (PBS) pH 7,2–7,4:* NaCl 8 g; KCl 0,2 g; Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> x12H<sub>2</sub>O 2,9 g; KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> 0,2 g; woda destylowana 1 l.

*Bufor węglanowy pH 9,6:* Na<sub>2</sub>CO<sub>3</sub> 1,59 g; NaHCO<sub>3</sub> 2,93 g; woda destylowana 1 l.

*Bufor do płukania (PBS, pH 7,2–7,4 z 0,05% Tween 20):* NaCl 8 g; KCl 0,2 g; Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> x 12H<sub>2</sub>O 2,9 g; KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> 0,2 g; Tween 20 500 µL; woda destylowana 1 l.

*Bufor substratowy dla alkalicznej fosfatazy :* dietanoloamina 97 ml; rozpuścić w 800 ml wody destylowanej, doprowadzić pH do 9,8 za pomocą stężonego HCl; dopełnić do 1000 ml wodą destylowaną.

### **Materiały do detekcji i charakterystyki PPV w tkance roślinnej przy użyciu testów molekularnych.**

Standardowe kontrole pozytywne PPV i kontrole negatywne oraz specyficzne względem PPV oligonukleotydydowe sekwencje starterów i sond są dostępne dla instytucji non-profit w Instituto Valenciano de Investigaciones Agrarias (IVIA), Carretera Moncada-Náquera km 5. 46113 Moncada (Valencia), Hiszpania oraz w Institute National de Recherche Agronomique (INRA), Centre de Bordeaux, Equipe de Virologie UMR GD2P, IBVM., BP 81, 33883 Villenave d'Ornon Cedex, Francja (Dr Thierry Candresse, E-mail: [tc@bordeaux.inra.fr](mailto:tc@bordeaux.inra.fr)).

*Zestaw do oczyszczania RNA (RNA purification kit)* (zwalidowany w porównaniach międzylaboratoryjnych) dostępny jest w postaci Rneasy Plant Mini Kit – Cat no. 74904 – Qiagen GmbH (Hilden), Niemcy.

*Oligonukleotydydowe sekwencje starterów (zwalidowane w porównaniach międzylaboratoryjnych):*

P10: 5'–3' GAG AAA AGG ATG CTA ACA GGA

P20: 5'–3' AAA GCA TAC ATG CCA AGG TA

P1: 5'–3' ACC GAG ACC ACT ACA CTC CC

P2: 5'–3' CAG ACT ACA GCC TCG CCA GA

PD: 5'–3' CTT CAA CGA CAC CCG TAC GG

PM: 5'–3' CTT CAA CAA CGC CTG TGC GT

*Oligonukleotydydowe sekwencje sond znakowanych 3'DIG (zwalidowane w porównaniach międzylaboratoryjnych):*

Uniwersalna sonda PPV: TCG TTT ATT TGG CTT GGA TGG AA-Digoksygenina

PPV-D specyficzna sonda: CTT CAA CGA CAC CCG TAC GGG CA-Digoksygenina

PPV-M specyficzna sonda: AAC GCC TGT GCG TGC ACG T- Digoksygenina

*Zestaw do kolorymetrycznego oznaczania amplikonów* (zwalidowany w porównaniach międzylaboratoryjnych) dostępny jest w Roche Diagnostics GmbH, Cat no. 1585 762 (DIG Wash and Block Buffer Set), Cat no. 1093 274 (Anti-Digoxigenin-AP Fab fragments), Cat no. 1465 341 (Multicolor Detection Set) – Mannheim, Niemcy.

## Roztwory buforów i substratu

*Bufor węglanowy pH 9.6:* Na<sub>2</sub>CO<sub>3</sub> 1.59 g, NaHCO<sub>3</sub> 2.93 g, woda destylowana 1 l.

*Bufor do płukania (PBS, pH 7.2–7.4 z 0.05% Tween 20):* NaCl 8 g, KCl 0.2 g, Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> x 12H<sub>2</sub>O 2.9 g, KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> 0.2 g, Tween 20 500 µl, woda destylowana 1 l.

*50X TAE bufor:* Tris 242 g, 0.5 M Na<sub>2</sub>EDTA pH 8.0 100 ml, lodowaty kwas octowy 57.1 ml, uzupełnić wodą destylowaną do 1 l.

*Bufor obciążający:* 0.25% błękit bromofenolowy, 30% glicerol w H<sub>2</sub>O

*Bufor 20X SSC:* 3M NaCl, 300 mM cytrynian sodu (sodium citrate), pH 7.0; rozpuścić 175.3 g NaCl i 88.2 g cytrynianu sodu -2H<sub>2</sub>O w 800 mL H<sub>2</sub>O, 2 g KCl, Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>-7H<sub>2</sub>O i 2.4 g KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> w 800 mL H<sub>2</sub>O; doprowadzić pH do 7.4 za pomocą HCl; dopełnić do 1 l wodą destylowaną. Sterylizować przez autoklawowanie.

*SDS 10% (w/v)* w sterylnej wodzie, filtrowany przez membranę o średnicy porów 0.2 – 0.45 µm; rozpuścić 100 g kryształków siarczanu sodowo-laurylowego (SDS) w 900 mL H<sub>2</sub>O; ogrzać do 68 °C w celu rozpuszczenia kryształków; doprowadzić pH do 7.2 za pomocą HCl (około 50 µl); dopełnić wodą do objętości 1 l.

*Bufor maleinowy:* 100 mM kwas maleinowy, 150 mM NaCl, pH 7.5; 10X bufor ten w formie gotowej do użycia dostępny jest w zestawie Roche DIG Wash and Block Buffer Set (numer katalogowy 1585762); butelka (2). *Bufor do płukania:* 100 mM kwas maleinowy, 150 mM NaCl, pH 7.5, 0.3% (v/v) Tween 20; 10X bufor ten w formie gotowej do użycia dostępny jest w zestawie Roche DIG Wash and Block Buffer Set (Cat. no. 1585762); butelka (1).

*Roztwór blokujący:* w celu uzyskania wyjściowego roztworu 10% (w/v), rozpuścić 10 g odczynnika blokującego (Roche, Cat. no. 1096 176) w 100 ml buforu maleinowego poprzez kilkakrotne ogrzewanie w mikrofalówce po 30 s (w sumie 3– 4 min); nie doprowadzać do wrzenia; alternatywnie rozpuścić 10 g odczynnika blokującego w 100 ml buforu maleinowego; ogrzewać w 60 °C przez około 1 h do kompletnego rozpuszczenia; sterylizować przez autoklawowanie; rozcieńczać do odpowiedniego stężenia buforem maleinowym; 10X roztwór wyjściowy (10% w/v) w formie gotowej do użycia dostępny jest w zestawie Roche DIG Wash and Block Buffer Set (Cat. no. 1585762); butelka (3)

*Bufor TE pH 8.0:* 10 mM Tris-HCl, 1 mM EDTA.

*Roztwór do płukania 2 x:* 2 x SSC z dodatkiem 0.1% SDS.

*Roztwór do płukania 0.5 x:* 0.5x SSC z dodatkiem 0.1% SDS.

*N-lauroylsarcosine:* 10% (w/v) roztwór w wodzie sterylnej filtrowany przez membranę o średnicy porów 0.2 – 0.45 µm .

*Formamid:* 500 ml formamidu, 50 g wymiennika jonowego: AG 501-X8 Resin (Bio-Rad); mieszać 30 min powoli na mieszadle, następnie usunąć żywicę poprzez filtrację i przechowywać dejonizowany formamid w 20 °C.

*Standardowy bufor hybrydyzacyjny:* 5X SSC, 0.1% lauroylsarcosine, 0.02% SDS, 1% w/v roztwór blokujący.

*Standardowy bufor hybrydyzacyjny + 30% formamid:* 5X SSC, 30% dejonizowany formamid, 0.1% sodium lauroylsarcosine, 0.02% SDS, 2% w/v roztwór blokujący.

*Standardowy bufor hybrydyzacyjny + 50% formamid:* 5X SSC, 50% dejonizowany formamid, 0.1% sodium lauroylsarcosine, 0.02% SDS, 2% w/v roztwór blokujący.

*Anti-digoxigenin-AP roztwór wyjściowy:* 750 units/ml antidigoxigeninowych fragmentów Fab (dostępnych w Roche nr kat. 1093274) skoniugowanych z alkaliczną fosfatazą; stężenie robocze 150 mU/ml; rozcieńczyć roztwór wyjściowy antidigoxigenin-AP w stosunku 1 : 5000.

*Bufor detekcyjny pH 9.5:* 100 mM Tris-HCl, 100 mM NaCl. Bufor 10X w formie gotowej do użycia dostępny jest w zestawie Roche DIG Wash and Block Buffer Set (Cat. no. 1585762; bottle 4).

*Roztwór NBT :* 75 mg/ml nitro blue tetrazolium salt w 70% (v/v) dimethylformamide.

*Roztwór BCIP:* 50 mg/ml 5-bromo-4-chloro-3-indolyl phosphate (BCIP) toluidinium salt w 100% dimethylformamide; zmieszać 45 µl roztworu NBT i 35 µl roztworu BCIP w 10 ml buforu detekcyjnego.



## Załącznik 2. Szczegółowe protokoły do testów serologicznych

### DASI-ELISA (Cambra i wsp., 1994)

1. Przygotować odpowiednie rozcieńczenie poliklonalnych przeciwciał króliczych specyficznych względem PPV (zazwyczaj  $1-2\mu\text{g ml}^{-1}$ ) w buforze węglanowym, pH 9.6 (Załącznik 1). Nakładać po 200  $\mu\text{l}$  do każdej studzienki. Inkubować w  $37\text{ }^{\circ}\text{C}$  przez 4 h lub w  $4\text{ }^{\circ}\text{C}$  przez 16 h. Wyplukać studzienki trzy razy buforem PBS-Tween (buforem do płukania) (Załącznik 1).
2. Do każdej studzienki nakładać po 200  $\mu\text{l}$  ekstraktu roślinnego (patrz przygotowanie próbek). Należy używać po dwie studzienki płytki dla każdej próbki oraz dla kontroli pozytywnych i przynajmniej dwie studzienki dla kontroli negatywnych. Inkubować w  $4\text{ }^{\circ}\text{C}$  przez 16 h. Wyplukać jak poprzednio.
3. Nałożyć specyficzne monoklonalne przeciwciała do uniwersalnej detekcji któregośkolwiek z izolatów PPV lub dla selektywnej detekcji PPV-D albo PPV-M (Załącznik 1): w celu uniwersalnej detekcji PPV przygotować stosowne rozcieńczenie monoklonalnych przeciwciał 5B-IVIA ( $0.1\text{ }\mu\text{g ml}^{-1}$  w buforze PBS z dodatkiem 0.5% albuminy wołowej -BSA) (Załącznik 1). Dla specyficznej detekcji PPV-D z użyciem przeciwciał monoklonalnych 4D lub PPV-M z użyciem przeciwciał monoklonalnych AL (Załącznik 1), postępować jak powyżej. Nałożyć po 200  $\mu\text{l}$  do każdej studzienki. Inkubować w  $37\text{ }^{\circ}\text{C}$  przez 2 h. Wyplukać jak poprzednio.
4. Dodać antymysie przeciwciała związane z alkaliczną fosfatazą: przygotować stosowne rozcieńczenie przeciwciał antymysich związanych z alkaliczną fosfatazą (Załącznik 1) w buforze PBS z dodatkiem 0.5% BSA. Nałożyć po 200  $\mu\text{l}$  do każdej studzienki. Inkubować w  $37\text{ }^{\circ}\text{C}$  przez 2 h. Wyplukać jak poprzednio.
5. Przygotować  $1\text{ mg ml}^{-1}$  substratu alkalicznej fosfatazy (p-nitrofenylofosfat) w buforze substratowym (Załącznik 1). Nałożyć po 200  $\mu\text{l}$  do każdej studzienki. Inkubować w temperaturze pokojowej. Odczytu dokonać przy długości fali 405 nm po upływie 30, 60 oraz 90 min. Wynik testu ELISA uważany jest za negatywny, jeżeli absorbancja próby jest mniejsza, aniżeli dwukrotna absorbancja kontroli negatywnej. Wynik testu ELISA jest pozytywny, jeżeli absorbancja próby jest równa, bądź większa od dwukrotnej absorbancji kontroli negatywnej.

### Standardowy test DAS-ELISA (Clark & Adams, 1977) lub system biotyna/streptawidyna

1. Przygotować stosowne rozcieńczenie przeciwciał poliklonalnych lub monoklonalnych przeciwciał 5B-IVIA (Załącznik 1) (zazwyczaj  $1-2\text{ }\mu\text{g ml}^{-1}$ ) w buforze węglanowym pH 9.6 (Załącznik 1). Nałożyć po 200  $\mu\text{l}$  do każdej studzienki. Inkubować w  $37\text{ }^{\circ}\text{C}$  przez 4 h lub w  $4\text{ }^{\circ}\text{C}$  przez 16 h. Wyplukać płytkę trzy razy PBS-Tween (buforem do płukania) (Załącznik 1).
2. Do każdej studzienki nałożyć po 200  $\mu\text{l}$  ekstraktu roślinnego (patrz przygotowanie prób). Należy użyć po dwie studzienki płytki dla każdej próbki oraz dla kontroli pozytywnych oraz przynajmniej dwie studzienki dla kontroli negatywnych. Inkubować w  $4\text{ }^{\circ}\text{C}$  przez 16 h. Wyplukać jak poprzednio.
3. Dodać specyficzne monoklonalne przeciwciała 5B-IVIA lub poliklonalne przeciwciała związane z alkaliczną fosfatazą lub biotyną (Załącznik 1) do uniwersalnej detekcji któregośkolwiek izolatu PPV: przygotować odpowiednie rozcieńczenie koniugatu (około  $0.1\text{ }\mu\text{g ml}^{-1}$  w buforze PBS z dodatkiem 0.5% albuminy wołowej - BSA). Nałożyć po 200  $\mu\text{l}$  do każdej studzienki. Inkubować w  $37\text{ }^{\circ}\text{C}$  przez 3 h. Wyplukać jak poprzednio.
4. Jeśli przeciwciała są związane z biotyną, należy użyć odpowiedniego rozcieńczenia streptawidyny skoniugowanej z alkaliczną fosfatazą (Załącznik 1). Nałożyć po 200  $\mu\text{l}$  do każdej studzienki. Inkubować w  $37\text{ }^{\circ}\text{C}$  przez 30 min i wyplukać jak poprzednio. Dla obydwu metod (standardowej lub biotyna/streptawidyna), przygotować  $1\text{ mg ml}^{-1}$  substratu alkalicznej fosfatazy (p-nitrofenylofosfat) w buforze substratowym. Nałożyć po 200  $\mu\text{l}$  do każdej studzienki.

Inkubować w temperaturze pokojowej, a odczytu dokonać przy długości fali 405 nm po upływie 30, 60 i 90 min. Wynik testu ELISA uważany jest za negatywny, jeżeli absorbancja próby jest mniejsza, aniżeli dwukrotna absorbancja kontroli negatywnej. Wynik testu ELISA jest pozytywny, jeżeli absorbancja próby jest równa, bądź większa od dwukrotnej absorbancji kontroli negatywnej.

### **Załącznik 3. Szczegółowe protokoły do testów molekularnych**

IC-RT-PCR (Wetzel *i wsp.*, 1991b, 1992; Olmos *i wsp.*, 1997)

#### **Etap serologicznego wyłapywania wirusa (immunocapture phase) (IC) zgodnie z Wetzel *i wsp.* (1992)**

Przygotować opłaszczone probówki Eppendorf: przygotować rozcieńczenie (1 µg/ml) przeciwciał poliklonalnych lub monoklonalnych (5B-IVIA) specyficznych względem PPV w buforze węglanowym pH 9.6 (Załącznik 2). Rozprowadzić po 100 µl przygotowanego rozcieńczenia przeciwciał do probówek Eppendorf. Inkubować w 37 °C przez 3 h. Płukać probówki dwukrotnie 150 µl sterylnego buforu do płukania (Załącznik 2).

Sklarować 100 µl wcześniej uzyskanego ekstraktu roślinnego (patrz przygotowanie próbek) poprzez wirowanie (5 min w 13 000 obrotów min<sup>-1</sup>) i poddać fazie serologicznego wyłapywania wirusa przez 2 godziny na lodzie (Rosner *i wsp.*, 1998) lub alternatywnie w 37 °C (Wetzel *i wsp.*, 1992), w opłaszczonych probówkach Eppendorf. Płukać probówki Eppendorf trzykrotnie jak poprzednio.

#### **Amplifikacja RT-PCR**

Ogólna detekcja PPV (startery P1–P2) według Wetzel *i wsp.* (1991b):

P1: 5'–3' ACC GAG ACC ACT ACA CTC CC  
P2: 5'–3' CAG ACT ACA GCC TCG CCA GA

*Skład mieszaniny reakcyjnej (µl):* H<sub>2</sub>O 15.55; 10X-Bufor do Taq Polimerazy 2.5; 25 mM MgCl<sub>2</sub> 1.5 (1.5 mM); 5 mM dNTPs 1.25 (250 µM); 4% Triton X-100 2 (0.3%); 25 µM starter P1 (1 µM); 25 µM starter P2 1 (1 µM); 10 U µl<sup>-1</sup> AMV 0.1; 5 U µl<sup>-1</sup> Taq Polimeraza 0.1, całkowita objętość 25 µl. Dodać 25 µl mieszaniny reakcyjnej bezpośrednio do wypłukanych probówek.

*Warunki reakcji RT-PCR:* 42 °C przez 45 min; 92 °C przez 2 min; 40 cykli (92 °C przez 30 s, 60 °C przez 30 s i 72 °C przez 1 min); 72 °C przez 10 min; zatrzymanie w 4 °C.

Specyficzna detekcja PPV-D (startery P1-PD) (Olmos *i wsp.*, 1997):

P1: 5'–3' ACC GAG ACC ACT ACA CTC CC  
PD: 5'–3' CTT CAA CGA CAC CCG TAC GG

*Skład (µl):* H<sub>2</sub>O 15.05; 10X-Bufor do Taq Polimerazy 2.5; 25 mM MgCl<sub>2</sub> 1.5 (1.5 mM); 5 mM dNTPs 1.25 (250 µM); 4% Triton X-100 2 (0.3%); 25 µM starter P1 1 (1 µM); 25 µM starter PD 1 (1 µM); formamid 0.5 (2%); 10 U µl<sup>-1</sup> AMV 0.1; 5 U µl<sup>-1</sup> Taq Polimeraza 0.1; Całkowita objętość 25 µl. Dodać 25 µl mieszaniny reakcyjnej bezpośrednio do wypłukanych probówek.

Warunki reakcji RT-PCR: 42 °C przez 45 min; 92 °C przez 2 min; 40 cykli (92 °C przez 30 s, 60 °C przez 30 s i 72 °C przez 1 min); 72 °C przez 10 min; zatrzymanie w 4 °C.

Specyficzna detekcja PPV-M (startery P1-PM) (Olmos *i wsp.*, 1997):

P1: 5'-3' ACC GAG ACC ACT ACA CTC CC

PM: 5'-3' CTT CAA CAA CGC CTG TGC GT

Skład ( $\mu$ l): H<sub>2</sub>O 15.05; 10X- Bufor do Taq Polimerazy 2.5; 25 mM MgCl<sub>2</sub> 1.5 (1.5 $\mu$ M); 5 mM dNTPs 1.25 (250 $\mu$ M); 4% Triton X-100 2 (0.3%); 25  $\mu$ M starter P1 1 (1  $\mu$ M); 25  $\mu$ M starter PD 1 (1  $\mu$ M); formamid 0.5 (2%); 10 U  $\mu$ l<sup>-1</sup> AMV 0.1; 5 U  $\mu$ l<sup>-1</sup> Taq Polimeraza 0.1. Całkowita objętość 25  $\mu$ l. Dodać 25  $\mu$ l mieszaniny reakcyjnej bezpośrednio do wypłukanych probówek.

Warunki reakcji RT-PCR: 42 °C przez 45 min; 92 °C przez 2 min; 40 cykli (92 °C przez 30 s, 60 °C przez 30 s i 72 °C przez 1 min); 72 °C przez 10 min; zatrzymanie w 4 °C

### Elektroforeza produktów PCR

Przygotować 2% żel agarozowy w 0.5x buforze TAE (Załącznik 1). Nanieść na parafilm krople buforu obciążającego (Załącznik 1) o objętości około 3  $\mu$ l, dodać 20  $\mu$ l produktu reakcji PCR i wymieszać delikatnie przez zasysanie pipetą przed nałożeniem. Wypełnić kieszonki żelu i dołączyć kontrolę pozytywną i negatywną. Dołączyć marker DNA 100 bp umieszczając go w pierwszej i ostatniej kieszonce żelu. Rozwijać elektroforezę przez 20 min w 120 V (średni stolik: 15 x 10 cm) lub 40 min w 160 V (duży stolik lub komora elektroforetyczna: 15 x 25 cm) w 0.5 x buforze TAE. Moczyć żel w roztworze bromku etydyny (0.5  $\mu$ g ml<sup>-1</sup>) przez 20 min. Dokonać wizualizacji zamplifikowanych fragmentów DNA w UV transiluminatorze. Obserwować produkty reakcji wielkości 243 bp (dla detekcji ogólnej) lub wielkości 198 bp (dla detekcji specyficznej).

Wykrywanie PPV poprzez amplifikację Co-operational (Co-PCR) według Olmos *i wsp.* (2002).

### Oczyszczanie wirusowego RNA przy użyciu RNeasy Plant Mini Kit (Qiagen) (Załącznik 2)

Jako próbki użyć 200  $\mu$ l ekstraktu roślinnego (patrz przygotowanie próbek) i połączyć z buforem RLT (350  $\mu$ l). Energicznie wymieszać. Przepipetować lizat bezpośrednio do QIA shredder spin column (liliowa) umieszczonej w 2-ml probówce zbiorczej (collection tube) i wirować przez 2 min w maksymalnej szybkości. Ostrożnie przenieść supernatant z przesączu do nowej próbki tak, by nie naruszyć osadu w probówce zbiorczej. Do kolejnych etapów użyć jedynie uzyskany supernatant. Dodać 0.5 objętości etanolu (96 –100%) do oczyszczonego lizatu i natychmiast wymieszać poprzez pipetowanie. Nie wirować. Bezzwłocznie kontynuować kolejnym etapem. Nałożyć próbkę mogącą zawierać jakiegokolwiek uformowane precypitaty (osady) na RNeasy mini column (różowa) umieszczonej w 2-ml probówce zbiorczej. Delikatnie zamknąć probówkę i wirować przez 15 s w  $\geq$  8000 g. Usunąć przesącz. Dodać 700  $\mu$ l buforu RW1 na RNeasy column. Delikatnie zamknąć probówkę i wirować przez 15 s w  $\geq$  8000 g celem przemycia kolumnienki. Usunąć zarówno przesącz jak i probówkę zbiorczą. Przenieść RNeasy column do nowej 2 ml-probówki zbiorczej. Napipetować 500  $\mu$ l buforu RPE na RNeasy column. Delikatnie zamknąć probówkę i wirować przez 15 s w  $\geq$  8000 g celem przemycia kolumnienki. Usunąć przesącz. Dodać kolejne 500  $\mu$ l buforu RPE na RNeasy column. Delikatnie zamknąć probówkę i wirować przez 2 min w  $\geq$  8000 g celem osuszenia membrany RNeasy silica gel. Bezpośrednio kontynuować kolejnym etapem by wyeliminować możliwość przeniesienia buforu RPE. Umieścić RNeasy column w nowej 2 ml-probówce zbiorczej, a starą wraz z przesączem usunąć. Wirować w maksymalnej szybkości wirówki przez 1 min. W celu

wypłukania przenieść RNeasy column do nowej 1.5 ml probówki zbiorczej. Napipetować 50 µl wody wolnej od RNaz (RNeasy-free water) bezpośrednio na membranę RNeasy silica gel. Delikatnie zamknąć probówkę i wirować przez 1 min w  $\geq 8000$  g celem wypłukania.

### **Amplifikacja Co-PCR (Olmos i wsp., 2002):**

P10: 5'-3' GAG AAA AGG ATG CTA ACA GGA

P20: 5'-3' AAA GCA TAC ATG CCA AGG TA

P1: 5'-3' ACC GAG ACC ACT ACA CTC CC

P2: 5'-3' CAG ACT ACA GCC TCG CCA GA

*Skład* (µl): H<sub>2</sub>O 8.33; 10X- Bufor do Taq Polimerazy 2.5 (1X bufor); 25 mM MgCl<sub>2</sub> 3 (3 mM); 5 mM dNTPs 2 (400 µM); 4% Triton X-10 1.87 (0.3%); 10 µM starter P10 0.25 (0.1 µM); 10 µM starter P20 0.25 (0.1 µM); 10 µM starter P1 0.125 (0.05 µM); 10 µM starter P2, 0.125 (0.05 µM); DMSO 1.25 (5%); 10 U µl<sup>-1</sup> AMV 0.2; 5 U µl<sup>-1</sup> Taq Polimeraza 0.2. Całkowita objętość 20 µl. Dodać 20 µl mieszaniny reakcyjnej i 5 µl próby RNA bezpośrednio do nowych sterylnych probówek.

Warunki reakcji Co-PCR: 42 °C przez 45 min; 94 przez 2 min; 60 cykli (94 °C przez 15 s, 50 °C przez 15 s, 72 °C przez 30 s), 72 °C przez 10 min; zatrzymanie w 4 °C.

### **Kolorymetryczna detekcja amplikonów (Olmos i wsp., 2002; według Roche Molecular BioChemicals):**

Uniwersalna sonda PPV: TCG TTT ATT TGG CTT GGA TGG AA-Digoksygenina

PPV-D specyficzna sonda: CTT CAA CGA CAC CCG TAC GGG CA-Digoksygenina

PPV-M specyficzna sonda: AAC GCC TGT GCG TGC ACG T-Digoksygenina

Przygotować następujące potrzebne roztwory i bufor (Załącznik 2): bufor 20 x SSC, SDS 10% (w/v) w wodzie sterylnej, bufor maleinowy, bufor do płukania, roztwór blokujący, bufor TE pH 8.0, roztwór do płukania 2X, roztwór do płukania 0.5X, N-lauroylsarcosine, formamid, standardowy bufor hybrydazyjny, standardowy bufor hybrydazyjny + 30% formamid, standardowy bufor hybrydazyjny + 50% formamid, roztwór wyjściowy antydigoksygeninowych przeciwciał skoniugowanych z alkaliczną fosfatazą (antidigoxigenin-AP stock solution), bufor detekcyjny pH 9.5, roztwór substratu. Zamplifikowane cDNA jest denaturowane w 95 °C przez 5 min i natychmiast umieszczane na lodzie. Używane są trzy różne pozytywnie naładowane nylonowe membrany (Roche), jedna w celu ogólnej detekcji PPV, jedna w celu specyficznej detekcji PPV-D i jedna w celu detekcji PPV-M. 1 µl próbki nakładany jest na każdą nylonową membranę. Po nałożeniu próbek membrany suszone są w temperaturze pokojowej i utrwalane przez naświetlanie w świetle UV transiluminatora przez 4 min przy długości fali 254 nm.

*W celu ogólnej detekcji PPV (sonda uniwersalna)*, membrana umieszczana jest w naczyniu hybrydazyjnym i poddawana jest etapowi prehybrydazyjnego. Po etapie prehybrydazyjnego, roztwór jest usuwany i przeprowadzana jest hybrydazyjnego poprzez zmieszanie sondy znakowanej-3'DIG (uniwersalna sonda PPV) ze standardowym buforem hybrydazyjnym tak, by końcowa koncentracja wynosiła 10 pmol ml<sup>-1</sup>. Hybrydować przez okres 2 h w 60 °C. Następnie wypłukać membranę w temperaturze pokojowej dwukrotnie, każdorazowo po 15 min, roztworem do płukania 2X i dwukrotnie, po 15 min, roztworem do płukania 0.5X, równowżyć przez 2 min w buforze do płukania. Blokować przez okres 30 min w 1% roztworze blokującym (w/v). Inkubować membranę w temperaturze pokojowej w roztworze antydigoksygeninowych przeciwciał skoniugowanych z alkaliczną fosfatazą (Załącznik 2) rozcieńczonych w 1% roztworze blokującym w stężeniu roboczym 1 : 5000 (150 mU ml<sup>-1</sup>) (w/v)

przez 30 min. Wyplukać dwukrotnie, po 15 min buforem do płukania. Równoważyć przez 2 min w buforze detekcyjnym. Przygotować substrat: zmieszać 45µl roztworu NBT i 35µl roztworu BCIP w 10 ml buforu detekcyjnego (alternatywnie rozpuścić tabletkę substratu, zawartą w zestawie Roche Multicolor Detection Kit, w 10 ml buforu detekcyjnego). Po 1 h inkubacji z substratem, zatrzymać reakcję poprzez wypłukanie wodą wodociągową.

*W celu specyficznego wykrywania PPV-D (PPV-D specyficzna sonda):* membrana umieszczana jest w naczyniu hybrydyzacyjnym i poddawana jest etapowi prehybrydyzacji w 50 °C przez 1 h z użyciem standardowego buforu hybrydyzacyjnego + 30% formamid. Po etapie prehybrydyzacji, roztwór jest usuwany i przeprowadzana jest hybrydyzacja poprzez dodanie do standardowego buforu hybrydyzacyjnego + 30% formamid sondy specyficznego wykrywania PPV-D znakowanej-3'DIG tak, by końcowa koncentracja wynosiła 10 pmol ml<sup>-1</sup>. Hybrydyzować przez okres 2 h w 50 °C. Następnie płukać membranę w temperaturze pokojowej dwukrotnie, każdorazowo po 15 min roztworem do płukania 2X i dwukrotnie, po 15 min, roztworem do płukania 0.5X i równoważyć przez 2 min w buforze do płukania. Blokować przez okres 30 min w 2% roztworze blokującym (w/v). Inkubować membranę w temperaturze pokojowej w roztworze antydygoksygeninowych przeciwciał skoniugowanych z alkaliczną fosfatazą (Załącznik 2) rozcieńczonych w 2% roztworze blokującym w stężeniu roboczym 1 : 5000 (150 mU ml<sup>-1</sup>) (w/v) przez 30 min. Wyplukać dwukrotnie, po 15 min buforem do płukania, i równoważyć przez 2 min w buforze detekcyjnym. Przygotować substrat: zmieszać 45µl roztworu NBT i 35µl roztworu BCIP w 10 ml buforu detekcyjnego (alternatywnie rozpuścić tabletkę substratu, zawartą w zestawie Roche Multicolor Detection Kit, w 10 ml buforu detekcyjnego). Po 1 h inkubacji z substratem, zatrzymać reakcję poprzez wypłukanie wodą wodociągową.

*W celu specyficznego wykrywania PPV-M (PPV-M specyficzna sonda):* membrana umieszczana jest w naczyniu hybrydyzacyjnym i poddawana jest etapowi prehybrydyzacji w 50 °C przez 1 h z użyciem standardowego buforu hybrydyzacyjnego + 50% formamid. Po etapie prehybrydyzacji, roztwór jest usuwany i przeprowadzana jest hybrydyzacja poprzez dodanie do standardowego buforu hybrydyzacyjnego + 50% formamid sondy specyficznego wykrywania PPV-M znakowanej-3'DIG tak, by końcowa koncentracja wynosiła 10 pmol ml<sup>-1</sup>. Hybrydyzować przez 2 godziny w 50 °C. Następnie płukać membranę w temperaturze pokojowej dwukrotnie, każdorazowo po 15 min roztworem do płukania 2X i dwukrotnie, po 15 min, roztworem do płukania 0.5XS i równoważyć przez 2 min w buforze do płukania. Blokować przez okres 30 min w 2% roztworze blokującym (w/v). Inkubować w temperaturze pokojowej w roztworze antydygoksygeninowych przeciwciał skoniugowanych z alkaliczną fosfatazą (Roche; Ref: 1093 274) rozcieńczonych w 2% roztworze blokującym w stężeniu roboczym 1 : 5000 (150 mU ml<sup>-1</sup>) (w/v) przez 30 min. Wyplukać dwukrotnie, po 15 min buforem do płukania, i równoważyć przez 2 min w buforze detekcyjnym. Przygotować substrat: zmieszać 45µl roztworu NBT i 35µl roztworu BCIP w 10 ml buforu detekcyjnego (alternatywnie rozpuścić tabletkę substratu, zawartą w zestawie Roche Multicolor Detection, Cat. no. 1465 341, w 10 ml buforu detekcyjnego). Po 1 h inkubacji z substratem, zatrzymać reakcję poprzez wypłukanie wodą wodociągową.

**Ryc 1. A:** Objawy przejaśnienia żyłek na liściach brzoskwini odmiany uprawnej Rogal Gem spowodowanych przez PPV-M, **B:** Typowe objawy chorobowe PPV na liściach moreli, i **C:** Objawy PPV na liściach śliwy japońskiej. Courtesy M.Cambra, IVIA, Moncada (Valencia), ES.



**A**

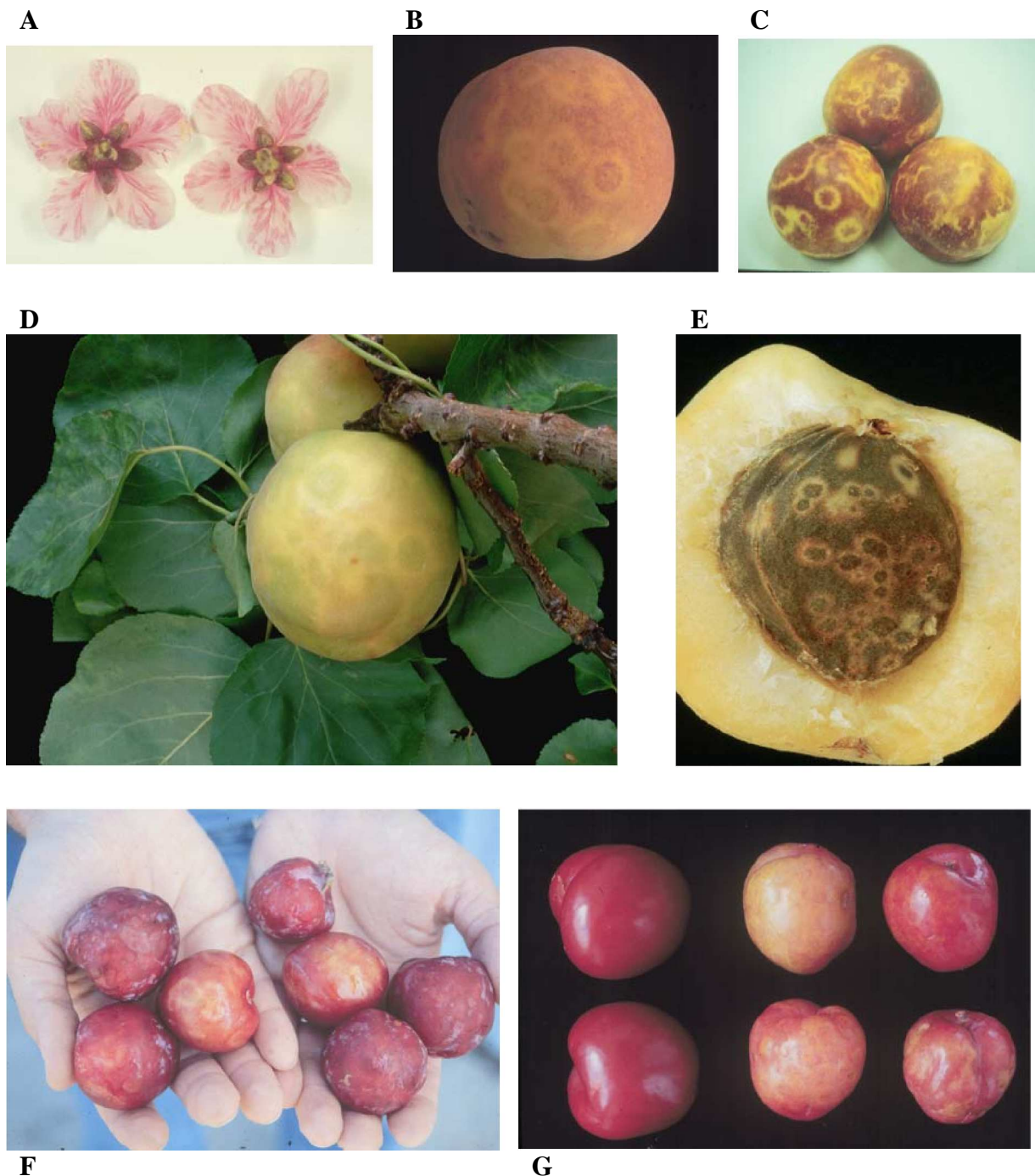


**B**



**C**

**Ryc 2.** **A:** Odbarwienia płatków spowodowane przez PPV- M na kwiatach brzoskwini odmiany uprawnej Baby Gold (Courtesy J.C. Desvignes, CTIFL, FR), **B i C:** Objawy PPV-D i PPV-M odpowiednio na odmianach brzoskwiń Spring Crest i Arm King (Courtesy M. Cambra, IVIA, Moncada (Valencia) ES). **D i E:** Objawy PPV na owocach moreli oraz jasne pierścienie na pestkach tych samych owoców (Courtesy. M.A. Cambra, DG Aragón, Zaragoza, ES). **F i G:** Objawy PPV-D na owocach śliwy japońskiej Red Beaut, należy zauważyć, że na ryc. G porażone owoce porównane są z dwoma zdrowymi owocami po lewej stronie (Courtesy M.Cambra, IVIA, Moncada (Valencia) ES).



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