

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

Normes OEPP

Standardy EPPO

Diagnostyka
Diagnostic
PM 7/49



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

Standardy diagnostyczne EPPO są przeznaczone do stosowania przez Krajowe Organizacje Ochrony Roślin (NPPO), jako ciała odpowiedzialne za stosowanie środków fitosanitarnych.

Standardy protokołów diagnostycznych dotyczą diagnozy określonych agrofagów i opisują różne metody, które mogą być stosowane do wykrywania i identyfikacji szkodników fitosanitarnych dotyczących regionu EPPO. Standardy dotyczące diagnostyki są w przygotowaniu: (1) cel protokołów diagnostycznych (mogą się różnić w zależności od warunków ich stosowania), oraz (2) sprawozdawczość i dokumentacja badań.

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

- 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

Standardy diagnostyczne EPPO 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, metody wykrywania lub ekstrakcji, metod badawczych).

Standardy EPPO z tej serii

Do tej pory zostało zatwierdzonych i opublikowanych 41 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
- PM 7/20 (1) *Erwinia amylovora*. *Bulletin OEPP/EPPO Bulletin* **34**, 159–172
- PM 7/21 (1) *Ralstonia solanacearum*. *Bulletin OEPP/EPPO Bulletin* **34**, 173–178
- PM 7/22 (1) *Xanthomonas arboricola* pv. *corylina*. *Bulletin OEPP/EPPO Bulletin* **34**, 179–182
- PM 7/23 (1) *Xanthomonas axonopodis* pv. *Dieffenbachiae*. *Bulletin OEPP/EPPO Bulletin* **34**, 183–186
- PM 7/24 (1) *Xylella fastidiosa*. *Bulletin OEPP/EPPO Bulletin* **34**, 187–192
- PM 7/25 (1) *Glomerella acutata*. *Bulletin OEPP/EPPO Bulletin* **34**, 193–200
- PM 7/26 (1) *Phytophthora cinnamomi*. *Bulletin OEPP/EPPO Bulletin* **34**, 201–208
- PM 7/27 (1) *Puccinia horiana*. *Bulletin OEPP/EPPO Bulletin* **34**, 209–212
- PM 7/28 (1) *Synchytrium endobioticum*. *Bulletin OEPP/EPPO Bulletin* **34**, 213–218
- PM 7/29 (1) *Tilletia indica*. *Bulletin OEPP/EPPO Bulletin* **34**, 219–228
- PM 7/30 (1) *Beet necrotic yellow vein benyvirus*. *Bulletin OEPP/EPPO Bulletin* **34**, 229–238
- PM 7/31 (1) *Citrus tristeza closterovirus*. *Bulletin OEPP/EPPO Bulletin* **34**, 239–246
- PM 7/32 (1) *Plum pox potyvirus*. *Bulletin OEPP/EPPO Bulletin* **34**, 247–256

- PM 7/33 (1) *Potato spindle tuber pospiviroid*. *Bulletin OEPP/EPPO Bulletin* **34**, 257–270
- PM 7/34 (1) *Tomato spotted wilt tospovirus*. *Bulletin OEPP/EPPO Bulletin* **34**, 271–280
- PM 7/35 (1) *Bemisia tabaci*. *Bulletin OEPP/EPPO Bulletin* **34**, 281–288
- PM 7/36 (1) *Diabrotica virgifera*. *Bulletin OEPP/EPPO Bulletin* **34**, 289–294
- PM 7/37 (1) *Thaumetopoea pityocampa*. *Bulletin OEPP/EPPO Bulletin* **34**, 295–298
- PM 7/38 (1) *Unaspis citri*. *Bulletin OEPP/EPPO Bulletin* **34**, 299–302
- PM 7/39 (1) *Aphelenchoides besseyi*. *Bulletin OEPP/EPPO Bulletin* **34**, 303–308
- PM 7/40 (1) *Globodera rostochiensis* and *Globodera pallida*. *Bulletin OEPP/EPPO Bulletin* **34**, 309–314
- PM 7/41 (1) *Meloidogyne chitwoodi* and *Meloidogyne fallax*. *Bulletin OEPP/EPPO Bulletin* **34**, 315–320

Niektóre ze standardów w niniejszej serii powstały dzięki różnym projektów i konsultacjom dotyczącym 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.

Diagnostyka

Tomato ringspot nepovirus

Zakres

Standard opisuje protokół diagnostyczny dla *Tomato ringspot nepovirus* (ToRSV).

Zatwierdzenie i nowelizacja

Zatwierdzony w 2004-09.

Wprowadzenie

Tomato ringspot virus (ToRSV) jest typowym przedstawicielem rodzaju *Nepovirus* (Stace-Smith, 1996). Cząsteczki wirusa mają izomeryczną postać wielkości 28 nm i są przenoszone przez inokulację sokiem roślinnym. Przekazywany jest w naturalnych warunkach przez wektor - nicienia *Xiphinema americanum sensu lato*. Jest to kompleks gatunków, który nie został dotąd zdefiniowany i w związku z tym nie wiadomo, czy wszyscy członkowie grupy są wektorami. Wektorami ToRSV są *X. Americanum*, *X. Bricolensis*, *X. Californicum*, *X. Intermedium*, *X. Rivesi* i *X. Tarjanensei* (Taylor i Brown, 1997).

ToRSV jest przenoszony z nasionami kilku roślin żywicielskich i może być rozprzestrzeniany z pyłkiem na nasiona lub z pyłkiem na zapyloną roślinę. Zainfekowane nasiona mogą stanowić ważne stałe źródło wirusa w glebie.

Wirus jest znajdowany na zdrewniałych i w pół zdrewniałych roślinach żywicielskich, ale może występować także na zielnych gatunkach roślin ozdobnych i chwastach. Posiada podobny do *Tobacco ringspot nepovirus* (TRSV) zakres gospodarzy (OEPP/EPPO, 2001), jednak o wiele bardziej istotny jest dla upraw owocowych. Najbardziej dotyczy między innymi maliny (*Rubus idaeus*), jeżyny (*R. laciniatus*); winorośl; brzoskwinie; wiśnie; oraz inne rośliny *Prunus* spp.; czarną porzeczkę, agrest, truskawki, borówki (*Vaccinium corymbosum*), *Pelargonium*, *Hydrangea*, *Gladiolus* i *Fraxinus americana*.

Niektóre z chwastów np. *Taraxacum officinale*, mogą stanowić rezerwuar dla wirusa.

ToRSV jest rozpowszechniony w klimacie umiarkowanym Ameryki Północnej, gdzie występują wektory i są one wykrywane na roślinach ozdobnych oraz na uprawach jagodowych w innych częściach świata.

Tożsamość

Nazwa: *Tomato ringspot nepovirus*

Synonimy: Tobacco ringspot nr 2, Nicotiana virus 13, blackberry (Himalaya) mosaic virus, winter peach mosaic virus, prune brown line virus, prunus stem-pitting virus, redcurrant mosaic virus. Szczy: peach yellow bud mosaic virus, grape yellow vein virus, tobacco strain, apple union

necrosis nepovirus, euonymus chlorotic ringspot virus (Stace-Smith, 1996)

Akronim: ToRSV

Stanowisko taksonomiczne: Viruses: *Comoviridae: Nepovirus*

Komputerowy kod EPPO: TMR5XX

Kategoria fitosanitarna: EPPO lista A2 list nr 102, EU, Załącznik I/AI

Wykrywanie

Objawy chorobowe wywoływane przez ToRSV mogą być przydatne do wykrywania, jednak nie mogą być traktowane jako dowód obecności wirusa; do pozytywnej identyfikacji niezbędne są serologiczne lub molekularne badania. Inokulacja zielnych roślin testowych może przynieść korzyści, ponieważ może wykryć wszystkie szczepy. Jednakże istotne jest użycie przynajmniej trzech roślin wskaźnikowych, aby zapewnić pomyślną transmisję (lub dwóch, gdy zastosowano więcej, niż jednego żywiciela rośliny wskaźnikowej). Aby określić specyficzne reakcje występujące na roślinach wskaźnikowych konieczne jest badanie serologiczne lub molekularne.

Naturalne rośliny żywicielskie i symptomatologia

Najbardziej poważne schorzenia powodowane przez ToRSV występujące na uprawach owocowych, obejmują żółte mozaiki pączków na brzoskwiniach i migdałach, które powodują od jasnozielonych do jasnożółtych plam rozwijających się wzdłuż głównego lub bocznego unerwienia liści. Pączki mogą wytwarzać rozety z małych liści lub stawać się jasnożółte i zamierać. Owoce mogą być skarłowaciałe i zniekształcone. Niektóre szczepy wirusa mogą powodować jamkowatość pnia i ogólne zamieranie *Prunus* spp. oraz nekrozy jabłek (OEPP/EPPO, 1991). Rośliny zainfekowane ToRSV wykazują charakterystyczne objawy podobne do reakcji szokowej, chociaż przewlekłe zakażone rośliny zazwyczaj nie wykazują symptomów, lecz ogólny spadek produktywności (Stace, Smith, 1984). Na malinach krzewy są skarłowaciałe, a owoce stają się kruche i mają obniżoną wartość handlową. W trzecim roku od zakażenia 10-80% owocujących pędów ulega zamieraniu. Na winorośli, silnie porażone rośliny mają dużą ilość przemarzniętych pąków oraz słabe pędy o zahamowanym wzroście. Objawy na późnych pędach oraz na liściach są wyraźne, na jednym lub na większej liczbie ulistnionych pędów rozwijają się pierścieniowe plamy i cętki. Grona owocowe są zredukowanej wielkości z zamartwymi jagodami.

Pomidory polowe wykazują widoczne zwijanie się i nekrozy na szczytowych, aktywnie rosnących pędach, podczas gdy młode liście rozwijają nekrotyczne, brązowe pierścienie i faliste linie. Wcześniej zakażone owoce rozwijają od ledwo widocznych szarych do brązowych korkowych, powierzchniowych i koncentrycznych pierścieni oraz częściowych pierścieni (EPPO / CABI, 1997). Objawy na *Pelargonium* odnotowywane są jako plamy pierścieniowe lub słabe chlorotyczne plamki prowadzące do wyblaknięć. Jednakże objawy te są rzadkie, częściej nie obserwuje się ich w ogóle.

Mechaniczna inokulacja roślin testowych

Mechaniczna inokulacja z użyciem roślin zielnych jest prosta, czuła i wiarygodna. Pomimo, iż jest to tradycyjna metoda wykrywania wirusów nie można specyficznie zidentyfikować ToRSV, ponieważ objawy produkowane na roślinach testowych są zwykle takie same dla wszystkich nepowirusów. Jednakże inokulacja roślin testowych może być użyta do wykrywania wirusa i jego izolacji oraz do zwiększania koncentracji ToRSV w tkankach roślinnych dla kolejnych identyfikacji innymi metodami, takimi jak IEM, DAS/TAS-ELISA lub RT-PCR.

Czas wykonania badania może być istotny i należy to rozważyć przed rozpoczęciem pobierania materiału roślinnego. Doświadczenie wykazało, że badania dla *Pelargonium* najlepiej wykonać w

okresie od listopada do kwietnia lub w okresie niższych temperatur. Dla roślin zdrewniałych najlepszym terminem wydaje się być wczesna wiosna od momentu, gdy kwiaty i młode liście mogą być poddane badaniu.

Dla roślin zielnych, możliwe jest także wykrywanie ToRSV z ekstraktu z korzeni.

Bufory ekstrakcyjne używane do inokulacji roślin testowych

Do przygotowania inokulum z większości roślin, zainfekowany materiał powinien być rozdrobniony w 0,02 M Na/K buforze fosforanowym o pH 7,0, zawierającym 2% (w/v) poliwinylpirolidon (PVP) (MW10 000-40 000). Inokulum z *Pelargonium* jest bardziej infekcyjne, gdy liście są rozcierane w 0,06 M buforze fosforanowym o pH 7,6, zawierającym 4% glikol polietylenowy (PEG) (MW 6000) (OEPP /EPPO, 1990). Do inokulum należy dodać celit jako materiał ścierny lub karborundum do posypywania liści przed inokulacją. Aby uniknąć uszkodzeń zainokulowanych liści, mogących maskować objawy, po inokulacji należy zmyć wodą kranową środki ściernie. Zakażone rośliny najlepiej utrzymywać w zakresie temperatur od 18 do 22°C w szklarni lub komorze fitotronowej.

Zalecane rośliny testowe i objawy chorobowe

Chenopodium amaranticolor i *Chenopodium quinoa* - chlorotyczne lub lokalne nekrotyczne uszkodzenia; systemiczne nekrozy wierzchołka; *Nicotiana clevelandii* i *Nicotiana tabacum* - nekrotyczne lokalne zmiany chorobowe rozwijające się w pierścieniu lub plamy pierścieniowe; liście zainfekowane systemiczne zwykle wykazują pierścienie lub liniowe wzory;

Phaseolus vulgaris - lokalne chlorotyczne uszkodzenia; systemiczne pofałdowania i nekrozy wierzchołków liści; *Cucumis sativus* - lokalne chlorotyczne plamy; systemiczne chlorozy i cętki;

Petunia hybrida - miejscowe nekrotyczne zmiany; zamieranie i opadanie młodych systemicznie zainfekowanych liści.

Identyfikacja

Do identyfikacji ToRSV dostępnych jest kilka metod.

Immunoelektronowa mikroskopia (IEM) jest techniką bardzo szybką, oszczędną jednak jedynie w przypadku, gdy wykonywana jest niewielka liczba próbek i dostępny jest transmisyjny mikroskop elektronowy (TEM). Niskie stężenia mogą być trudne do wykrycia. RT-PCR może wystarczać jako pojedyncza metoda wykrywania zależna od rodzaju testowanej rośliny; mogą wystąpić problemy z inhibicją np. *Pelargonium*. Metoda ta jest bardzo czuła jednak wymaga doświadczenia. ELISA w tym DAS-ELISA i TAS/indirect-ELISA, jest techniką szybką, łatwą w użyciu z minimalnymi wymaganiami sprzętowymi. W przypadku, gdy prawdopodobne jest występowanie różnorodnych pod względem serologicznym szczepów wirusa zalecana jest *indirect* (lub TAS) forma testu ELISA (OEPP / EPPO, 1991), jednak niektóre szczepy nadal mogą zostać pominięte. Metody te mogą być stosowane do potwierdzenia objawów pojawiających się na roślinach wskaźnikowych dla ToRSV. Proponowany schemat stosowania wymienionych metod podano na: Rys. 1.

Immunoelektronowa mikroskopia

W IEM (Milne, 1984; Milne i Lesemann, 1984) wiriony są, albo najpierw adsorbowane na siatki mikroskopu elektronowego, albo specyficznie wychwytywane z ekstraktu roślinnego na siatki powlekane surowicą. Jeśli wiriony homologiczne do surowicy użytej do powlekania siatki są obecne w próbce, ta druga sytuacja ma miejsce, generalnie prowadzi to do wychwycenia zdecydowanie większej liczby cząstek wirusowych „uwięzionych” na siatce. Mimo, że taki wzrost liczby cząstek może już zapewnić identyfikację niektórych wirusów, zaadsorbowane lub uwięzione wiriony mogą być następnie inkubowane z surowicą. Jeśli surowica ta jest homologiczna do

zaadsorbowanych lub uwięzionych wirionów wydają się być one „ozdobione”, ponieważ są otoczone przez gęstą aureolę przeciwciał związanych przez cząstki wirusowe. Referencyjny izolot ToRSV i zwykła surowica (preimmune) powinny być użyte odpowiednio jako kontrola dodatnia i ujemna.

IEM wymaga znacznej wiedzy i dostępu do transmisyjnego mikroskopu elektronowego (TEM).

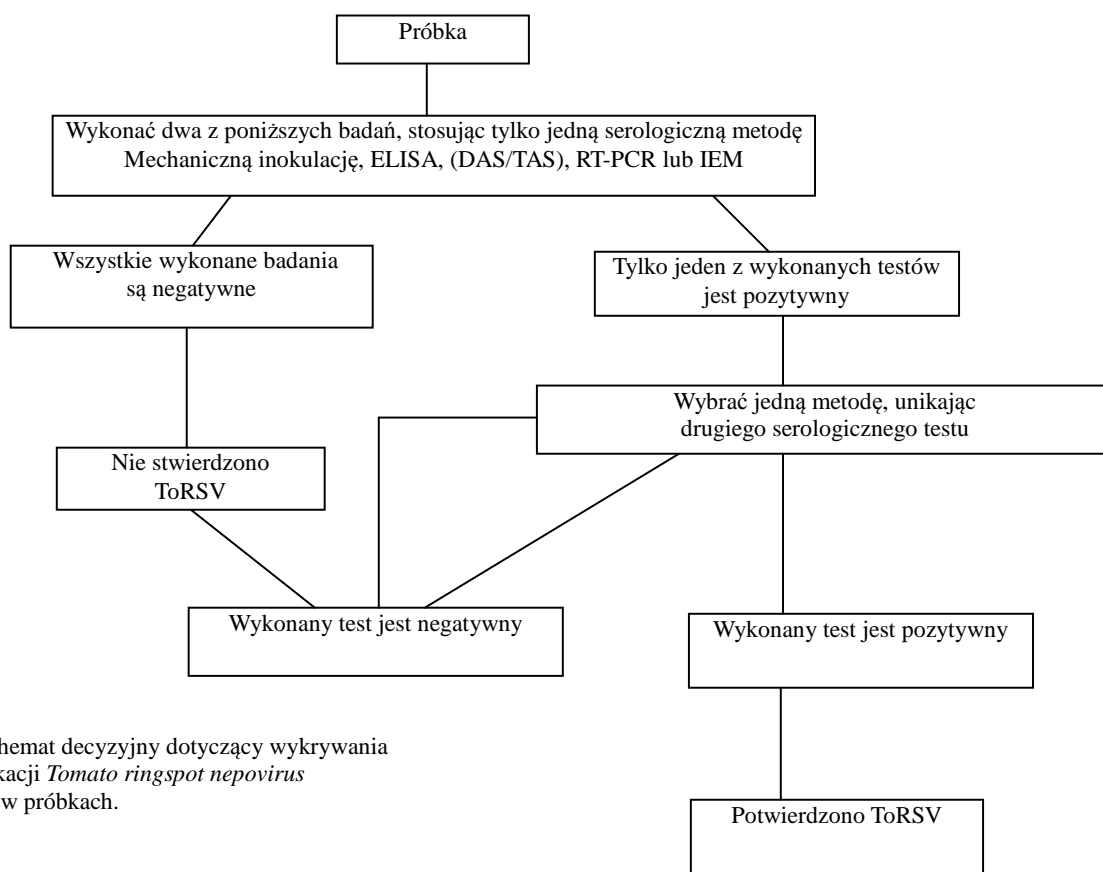
Gdy analizowana jest duża liczba próbek jest również pracochłonna i pochłania dużo czasu.

Jednak dla małej liczby próbek ma tę zaletę, że może być wykonane w bardzo krótkim czasie (poniżej 1 godziny). Ponieważ w rzeczywistości wizualizowane są nie tylko cząstki wirusa, ale również reakcja przeciwciał z wirionami, może to być precyzyjny sposób diagnozy. Jednak niskie stężenia mogą być trudne do wykrycia.

Ponieważ nepowirusy często występują w niskich stężeniach w uprawach roślin polowych i trudno adsorbują na siatki mikroskopu elektronowego, zalecana jest następująca metoda IEM.

Próbki są rozdrabniane za pomocą tłuczka i moździerza w odpowiednich buforach (patrz mechaniczna inokulacja). Siatki mikroskopu elektronowego są pokrywane przeciwciałami ToRSV w temperaturze pokojowej przez 15 minut przez rozprowadzenie (10-20 µl) surowicy ToRSV rozcieńczonej 1:500 lub 1:1000 w buforze soli fosforanowej (PBS) o pH 7,4.

Po przemyciu 20 kroplami PBS-u, siatki są osuszane (lecz nie przesuszane) bibułą i powlekanie sokiem roślinnym. W celu "oznakowania" cząstek wirusa, siatki są przemywane w PBS jak poprzednio i po osuszeniu są powlekanie surowicą ToRSV w rozcieńczeniu od 1:50 do 1:100 w buforze fosforanowym o pH 6,5. Po przemyciu siatki wodą destylowaną są wybarwiane z użyciem pipety Pasteura 3 kroplami 1-2% octanu uranylu i badane pod TEM w powiększeniu około 40 K.



Rys.1. Schemat decyzyjny dotyczący wykrywania i identyfikacji *Tomato ringspot nepovirus* (ToRSV) w próbkach.

RT- reakcja łańcuchowa polimerazy (PCR)

RNA do badań z użyciem RT-PCR jest ekstrahowany z tkanek roślin zielnych i drzewiastych.

Stwierdzono, iż jest to bardzo czuła metoda molekularna do wykrywania wszystkich głównych grup serologicznych od A do E (Griesbach, 1995). Jednak, aby móc wykonać różnorodne etapy i uzyskać ostatecznie satysfakcjonujące zakończenie, wymaga drogiego sprzętu i dużego doświadczenia. Alternatywnie, dostępne są komercyjnie łatwe w obsłudze zestawy do ekstrakcji tj.: Qiagen i Pure script (Gentra)¹.

Ekstrakcja całkowitego kwasu nukleinowego (TNA)

Całkowity kwas nukleinowy (TNA) ekstrahuje się z próbek z użyciem metody Dellaporta zgodnie z zaleceniami Griesbach (1995) i Dellaporta *et al.* (1983). Tkanka liścia 0,5-0,75 g jest natychmiastowo zamrażana w ciekłym azocie i miążdzona w moździerzu na drobny proszek. Następnie proszek przenieść z ciekłym azotem do probówek o objętości 30 ml. Nie należy dopuścić do rozmrożenia tkanki, aż do momentu dodania buforu. Ponadto, nie należy również zamykać probówek, aż do czasu całkowitego wyparowania azotu. Dodać 15 ml buforu ekstrakcyjnego (EB) (100 mM Tris, pH 8, 50 mM EDTA o pH 8, 500 mM NaCl, 10 mM merkaptoetanolu) i 1 ml 20% SDS. Probówki energicznie wytrząsać i inkubować w temperaturze 65°C w ciągu 10 minut. Dodać 5 ml 5M octanu potasu. Probówki ponownie energicznie wytrząsać i inkubować w temperaturze 0°C przez 20 minut i wirować przy prędkości 25 000 g. Supernatant przesączyć przez filtr „Miracloth” do czystych 30 ml probówek zawierających 10 ml izopropanolu. Probówki wymieszać i inkubować w temperaturze – 20°C przez 30 min. TNA jest strącane przez 15 minut przy prędkości 20 000 g. Supernatant delikatnie wylać, osad lekko osuszyć przez odwrócenie probówek na papierowym ręczniku na 10 minut. Osad TNA ponownie rozpuścić w 0,7 ml 50 mM Tris, 10 mM EDTA pH 8. Roztwór przenieść do nowej probówki i dodać 75 µl 3 M octanu sodu i 500 µl izopropanolu. TNA dobrze wymieszać i następnie osadzić przez 30 sekund w mikrowirówce. Osad przemyć przez dodanie 80% etanolu, osuszyć i ponownie rozpuścić w 100 µl 10 mM Tris, 1 mM EDTA pH 8.

Metoda została zwalidowana w odniesieniu do kilku roślin żywicielskich, jednak biorąc pod uwagę zasięg i różnorodność żywicieli porażanych przez ToRSV, istnieją prawdopodobnie gatunki dla których metoda wg Dellaporta nie działa. Zalecana jest bardziej niezawodna metoda ekstrakcji RNA, działająca z wieloma roślinami żywicielskimi, w tym niektórymi stwarzającymi trudności np. truskawkami. Całkowity RNA jest ekstrahowany z próbek za pomocą metody z zastosowaniem CTAB, modyfikowaną wersją opisaną przez Chang *et al.* (1993). Tkanki liści (100 mg) są rozdrabniane w 1 ml buforu do rozdrabniania (2% CTAB, 100 mM Tris-HCl (pH 8,0), 20 mM EDTA, 1,4 M chlorku sodu, 1,0% siarczynu sodu, 2,0% PVP rozpuszczalnego w wodzie), przenoszone do 1,5 ml probówek typu Eppendorf i inkubowane w temperaturze 65°C przez 10-15 min. Po inkubacji probówki są odwirowywane przy prędkości 12 000 g przez 5 min. W celu sklarowania soku wykonywana jest dwukrotnie ekstrakcja z chloroformem:alkoholem izoamylovym (24:1 v/v). Następnie RNA jest strącane przez dodanie takiej samej objętości 4 M LiCl i całonocną inkubację. RNA jest strącane podczas wirowania przez 25 minut przy prędkości 12 000 g w 4°C. Uzyskany osad jest ponownie zawieszany w 200 µl buforu TE-SDS (10 mM Tris-HCl pH 8,0, 1 mM EDTA, 1% (w / v) SDS). Następnie RNA jest wytrącane przez dodanie 100 µl 5 M NaCl i 300 µl izopropanolu przed inkubacją w temperaturze - 20°C przez 30-60 minut. Po inkubacji próbka jest wirowana przez 15 min przy prędkości 12 000 g w 4°C. Otrzymany osad jest przemywany w 70% etanolu, osuszany w temperaturze pokojowej i zawieszany w 50 µl wolnej od RNA-z wodzie.

Do wykrywania ToRSV metodą PCR w materiale wieloletnim np. winoroślach, może być zastosowana metoda opisana przez Rowhani *et al.* (1993).

¹ Sugerowanymi dostawcami zestawów do ekstrakcji kwasów nukleinowych są: Qiagen, Qiagen House, Way Fleming, Crawley, West Sussex RH10 9NQ, UK; Pure script (Gentra) Gentra Systems Inc 13355, 10th Avenue SW, Suite 120, Minneapolis, MN 55441, USA.

Synteza cDNA

Próbki są poddane odwrotnej transkrypcji niezależnie od reakcji PCR (Griesbach, 1995) przez dodanie 2 µl TNA próbki do mieszaniny reakcyjnej RT (100 U M-MLV odwrotnej transkryptazy na próbkę, dNTPs oraz bufor zgodnie z instrukcją producenta (Promega Corp, Madison, USA) zawierającej 10 µg ml startera D1 (TCC GTC CAA TCA CGC GAA TA). Należy dodać warstwę 10 µl oleju mineralnego do całkowitej 20 µl objętości reakcyjnej i krótko zwirować przy 4000 obr/min. Przygotowaną mieszaninę umieszcza się w termocyklerze w 37-40°C przez 50 minut, a następnie w 95°C przez 5 minut.

Amplifikacja PCR

Do PCR jest używane 1-2 µl produktu RT lub kontroli ("zainfekowanego RNA", "niezainfekowanego RNA" i wody) wraz z 1µM każdego ze starterów U1 (GAC GAA GTT ATC AAT GGC AGC) i D1 (patrz wyżej) (Rott *i wsp.*, 1991) i 1,5 mM MgCl₂. Całkowita objętość reakcji 75 µl powinna zawierać dNTPs, bufor i detergent zgodnie ze wskazówkami producenta (Promega Corporation, Madison, US).

Próbki są podgrzewane do 77-80 °C przez 3-4 minuty, po czym dodawana jest 1 U Taq polimerazy na reakcję. Gdy mieszanina reakcyjna jest przygotowana, aby zdenaturować matrycę podnosi się temperaturę do 94 °C przez 4 minuty. PCR jest przeprowadzany z użyciem następującego programu: (denaturacja) 94°C przez 1 minutę, następnie 55°C przez 2 minuty (annealing), 72°C przez 2 minuty (elongacja) przez 35-40 cykli, następnie wydłużanie przez 5-10 minut w 72 °C (Griesbach, 1995).

Elektroforeza w żelu

Po reakcji RT-PCR, produkty są analizowane dzięki elektroforezie w żelu (Griesbach, 1995). 15 µl każdej próbki jest mieszane z 10 x Ficoll-EDTA-Tris buforem obciążającym i наносzone na 2,0% żel agarozowy „MetaPhore” w 0,5 × buforze Tris-boran-EDTA (TBE). Elektroforeza prowadzona jest pod napięciem 40 mA 1-1,75 h w schłodzonym buforze. Po rozdziale, żel jest barwiony w buforze obciążającym lub w 0,5 ng ml⁻¹ roztworze bromku etydyliny przez 20-30 minut i dwukrotnie wypłukiwany przed wizualizacją w świetle UV. Pozytywne próbki dają prążek 449 par zasad (bp). Zdjęcie żelu (film lub cyfrowe) powinno być utrwalone i dołączone do raportu końcowego.

ELISA

ELISA przy zastosowaniu odpowiednich buforów do ekstrakcji może być stosowana do wykrywania i identyfikacji ToRSV w roślinach żywicielskich zielnych i drzew owocowych.

Istotny może być czas badania próbki i powinien być on rozważony przed pobieraniem prób.

Doświadczenie wykazało, że dla *Pelargonium* testy najlepiej wykonywać od listopada do kwietnia lub gdy temperatury są nieco niższe. Dla roślin drzewiastych wczesna wiosna to czas, w którym można wiarygodnie przebadать kwiaty lub młode liście. Dla roślin zielnych jest również możliwość wykrycia ToRSV w ekstrakcie z korzenia.

Zestawy ELISA zawierające wszystkie niezbędne składniki są szeroko dostępne komercyjnie². Jeśli używane są takie zestawy, należy dokładnie przestrzegać instrukcji producenta. Alternatywnie można zastosować przedstawione poniżej procedury. DAS-ELISA (Clark & Adams, 1977) jest

² Sugerowani dostawcy surowic i zestawów ELISA: Advanced Diagnostics International, LLC. 700 Research, Center Blvd, Fayetteville, AR 72701, USA – <http://www.adillc.com> (ELISA kit); ATCC, Materiały informacyjne, LGC Queens Road, Teddington TW11 0LY, UK - <http://www.lgc.co.uk/atcc.asp> (surowice); BIOREBA, Chr. Merian-Ring 7, CH-4153 Reinach BL 1, Szwajcaria – e-mail: admin@bioreba.ch (ELISA); DSMZ, Kolekcja Wirusów Roślinnych, c / o Biologische Bundesanstalt für Land-und Forstwirtschaft, Messeweg 11/12, D-38104 Braunschweig, Niemcy - e-mail: S.Winter@bba.de lub 100705.337@compuserve.com (surowice i ELISA); Plant Research International PO Box 16, NL- 6700 AA Wageningen, Holandia - www.plant.wageningen-ur.nl (ELISA kit); Sanofi Pasteur, Sanofi Pasteur, 3, boulevard Raymond Poincaré - 92430 Marnes-La-Coquette, Francja - Fax: 01 47 41 91 33 (ELISA).

preferowaną metodą dla wykrywania i identyfikacji ToRSV, jednak gdy mogą wystąpić odchylenia od normy szczepu wirusa, sugerowane jest zastosowanie pośredniego testu ELISA (TAS) (OEPP/EPPO, 1991).

DAS-ELISA

Płytki mikrotitracyjne ELISA powlekane są przez napełnienie studzienek 100 µl specyficzną dla ToRSV gammaglobuliny (IgG), używanej w ilości 1-2 µg ml⁻¹ w 0,05M buforze węglanu sodu, pH 9,6.

Płytki są inkubowane od 2-4 godzin w temperaturze 33°C, a następnie przemywane trzykrotnie w buforze soli fosforanowej z Tween (PBS-T). Próbkami mogą być: liść lub łyko, wewnętrzna kora i/lub tkanki pąków zrazów i podkładek wszystkich roślin żywicielskich. W ostatnim przypadku, do usuwania kory ze zrazów i podkładek stosowane są noże lub świdry korkowe, łyko i tkanki łyka są zeskrobywane, aż do odsłonięcia drewna. Próbki tkanek lub usunięte pąki homogenizowane są w buforze do próbek (w stosunku, np. 1: 10) w torebkach plastikowych lub za pomocą tłoczka i moździerza. Jeśli stosowane są te ostatnie, moździerz należy dokładnie myć pomiędzy próbkami. Bufory do próbek mogą się w zależności od badanego materiału różnić i zwykle najlepiej jest postępować zgodnie z zaleceniami załączonymi do zestawu odczynników.

Zalecane bufory do próbek są określone w Załączniku I. Próbki są nanoszone na płytkę ELISA, po 100 µl do każdej z dwóch studzienek na jedną próbkę i inkubowane w temperaturze 4°C przez noc. Do testu ELISA powinny być dodane pozytywna kontrola ToRSV i sprawdzone kontrole negatywne, najlepiej z materiału, który jest podobny do badanego. Jeżeli kontrole takie nie są dostępne mogą zostać użyte zielne rośliny testowe zakażone ToRSV. Po czterokrotnym przemyciu, tak jak to już wcześniej opisano, każda studzienka jest wypełniana 100 µl znakowanej alkalicznej fosfatazy anti-ToRSV IgG rozcieńczonej (np. 1: 200) w PBS-Tween-PVP, do której mogą być dodawane 0,2% (w/v) albumina jaja kurzego lub 0,5% odtłuszczone mleko w proszku, jeśli jest to wymagane. Płytkę ELISA jest inkubowana przez 3-4 godziny w temperaturze 33 ° C. Po trzykrotnym płukaniu, studzienki płytki ELISA są wypełniane

100 µl świeżo przygotowanego roztworu substratu zawierającego 1 mg ml⁻¹ p-nitrofenylofosforanu w buforze dietanoloaminy o pH 9,8. Po okresie inkubacji około 1 godziny w temperaturze pokojowej, płytki ELISA są odczytywane przy 405 nm.

TAS-(pośrednia) ELISA

Płytki mikrotitracyjne ELISA powlekane są przez napełnienie studzienek 100 µl specyficzną dla ToRSV gammaglobuliny (IgG), używanej w ilości 1-2 µg ml⁻¹ w 0,05M buforze węglanu sodu, pH 9,6.

Płytki są inkubowane od 2-4 godzin w temperaturze 33°C, a następnie przemywane trzykrotnie w buforze soli fosforanowej z Tween (PBS-T). Próbki są nanoszone na płytkę ELISA, po 100 µl do każdej z dwóch studzienek na jedną próbkę i inkubowane w temperaturze 4°C przez noc. Studzienki są wypełniane mysim anti-ToRSV IgG (lub monoklonalnym przeciwciałem (Mab)) odpowiednio rozcieńczonym w PBS. Następnie płytki są inkubowane przez 2-4 godzin w temperaturze 33 ° C. Studzienki są wypełniane dostępnym w handlu króliczym antymysim IgG sprzężonym z fosfatazą alkaliczną w rozcieńczeniu, opisanym wcześniej. Płytki są inkubowane od 2-4 godzin w temperaturze 33°C. Do testu ELISA powinny być dodane pozytywna kontrola ToRSV i sprawdzone kontrole negatywne, najlepiej z materiału, który jest podobny do badanego. Jeżeli kontrole takie nie są dostępne mogą zostać użyte zielne rośliny testowe zakażone ToRSV.

Najlepsza identyfikacja ToRSV jest wówczas, gdy uzyskano dwa z poniższych wyników (dobrze jest, gdy tylko jeden wynik był serologiczny)³:

³ W przypadku badań w których próbki mogą być liczne, badania takie mogą być niewykonalne, powinno zastosować

- reakcje na roślinach testowych wskazujące na obecność nepowirusa
 - DAS/TAS-ELISA (A405 nm) wartość próbki przekraczająca wartość progową w taki sposób, iż po okresie inkubacji substratu przez 1-2 godziny w temperaturze pokojowej, jest co najmniej dwukrotną średnią z wartości kontroli zdrowej(-ych) roślin lub średnią z wartości kontroli negatywnych dodając 2 lub 3 odchylenia standardowe. W takich warunkach pozytywne i negatywne kontrole powinny dawać przy A405 nm wartości $<0,07> 0,3$ „blankowane” względem buforu. Wątpliwe i bardzo słabe reakcje powinny być zweryfikowane przez odrębne testy (np. IEM lub mechaniczną inokulację) lub zweryfikowane przez DAS / TAS-ELISA lub DAS / TAS-ELISA z zastosowaniem ekstraktów liści z objawami zielnych roślin testowych zainokulowanych wątpliwymi próbkami.
 - w IEM jednoznacznie są wizualizowane izometryczne wiriony mierzące 25-28 nm średnicy, gęsto „ozdobione” przeciwciałami. Morfologia cząstek i intensywność „wyznakowania” nie powinny różnić się od tych uzyskanych z izolatu referencyjnego ToRSV. Gdy zastosowano typowe serum (preimmune), wiriony ToRSV powinny pojawić się bez „dekoracji”.
 - w RT-PCR otrzymano produkt o wielkości 449 par zasad (bp). Reakcja kontroli pozytywnej powinna dawać produkt o takiej samej wielkości, natomiast negatywne kontrole nie powinny dawać produktów amplifikacji tej wielkości.
- Ponieważ ToRSV nie ma serologicznego powiązania z innym *Nepovirus* spp. (Stace-Smith, 1996), test ELISA i reakcje IEM zwykle jasno określają obecność wirusa, bądź jego brak, szczególnie w połączeniu z inokulacją roślin testowych w celu zwiększenia miana. Jednakże, stosując tylko techniki serologiczne, niektóre szczepy mogą zostać pominięte. Aby tego uniknąć, zaleca się używanie testów molekularnych.

Materiały referencyjne

Izolaty referencyjne (surowicę) ToRSV można uzyskać od: Deutsche Sammlung von Mikroorganismen und Zellkulturen GmbH (DSMZ), Messeweg 11-12, 38104 Braunschweig, Niemcy.

Sprawozdawczość i dokumentacja

Wytyczne dotyczące sprawozdawczości i dokumentacji podano w Standardzie EPPO PM7 / - (w przygotowaniu).

Informacje dodatkowe

Dalsze informacje na temat tego organizmu można otrzymać: CSL Diagnostics, Central Science Laboratory, Sand Hutton, York YO41 1LZ (UK) (IEM, DAS / TAS-ELISA i RTPCR)
 Federal Biological Research Centre for Agriculture and Forestry, Messeweg 11-12, 38104 Braunschweig (Germany) (IEM and DAS/TAS-ELISA)
 Naktuinbouw, PO Box 135, 2370 AC Roelofarendsveen, Netherlands; Plant Protection Service, PO Box 9102, 6700 HC Wageningen (Netherlands) (DAS-ELISA, rośliny wskaźnikowe).

Podziękowania

Protokół ten został pierwotnie opracowany przez DM Wright, Central Science Laboratory, York (GB).

się najbardziej wiarygodne testy w zależności od doświadczenia badającego laboratorium.

Materiały źródłowe⁴

- Chang SJ, Puryear J & Cairney J (1993) A simple and efficient method for isolating RNA from pine trees. *Plant Molecular Biology Reporter* **11**, 113–116.
- Clark MF & Adams AN (1977) Characteristics of the microplate method of enzyme-linked immunosorbent assay for the detection of plant viruses. *Journal of General Virology* **34**, 475–483.
- Dellaporta SL, Wood J & Hichs JB (1983) A Plant DNA Miniprep: Version 11. *Plant Molecular Biology Reporter* **1**, 9–21.
- EPPO/CABI (1997) *Tomato ringspot nepovirus*. In: *Quarantine Pests for Europe*, 2nd edn, pp. 1373–1378. CAB International, Wallingford (GB).
- Griesbach JA (1995) Detection of tomato ringspot virus by polymerase chain reaction. *Plant Disease* **79**, 1054–1056.
- Milne RG (1984) Electron microscopy for the identification of plant viruses in *in-vitro* preparations. *Methods in Virology* **7**, 87–120.
- Milne RG & Lesemann D-E (1984) Immunosorbent electron microscopy in plant virus studies. *Methods in Virology* **8**, 85–101.
- OEPP/EPPO (1990) EPPO Standards PM 3/28, *Tomato ringspot nepovirus* in pelargonium – inspection and test methods. *Bulletin OEPP/EPPO Bulletin* **20**, 273–276.
- OEPP/EPPO (1991) EPPO Standards PM 3/32, *Tomato ringspot nepovirus* in fruit tree and grapevine – inspection and test methods. *Bulletin OEPP/EPPO Bulletin* **21**, 245–250.
- OEPP/EPPO (2001) EPPO Standard PM 7/2 Diagnostic protocol for *Tobacco ringspot nepovirus*. *Bulletin OEPP/EPPO Bulletin* **31**, 45–52.
- Rott ME, Tremaine JH & Rochon DM (1991) Comparison of the 5'- and 3' termini of tomato ringspot virus RNA 1 and RNA 2: evidence for RNA recombination. *Virology* **185**, 468–472.
- Rowhani A, Chay C, Golino DA & Falk BW (1993) Development of a polymerase chain reaction technique for the detection of grapevine fanleaf virus in grapevine tissue. *Phytopathology* **83**, 749–753.
- Stace-Smith R (1984) *Tomato ringspot virus*. *CMI/AAB Descriptions of Plant Viruses* No. 290 (No. 18 revised). AAB, Wellesbourne (GB).
- Stace-Smith R (1996) *Tomato ringspot nepovirus*. In: *Viruses of Plants* (Eds Brunt AA, Crabtree K, Dallwitz MJ, Gibbs AJ, Watson L & Zurcher EJ), pp. 1309–1312. CAB International, Wallingford (GB).
- Taylor CE & Brown DJ (1997) *Nematode Vectors of Plant Viruses*. CAB International, Wallingford (GB).

Załącznik I

Zalecane bufony do próbek dla testu ELISA

Uniwersalny: rozpuścić w 1000 ml 1 x PBS-T, 1,3 g siarczynu sodu (bezwodnego), 20,0 g poliwinylpirolidonu (PVP) 24 000 MW- 40 000, 0,2 g azydku sodu (opcjonalnie *), 2,0 g albuminy jaja kurzego w proszku, Grade II. Ustalić pH do 7,4 i przechowywać w temperaturze 4°C.

Borówka amerykańska: rozpuścić w uniwersalnym buforze ekstrakcyjnym w 1000 ml, 10,4 g Na₂HPO₄ (bezwodny), 0,9 g KH₂PO₄ (bezwodny). Przechowywać w temperaturze 4°C.

Winorośl: rozpuścić w 900 ml wody destylowanej, 60,5 g tris (hydroksymetylo) aminometanu (Tris), 8,0 g chlorku sodu, 20,0 g poliwinylpirolidonu (PVP), MW 24000-40 000, 10,0 g glikolu polietylenowego, 0,2 g azydku sodu (opcjonalnie *), 0,5 g Tween-20. Za pomocą

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

kwasy solne doprowadzić pH do wartości 8,2. Uzupełnić do objętości 1000ml wodą destylowaną. Przechowywać w temperaturze 4°C.

Pelargonie: rozpuścić w wodzie destylowanej do objętości 1000 ml 12,1 g Tris (hydroksymetylo) aminometanu (Tris), 20 g poliwinylpiperolidonu (PVP), MW 24 000-40 000, 5 ml Tween 20, 1g żelatyny. Doprowadzić pH do 8,6.

Tłumaczenie z jęz. angielskiego:	Sprawdził:	Zatwierdził:
Ewa Hennig (GIORiN CL)	Justyna Pięcińska (GIORiN CL)	Janina Butrymowicz (GIORiN CL)
22.10.2012	20.12.2012	