

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

## **Normes OEPP** **Standardy EPPO**

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

PM 7/50(1)



Europejska i Śródziemnomorska Organizacja Ochrony Roślin  
1, rue Le Nôtre, 75016 Paris, France

## **Zatwierdzenie**

Standardy EPPO 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 są przeznaczone do stosowania przez Krajowe Organizacje Ochrony Roślin (NPPO), jako ciała odpowiedzialne za stosowanie środków fitosanitarnych. Standardy diagnostyczne dla agrofagów podlegających przepisom skupiają się na diagnostyce poszczególnych agrofagów i opisują różne metody, które mogą zostać użyte w celu wykrycia i identyfikacji agrofagów o znaczeniu fitosanitarnym dla regionu EPPO. Ogólnie rzecz biorąc, protokoły diagnostyczne są przygotowywane w oparciu o: (1) cel protokołu diagnostycznego (który może się różnić w zależności od okoliczności użycia) oraz (2) sprawozdawczość i dokumentację diagnozy.

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 (wirygodność, 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 oznacza 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 edn. CAB International, Wallingford (GB).]
- UE (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 (1999) 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 (Francja). [OEPP/EPPO (1999) 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 (France).]

### **Definicje**

---

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

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 EPPO dotyczące diagnostyki dostarczają wszystkich niezbędnych informacji dotyczących określonego agrofaga w celu jego wykrycia i prawidłowej identyfikacji dokonanej przez eksperta (np. specjalistę z dziedziny 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 czterdzieści jeden 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*. *Bulletin OEPP/EPPO Bulletin* **31**, 41–44
- PM 7/2 (1) *Tobacco ringspot nepovirus*. *Bulletin OEPP/EPPO Bulletin* **31**, 45–51
- PM 7/3 (1) *Thrips palmi*. *Bulletin OEPP/EPPO Bulletin* **31**, 53–60
- PM 7/4 (1) *Bursaphelenchus xylophilus*. *Bulletin OEPP/EPPO Bulletin* **31**, 61–69
- PM 7/5 (1) *Nacobbus aberrans*. *Bulletin OEPP/EPPO Bulletin* **31**, 71–77
- PM 7/6 (1) *Chrysanthemum stunt pospiviroid*. *Bulletin OEPP/EPPO Bulletin* **32**, 245–253
- PM 7/7 (1) *Aleurocanthus spiniferus*. *Bulletin OEPP/EPPO Bulletin* **32**, 255–259
- PM 7/8 (1) *Aleurocanthus woglumi*. *Bulletin OEPP/EPPO Bulletin* **32**, 261–265
- PM 7/9 (1) *Cacoecimorpha pronubana*. *Bulletin OEPP/EPPO Bulletin* **32**, 267–275
- PM 7/10 (1) *Cacyreus marshalli*. *Bulletin OEPP/EPPO Bulletin* **32**, 277–279
- PM 7/11 (1) *Frankliniella occidentalis*. *Bulletin OEPP/EPPO Bulletin* **32**, 281–292
- PM 7/12 (1) *Parasaissetia nigra*. *Bulletin OEPP/EPPO Bulletin* **32**, 293–298
- PM 7/13 (1) *Trogoderma granarium*. *Bulletin OEPP/EPPO Bulletin* **32**, 299–310
- PM 7/14 (1) *Ceratocystis fimbriata* f. sp. *platani*. *Bulletin OEPP/EPPO Bulletin* **33**, 249–256
- PM 7/15 (1) *Ciborinia camelliae*. *Bulletin OEPP/EPPO Bulletin* **33**, 257–264
- PM 7/16 (1) *Fusarium oxysporum* f. sp. *albedinis*. *Bulletin OEPP/EPPO Bulletin* **33**, 265–270
- PM 7/17 (1) *Guignardia citricarpa*. *Bulletin OEPP/EPPO Bulletin* **33**, 271–280
- PM 7/18 (1) *Monilinia fructicola*. *Bulletin OEPP/EPPO Bulletin* **33**, 281–288
- PM 7/19 (1) *Helicoverpa armigera*. *Bulletin OEPP/EPPO Bulletin* **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 w wyniku 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.

## **Diagnostyka<sup>2</sup>** **Diagnostic**

### ***Tomato yellow leaf curl* i *Tomato mottle begomoviruses***

#### **Zakres**

Standard opisuje protokół diagnostyczny dla *Tomato yellow leaf curl begomovirus* (TYLCV) oraz *Tomato mottle begomovirus* (ToMoV).

#### **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 2004.

#### **Wprowadzenie**

Kraje Unii Europejskiej regulują ilość wirusów przenoszonych przez mączlika *Bemisia tabaci*, porażających pomidory i inne rośliny z rodziny psiankowatych. W większości należą one do rodzaju *Begomovirus*. Szczególna uwaga skupia się na dwóch grupach wirusów: (1) *Tomato yellow leaf curl begomovirus* (TYLCV), obecnych w niektórych krajach europejskich, wraz z różnymi blisko spokrewnionymi wirusami, które początkowo były uważane za szczepy, ale obecnie identyfikowane są do gatunków i mogą, ale nie muszą występować w krajach europejskich, (2) nieeuropejskie wirusy przenoszone przez *B. tabaci* (Brown & Bird, 1992), spośród których w przepisach UE wymieniony jest przykład *Tomato mottle begomovirus* (w tekstach o tematyce fitosanitarnej zdarza się jeszcze nazwa 'Florida tomato virus'); w ostatnich latach opisano cały szereg innych, pozaeuropejskich wirusów porażających *Solanaceae* (Fauquet & Stanley, 2003; Fauquet i wsp., 2003). Standard ten skupia się na dwóch wspomnianych przykładach.

#### ***Tomato yellow leaf curl virus***

*Tomato yellow leaf curl virus* (TYLCV) po raz pierwszy został odnotowany w uprawach pomidora w Izraelu, jako wirus przenoszony przez mączlika (Cohen & Harpaz, 1964) i jak się później okazało należy do rodziny *Geminiviridae*, rodzaju *Begomovirus*. Wraz

---

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

z pokrewnymi gatunkami, które zostały niedawno wyróżnione, tworzy najbardziej niszczycielski kompleks chorób wirusowych pomidorów w tropikalnych i umiarkowanie ciepłych regionach świata, gdzie powoduje do 100% strat (Moriones, 2000). Obecność przedstawicieli kompleksu TYLCV odnotowano w uprawach pomidorów w Hiszpanii, Włoszech, Portugalii i Francji. Występują one w większości wschodnich krajów śródziemnomorskich (Idriss i wsp., 1997) oraz w części Afryki Subsaharyjskiej, Azji, Australii, na Karaibach i w USA (Floryda). W regionie EPPO obecne są dwa gatunki (Moriones i wsp., 2000) zgodnie z ostatnią nomenklaturą (Fauqueti wsp., 2000): *Tomato yellow leaf curl begomovirus* (TYLCV) (pierwszy opisany gatunek, początkowo znany jako szczep Izrael (TYLCV-IL)), oraz *Tomato yellow leaf curl Sardinia begomovirus* (TYLCSV), początkowo znany jako szczep Sardynia (TYLCV-S). W standardzie tym, obydwie najczęściej traktowane są łącznie, za wyjątkiem określonych punktów, kiedy niezbędne jest odniesienie się do każdego z nich osobno. Główny wektor, mączlik *Bemisia tabaci* przenosi wirusy TYLCV w trwały, krążeniowy sposób (Cohen i wsp., 1966). Nie ma doniesień o przenoszeniu wirusa przez nasiona pomidora, a przenoszenie mechaniczne nie zdarza się w naturze (Moriones i wsp., 2000). Obecnie na terenie Europy występują cztery biotypy *B. tabaci*, z których biotypy B i Q skutecznie przenoszą TYLCV oraz TYLCSV. Globalna ekspansja biotypu B *B. tabaci*, określanego również jako mączlik ostroskrzydły, proponowanego jako osobny gatunek, *B. argentifolii* przez Bellows i wsp. (1994), związana jest z pojawieniem się TYLCV w Europie oraz na półkuli zachodniej (Polston & Anderson, 1997). Biotyp B *B. tabaci* jest bardzo płodny i ma dużą zdolność adaptacji do nowych upraw żywicielskich w przeciwieństwie do stabilnych, regionalnych populacji *B. tabaci*. W Hiszpanii, TYLCV był czynnikiem sprawczym nowej choroby fasoli (Navas-Castillo i wsp., 1999; Sánchez-Campos i wsp., 1999), pojawia się również w papryce (Reina i wsp., 1999). Izolaty TYLCV posiadają genom jedoczęściowy i składają się z podwójnych, quasi-izometrycznych cząsteczek, 20 nm średnicy i 30 nm długości (Brunt i wsp., 1990).

### ***Tomato mottle begomovirus***

Przenieszonego przez mączlika geminiwirusa *Tomato mottle begomovirus* (ToMoV) po raz pierwszy zaobserwowano w 1989, fakt ten zarejestrowany został przez Simone i wsp. (1990) oraz Abouzid & Hiebert (1991), na uprawach pomidora na Florydzie (USA). Poważny pojaw związany z obecnością dużych ognisk *Bemisia tabaci* biotyp B, nastąpił w latach 1990/1991. Od tego czasu obecność wirusa zaobserwowano również na uprawach pomidora w Płd. Karolinie, Tennessee oraz w Wirginii, a także na chwastach *Solanum viarum*. ToMoV przenoszony jest mechanicznie. Objawy na pomidorach są łagodne w porównaniu z TYLCV lub *Tomato golden mosaic begomovirus* (TGMV) (Abouzid i wsp., 1992). Eksperymentalne rośliny żywicielskie obejmują członków trzech rodzajów z rodziny psiankowatych (*Lycopersicon*, *Nicotiana* i *Physalis*) oraz *Phaseolus vulgaris*. Genom ToMoV został zsekwenconowany (Abouzid i wsp., 1992) i jest dwudzielny.

### **Metody wykrywania i diagnozowania**

W przypadku przenoszonych przez mączlika *Geminiviridae*, metody serologiczne odniosły ograniczony sukces (Harrison i wsp., 1991; Muniyappa i wsp., 1991), jako że surowice okazały się być trudne do wytwarzania. Wytworzono stosunkowo niespecyficzne przeciwciała monoklonalne, które wykrywają TYLCV oraz ToMoV, ale reagują krzyżowo z szeregiem innych *Geminiviridae* przenoszonych przez *B. tabaci*. W regionie EPPO, obecnie

występują jedynie TYLCV i TYLCSV, zatem w przypadku próbek polowych przedstawionych do diagnozy najbardziej prawdopodobnym jest porażenie przez te właśnie gatunki. Badania serologiczne prowadzone na materiale spoza regionu EPPO mogą również doprowadzić do wykrycia, jednak nie rozróżnimy tym sposobem innych gatunków z kompleksu TYLC i różnych innych *Begomovirus* spp., z ToMoV łącznie. W takim przypadku w celu dokonania diagnozy potrzebne jest zastosowanie metod molekularnych.

### Tożsamość

**Nazwa:** *Tomato yellow leaf curl begomovirus*

**Synonimy:** *Tomato yellow leaf curl bigeminivirus*, *Tomato yellow leaf curl geminivirus*

**Akronim:** TYLCV

**Stanowisko taksonomiczne:** Wirusy: *Geminiviridae*: *Begomovirus*

**Komputerowy kod EPPO:** TYLCV0

**Kategoria fitosanitarna:** EPPO-lista A2, nr 182; UE Załącznik I I/A2

**Nazwa:** *Tomato mottle begomovirus*

**Synonimy:** Tomato mottle virus, Florida tomato virus

**Akronim:** ToMoV

**Stanowisko taksonomiczne:** Wirusy: *Geminiviridae*: *Begomovirus*

**Komputerowy kod EPPO:** TOMOV0

**Kategoria fitosanitarna:** EPPO- lista A1, nr 225; UE Załączniki: wymieniony pod nazwą Florida tomato virus wśród nieeuropejskich wirusów przenoszonych przez *Bemisia tabacci* w Załączniku I/A1

### Wykrywanie

### Objawy

Na pomidorach objawy powodowane przez wirusy TYLC różnią się w zależności od stadium rozwojowego rośliny na wczesnym etapie infekcji, od warunków środowiskowych oraz odmiany pomidora; obejmują one poważne zahamowanie wzrostu, znaczne zmniejszenie wielkości liści, ich osadzenie ku górze, chlorozy brzegów liści, pojawienie się plamek, opadanie kwiatów i znaczącą redukcję plonu; CSL (Morris, 2000). W przypadku fasoli, objawy TYLC obejmują zgrubienia liści, marszczenie liści, zwijanie liści ku górze, nienaturalną proliferację pędów bocznych, deformacje strąków oraz redukcję ich ilości. U papryki objawy TYLC obejmują międzyżyłkowe oraz brzeżne chlorozy liści, zwijanie brzegów liści ku górze (lub bezobjawowo). U *Lisianthus*, objawy TYLC obejmują zniekształcenia wierzchołków wzrostu, kielichowate liście, obrzęk użyłkowania na spodniej powierzchni liści, znaczną redukcję jakości kwitnienia oraz karłowacenie. Objawy ToMoV na pomidorze obejmują chlorotyczną pstrość, zniekształcenie i zwijanie liści oraz karłowacenie.

### Pobieranie próbek

Właściwy dobór próbki jest krytyczny dla serologicznej detekcji wirusów TYLC oraz ToMoV testem TAS-ELISA. Wirus jest zdecydowanie bardziej wykrywalny w świeżo



rozwiniętych, młodych liściach, obecnych w najwyższych regionach rośliny, aniżeli w starszych jej częściach. Jak opisano w Załączniku 1, w celu przygotowania próbki do wykonania testu TAS-ELISA należy przygotować materiał pochodzący z młodszych liści rośliny. Detekcja wirusów TYLC oraz ToMoV przy użyciu badania PCR osiągalna jest z materiału pochodzącego ze świeżych liści lub liofilizowanego. Materiał roślinny winien pochodzić ze świeżo rozwiniętych, młodych liści występujących w wierzchołkowym regionie rośliny, przy czym podczas ich pobierania należy zachować ostrożność by uniknąć kontaminacji (zmieniając jednorazowe rękawiczki pomiędzy próbkami lub, co jest bardziej zalecane, wykrawając kawałki liści bezpośrednio do probówki Eppendorfa używając wieczka jako narzędzia tnącego). Zalecane metody izolacji DNA opisane są w Załączniku 2.

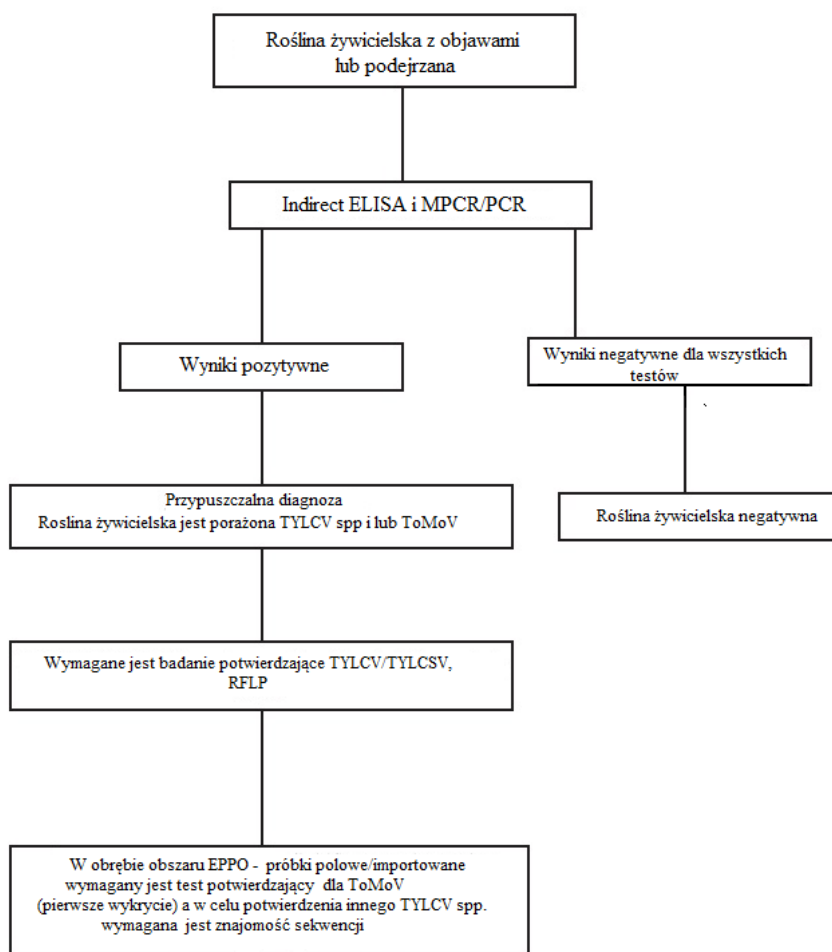
### **Identyfikacja**

Procedura identyfikacji TYLCV i ToMoV podsumowana jest w diagramie blokowym na Ryc. 1.

### **Badania przesiewowe**

#### *TAS-ELISA*

W przypadkach gdy podejrzewa się porażenie wirusami TYLC lub ToMoV, by ułatwić postawienie wstępnej diagnozy można wykonać test TAS-ELISA (Załącznik 1). Ponieważ używając obecnie dostępnych na rynku surowic może dojść do przeoczenia porażenia na wczesnym stadium infekcji próbki, lub możemy mieć do czynienia z reakcjami krzyżowymi z innymi ssDNA wirusami, końcowej diagnozy nie można oprzeć jedynie na wyniku testu ELISA. Surowica oferowana przez firmę Adgen (<http://www.adgen.co.uk/>) jest skuteczna jako ogólne badanie przesiewowe, ale przy jej użyciu nie da się rozróżnić wirusów TYLC i ToMoV. Surowica oferowana przez DSMZ (DSMZ AS- 0421/DSMZ AS-0546/2/DSMZ 0546/4 – <http://www.dsmz.de/plvirus>), do wykrywania TYLCV umożliwia detekcję i rozróżnienie wirusów TYLCV i TYLCSV (obecne w Europie), ale nie jest skuteczna przy analizie złożonych gatunkowo infekcji. W badaniach testem ELISA należy stosować kontrole pozytywne z roślin, o których z pewnością wiadomo że są zainfekowane wirusem, oraz materiał pochodzący ze zdrowych liści gatunku żywicielskiego jako kontrola negatywna. W badaniu należy zastosować również kontrolę składającą się z samego buforu.



Ryc. 1 Diagram blokowy identyfikacji TYLCV i ToMoV.

### PCR

Do badania PCR, DNA izolowane jest z próbek materiału roślinnego zainfekowanego wirusami TYLC lub innym *Begomovirus* spp. zgodnie z procedurami opisanymi w Załączniku 2. PCR ukierunkowany na wykrycie TYLCV/TYLCSV przeprowadza się zgodnie z tym, co opisał Accotto i wsp. (2000) (Załącznik 3). Badanie to potwierdza diagnozę TYLCV/TYLCSV, ale jednocześnie jest użytecznym wskaźnikiem ewentualnej obecności innego wirusa ssDNA. Jeżeli w przypadku materiału symptomatycznego, uzyskany wynik jest negatywny, a materiał ten w badaniu przesiewowym dał wynik pozytywny, lub jeśli przy użyciu cięcia enzymami restrykcyjnymi uzyskano nietypowy wzór trawienia, dowód na obecność innego wirusa ssDNA takiego jak ToMoV można osiągnąć wykonując PCR zgodnie z procedurą Denga i wsp. (1994) (Załącznik 3), rozszerzoną na ToMoV przez Morrisa. Różne inne metody poddawane były badaniom, ale nie są one zawarte w tym standardzie. Alternatywną metodą przesiewową dla TYLCV/TYLCSV jest hybrydyzacja dot-blot, ale metoda ta jest ograniczona przez fakt, że za jej pomocą nie da się wiarygodnie rozróżnić składowych kompleksu TYLC. Przyczyną tego faktu jest pewna krzyżowa reaktywność sondy, a także może mieć wpływ koncentracja wirusa w próbce. Sondy dla wszystkich wirusów TYLC nie zostały do tej pory udokumentowane (Accotto i

wsp., 2000). Z tego powodu metoda ta mogłaby być stosowana jako ogólny test przesiewowy w kierunku TYLCV/TYLCSV w obrębie regionu EPPO, ale tak jak omówiono dla testu ELISA, musiałaby być ona wsparta jedną z metod PCR opisanych w tym protokole, by uniknąć fałszywie negatywnych lub fałszywie pozytywnych wyników. Zdegenerowane startery - Polston i wsp. (1995) - mogą być użyte do detekcji ToMoV, po której następuje RFLP. Alternatywą umożliwiającą detekcję ToMoV (Murphy i wsp., 2000) jest hybrydyzacja metodą Southern (ang. *Southern blotting*), jednak ma ona pewne ograniczenia, ponieważ potwierdzenie ToMoV w Europie osiągnięte jakkolwiek z powyższych metod w chwili obecnej wymaga również analizy sekwencji nukleotydowej. Ekstrakcja PCR, nastawienie PCR i analiza post-PCR powinny być prowadzone w oddzielnych przestrzeniach laboratoryjnych w celu uniknięcia kontaminacji. Powinno stosować się końcówki zaopatrzone w filtr oraz rękawiczki. Do badania należy załączyć kontrolę pozytywną oraz więcej niż jedną kontrolę negatywną pochodzącą z tego samego gatunku jak roślina testowa. Kontrola mieszaniny reakcyjnej (bez matrycy w reakcji) blank także jest wymagana.

### **Potwierdzenie**

Potwierdzenie porażenia TYLCV lub TYLCSV osiąga się używając RFLP (Accotto i wsp., 2000) co opisano w Załączniku 3 lub dzięki zastosowaniu metody PCR do szybkiego rozróżnienia TYLCV i TYLCSV opisanej przez Martínez-Culebras i wsp. (2001). PCR, jak opisano w Załączniku 3 (Deng i wsp., 1994), zalecany jest do identyfikacji ToMoV, oraz wszystkich wirusów TYLC, jednak wyniki jego winny być potwierdzone przez sekwencjonowanie. W obrębie regionu EPPO, potwierdzenie pozytywnego wyniku testu PCR skierowanego na wykrycie ToMoV w chwili obecnej wymaga analizy sekwencji (przy użyciu standardowej metodologii) by potwierdzić pierwsze wykrycie. Analiza sekwencji nie jest jednak zalecana jako metoda w przypadku rutynowych badań diagnostycznych, ponieważ jest ona czasochłonna i droga. Jest to jednak jedyna metoda w przypadku kiedy nie są dostępne gatunkowo specyficzne narzędzia (startery, surowice) umożliwiające molekularną lub serologiczną identyfikację. Wyniki badań przesiewowych TAS-ELISA oraz PCR, mających na celu wstępną identyfikację wymagają potwierdzenia. Jeśli wyniki RFLP uzyskane przy użyciu metody Accotto i wsp. (2000) wskazują na TYLCV lub TYLCSV, próbkę można potwierdzić jako pozytywną. Jeśli natomiast wyniki osiągnięte przy użyciu metody PCR Accotto i wsp. (2000) są negatywne, lub jeśli RFLP wykonywany zgodnie z tą metodą daje wzór trawienia, który nie wskazuje na TYLCSV lub TYLCV, utrzymanie negatywnego wyniku lub diagnoza innego wirusa ssDNA, takiego jak ToMoV winna być osiągnięta przy zastosowaniu PCR według procedury Denga i wsp. (1994), a następnie sekwencjonowania. Jeśli tak otrzymany wynik badania PCR jest negatywny, próbkę można uznać za negatywną. Jeśli natomiast wynik badania PCR jest pozytywny, wstępnej identyfikacji ToMoV można dokonać poprzez określenie rozmiaru amplikonu PCR, a następnie sekwencjonując produkt. Potwierdzenie diagnozy ToMoV wymaga analizy sekwencji zarówno z próbek pochodzących z importu do regionu EPPO, jak również z próbek polowych z obszaru krajów EPPO w celu potwierdzenia pierwszego wykrycia 'nowego' begomowirusa w regionie.

### **Raport i dokumentacja z badań**

Wytyczne odnośnie raportów i dokumentacji z badań zawarte są w Standardzie EPPO PM7/- (w przygotowaniu).

## **Dodatkowe informacje**

Dodatkowe informacje dotyczące tego organizmu można uzyskać od: Virology teams PLHC and PLHB, Central Science Laboratory, Sand Hutton, York YO41 1LZ (UK). E-mail: jane.morris@csl.gov.uk.

## **Podziękowania**

W oryginale protokół ten został napisany przez: J. Morris, Central Science Laboratory, York (GB).

## **Materiały źródłowe<sup>3</sup>**

- Abouqid A & Hiebert E (1991) Characterization of Florida tomato geminivirus. *Phytopathology* 81, 1184.
- Abouqid A, Polston JE & Hiebert E (1992) The nucleotide sequence of Tomato mottle virus, a new geminivirus isolated from tomatoes in Florida. *Journal of General Virology* 73, 3225–3229.
- Accotto GP, Navas-Castillo J, Noris E, Moriones E & Louro D (2000) Typing of tomato yellow leaf curl viruses in Europe. *European Journal of Plant Pathology* 106, 179–186.
- Anderson PK (1993) [A model for the investigation of *Bemisia tabaci*.] In: *Las Moscas Blancas en América Central y el Caribe* (Eds Hilje L & Arboleada O), pp. 27– 33. *Catie, Turrialba (CR)* (in Spanish).
- Atzmon G, van Oss H & Czosnek H (1998) PCR-amplification of Tomato yellow leaf curl virus DNA from squashes of plants and whitefly vectors: Application to the study of TYLCV acquisition and transmission. *European Journal of Plant Pathology* 104, 189–194.
- Bellows TS, Perring TM & Gill RJ (1994) Description of a species of *Bemisia*. *Annals of the Entomological Society of America* 87, 198–206.
- Brown JK & Bird J (1992) Whitefly-transmitted geminivirus and associated disorders in the Americas and the Caribbean Basin. *Plant Disease* 76, 220–225.
- Cohen S & Harpaz I (1964) Periodic, rather than continual, acquisition of a new tomato virus by its vector, the tobacco whitefly (*Bemisia tabaci*). *Entomologica Experimentalis Applicata* 7, 155–166.
- Deng D, McGrath PF, Robinson DJ & Harrison BD (1994) Detection and differentiation of whitefly-transmitted geminiviruses in plants and vector insects by the polymerase chain reaction with degenerate primers. *Annals of Applied Biology* 125, 327–336.
- Fauquet CM & Stanley J (2003) Geminivirus classification and nomenclature: progress and problems. *Annals of Applied Biology* 142, 165–189.
- Fauquet CM, Bisaro DM, Briddon RW, Brown JK, Harrison BD, Rybicki EP, Stenger DC & Stanley J (2003) Revision of taxonomic criteria for species demarcation in the family Geminiviridae, and an updated list of begomovirus species. *Archives of Virology* 148, 405–421.
- Fauquet CM, Maxwell DP, Gronenborn B & Stanley J (2000) Revised proposal for naming geminiviruses. *Archives of Virology* 145, 1743–1761.

---

<sup>3</sup> Została zachowana oryginalna pisownia. (przyp. tłum.)

- Lohdi MAYeGN, Weeden NF & Reisch BI (1994) A simple and efficient method for DNA extraction from grapevine cultivars and *Vitis* species. *Plant Molecular Biology Reporter* 12, 6–13.
- Macintosh S, Robinson DJ & Harrison BD (1992) Detection of three whitefly-transmitted geminiviruses occurring in Europe by tests with heterologous monoclonal antibodies. *Annals of Applied Biology* 121, 297–303.
- Martínez-Culebras PV, Font I & Jorda C (2001) A rapid PCR method to discriminate between Tomato yellow leaf curl virus isolates. *Annals of Applied Biology* 139, 251–257.
- Moriones E (2000) TYLCV Datasheet. EWSN, Norwich (GB).
- Morris J (2000) TYLCV Datasheet, Plant Health Ref. QIC/55. CSL, York (GB).
- Murphy JF, Zehnder GW, Schuster DJ, Sikora JE, Polston JE & Kloepper JW (2000) Plant growth-promoting rhizobacterial-mediated protection in tomato against Tomato Mottle Virus. *Plant Disease* 84, 779–784.
- Navas-Castillo J, Sánchez-Campos S, Díaz A, Sáez E & Moriones E (1999) Tomato yellow leaf curl virus-IS causes a novel disease of common bean and severe epidemics in tomato in Spain. *Plant Disease* 83, 29–23.
- Polston JE & Anderson PK (1997) The emergence of whitefly-transmitted geminiviruses in tomato in the Western Hemisphere. *Plant Disease* 81, 1358–1369.
- Polston JE, Bois D, Keinath AP & Chemelli DO (1995) Occurrence of Tomato mottle geminivirus in South Carolina, Tennessee, and Virginia. *Plant Disease* 79, 539.
- Reina J, Morilla G, Bejerano ER, Rodríguez MD & Janssen D (1999) First report of *Capsicum annuum* plants infected by Tomato yellow leaf curl. *Plant Disease* 83, 1176.
- Sánchez-Campos S, Navas-Castillo J, Camero R, Saria C, Díaz JA & Moriones E (1999) Displacement of Tomato yellow leaf curl virus-S by TYLCV-IS in tomato epidemics in Spain. *Phytopathology* 89, 1038–1043.
- Simone GW, Brown JK, Hiebert E & Cullen RE (1990) New geminivirus epidemic in Florida tomatoes and peppers. *Phytopathology* 80, 1063.
- Thomas JE, Massalski PR & Harrison BD (1986) Production of monoclonal antibodies to African cassava mosaic virus and differences in their reactivities with other whitefly-transmitted geminiviruses. *Journal of General Virology* 67, 2739–2748.

## **Załącznik 1**

### **Test ELISA**

#### *Przygotowanie próbki do badania testem ELISA*

Odważyć około 1 g porażonego materiału roślinnego. Umieścić każdą próbkę w odpowiedniej torebce polietylenowej w celu dalszej obróbki. Dodać odpowiednią objętość buforu ekstrakcyjnego (Macintosh i wsp., 1992) i zhomogenizować próbkę przy użyciu urządzenia Homex 6 (Bioreba) lub używając wałka dociskowego do tapet lub podobnego. Do badania napipetować po 100 µl jednorodnej próbki do pary studzienek na płytce titracyjnej. Pozostałość ekstraktu zachować w 4°C, aż do czasu zakończenia badania.

#### *Test TAS-ELISA*

W tym teście ELISA, opartym na metodzie Thomasa i wsp. (1986), jako przeciwciało wiążące wykorzystywana jest poliklonalna surowica *African cassava mosaic*

*virus* (ACMV), oraz mysia monoklonalna surowica do detekcji. Do testu używane są płytki titracyjne (Nunc Maxisorp Immunoplate). Rośliny, o których wiadomo, że są porażone, stosowane są jako kontrole pozytywne razem z roślinami zdrowymi tego samego gatunku jak rośliny badane, stosowanymi jako kontrola negatywna. Dodać wyjściowe poliklonalne przeciwciało ACMV w zalecanej rozcieńczeniu ( $10^{-3}$ ) do buforu węglanowego. Rozpipetować roztwór do płytek titracyjnych, w ilości 100  $\mu$ l na studzienkę. Inkubować 3 h w 33°C. Usunąć zawartość studzienek. Wyplukać studzienki trzykrotnie buforem PBS-Tween pozostawiając bufor na 3 min między płukaniem. Osuszyć na chłonnym papierze. Dodać homogenatu próbki w ilości po 100  $\mu$ l na studzienkę, używając dwóch studzienek na próbkę testową. Inkubować w 4°C przez noc. Usunąć zawartość studzienek. Wyplukać studzienki cztery razy buforem PBS-Tween pozostawiając bufor na 3 min między płukaniem. Osuszyć na chłonnym papierze. Dodać TYLCV/ToMoV monoklonalne przeciwciało SCR 23 w zalecanej rozcieńczeniu po 100  $\mu$ l na studzienkę. Inkubować przez 2 h w 33°C. Usunąć zawartość studzienek. Wyplukać studzienki cztery razy buforem PBS-Tween pozostawiając bufor na 3 min między płukaniem. Osuszyć na chłonnym papierze. Przygotować odpowiednie rozcieńczenie koniugatu fosfatazy alkalicznej w buforze zawierającym mleko w proszku. Do każdej studzienki dodać 100  $\mu$ l. Inkubować przez 2 h w 33°C. Usunąć zawartość studzienek. Wyplukać studzienki trzykrotnie buforem PBS-Tween pozostawiając bufor na 3 min między płukaniem. Osuszyć na chłonnym papierze. Przygotować roztwór substratu alkalicznej fosfatazy. Dodać 100  $\mu$ l do każdej ze studzienek. Inkubować w temperaturze otoczenia przez 1 h. Odczytu absorbancji dokonać przy długości fali 405 nm.

#### *Interpretacja wyników testu ELISA*

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.

#### *Materiały użyte do wykonania testu TAS-ELISA*

- Bufor ekstrakcyjny do maceracji tkanki (Macintosh i wsp., 1992): 0,05 M Tris-HCl pH 8,5, 6,05 g; 0,06 M Na<sub>2</sub>SO<sub>3</sub>, 7,56 g. Uzupełnić dejonizowaną wodą destylowaną do objętości nieco poniżej 1 l, doprowadzić pH do wartości 8,5 używając HCl i uzupełnić do końcowej objętości 1 l dopełniając wodą.
- Węglanowy bufor opłaszczający 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. Rozpuścić składniki i sprawdzić pH. Roztwór przechowywać w 4°C.
- 10 x bufor fosforanowy (PBS) 1 x = pH 7,2: NaCl, 80 g; KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>, 2 g; Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> x 12H<sub>2</sub>O, 11,5 g; KCl, 2 g; woda destylowana, 1 l. Rozpuścić składniki i sprawdzić pH. Do użycia rozcieńczyć do 1 x.
- Bufor fosforanowy z Tween (PBS-T): 10 x PBS, 100 ml; 10% Tween 20, 5 ml; woda destylowana, 895 ml. Dobrze wymieszać składniki.
- Bufor do przeciwciał: PBS-T, 100 ml; 5% mleko w proszku, 5 g. Przygotowywać w dniu użycia.
- Bufor substratowy (bufor dietanoloamina, 1 M): dietanoloamina, 95 ml; woda destylowana, 800 ml. Wymieszać i doprowadzić pH do 9,8 używając stężonego HCl. Uzupełnić do 1 l wodą destylowaną. Dodać 0,203 g MgCl<sub>2</sub>. Roztwór przechowywać w 4°C.
- 2 (p-nitrofenyl fosfat) substrat fosfatazy: rozpuścić dwie 5 mg tabletki (Sigma 104) w 10 ml buforu substratowego.

- kity do detekcji TYLCV zawierające monoklonalne przeciwciała SCR23 zawarte w kicie 1072-05 uzyskane były z firmy Adgen (Auchincruive, Szkocja).

## **Załącznik 2**

### **Metody ekstrakcji DNA**

Metoda 1 ekstrakcji DNA zalecana jest dla PCR, zarówno jak opracowana alternatywna metoda 2 ekstrakcji. Metodą alternatywną jest również metoda ze zgniataniem liści Atzmona i wsp. (1998), jednak szczegóły nie są podane.

#### **Metoda 1 ekstrakcji DNA**

Metoda opisana przez Accotto i wsp. (2000) może być używana do ekstrakcji DNA TYLCV oraz ToMoV. Materiał roślinny z liści można zebrać w prosty sposób przy użyciu probówek Eppendorfa, unikając dotykania liści palcami, by uniknąć kontaminacji krzyżowej. Metodę można przeprowadzić używając albo 10 mM  $\beta$ -merkaptioetanol w buforze ekstrakcyjnym, albo 10 mM kwas cytrynowy. Zmiażdżyć 0,15 g tkanki liścia w ciekłym azocie do postaci drobnego proszku, za pomocą tłuczka i moździerza lub plastikowej torebki do miażdżenia i wałka dociskowego do tapet. Należy upewnić się, że tkanka po zamrożeniu nie zdążyła się rozmrozić. Dodać 500  $\mu$ l buforu ekstrakcyjnego (100 mM Tris-HCl pH 8, 50 mM EDTA, 500 mM NaCl, 1% SDS i 10 mM  $\beta$ -merkaptioetanol lub kwas cytrynowy 10 mM). Wymieszać zawartość probówki energicznie potrząsając, a następnie inkubować w 65°C przez 5 min. Dodać 150  $\mu$ l 5 M octanu potasu i wymieszać energicznie zawartość. Następnie inkubować w 0°C przez 10 min. Krok ten ma na celu usunięcie większości białek i polisacharydów w postaci kompleksu z nierozpuszczalnym osadem potassium dodecyl sulphate. Probówki są następnie wirowane w 13 000 obr./min przez 10 min, a supernatant (około 500  $\mu$ l) przenoszony do probówki zawierającej 350  $\mu$ l lodowego izopropanolu. Następnie zawartość należy dobrze wymieszać i wirować w 13 000 obr./min przez 10 min. Przemyć osad poprzez dodanie 500  $\mu$ l 70% etanolu i wirować przez 5 min w 13 000 obr./min. Ostrożnie usunąć etanol i suszyć osad przez 15 min w komorze próżniowej lub pozostawić do całkowitego wyschnięcia na powietrzu. Zawiesić osad w 100  $\mu$ l 10 mM Tris, 1 mM EDTA pH 8,0.

#### **Metoda 2 ekstrakcji DNA**

Dla metody Lohdi i wsp. (1994), umieścić 200 mg materiału roślinnego w ciekłym azocie. Dodać 2–3 ml buforu ekstrakcyjnego CTAB (Załącznik 4). Shomogenizować próbkę używając drewnianego/plastikowego wałka dociskowego do tapet lub podobnego narzędzia. Zlać wyciśnięty sok do 1,5 ml probówki wirówkowej. Inkubować przez 10–15 min w 65°C. Wirować przez 5 min w 13 000 obr./min. Przenieść 700  $\mu$ l supernatantu do nowej probówki wirówkowej. Wyekstrahować taką samą objętością (700  $\mu$ l) mieszaniny chloroform: IAA (24 : 1). Wirować w niskich obrotach przez 2 s. Wirować w 13 000 obr./min w temperaturze otoczenia przez 10 min. Zebrać górną, wodną warstwę i przenieść do nowej probówki Eppendorfa. Powtórzyć krok. Wytrącać używając 0,5 objętości 5 M chlorku sodu i równą objętość lodowego izopropanolu. Inkubować w –20°C przez noc. Strącić DNA wirując w 13 000 obr./min przez 10 min. Przemyć osad przez dodanie 500  $\mu$ l 70% etanolu i wirować przez 5 min w 13 000 obr./min. Ostrożnie usunąć etanol. Suszyć osad przez 15 min. Zawiesić osad

w 100  $\mu$ l 1xTE (Załącznik 4). Alternatywnie, zaleca się używanie zestawu do ekstrakcji EZNA extraction kit Omega Biotek.

### **Załącznik 3**

#### **Testy PCR**

##### *PCR metoda 1*

W celu wykonania badania PCR z roślin w kierunku TYLCV/TYLCSV (Accotto i wsp., 2000), należy w 1,5 ml próbownicy przygotować mieszaninę do reakcji. Końcowe stężenia składników mieszaniny reakcyjnej PCR (trzymać na lodzie): 2 mM  $MgCl_2$ , 0,2 mM dNTPs, 0,4  $\mu$ M (końcowe stężenie) starter TY1, 0,4  $\mu$ M (końcowe stężenie) starter TY2, 0,4 U  $\mu$ l<sup>-1</sup> Taq DNA polimerazy na całkowitą objętość 25  $\mu$ l. Dla większej ilości reakcji, przeliczyć ilość każdego składnika dla wymaganej liczby reakcji (25  $\mu$ l na podwielokrotność próbki). Sporządzić 1 objętość więcej niżeli jest wymagane by ułatwić pipetowanie. Po wymieszaniu składników, w celu przeprowadzenia reakcji PCR, przenieść 25  $\mu$ l mieszaniny reakcyjnej PCR, z 1  $\mu$ l kwasu nukleinowego DNA do 0,2 ml próbówki Eppendorfa. Umieścić próbówki w bloku grzejnym termocyklera. Uruchomić następujący program: 1 cykl (4 min w 95°C), 35 cykli (30 s w 95°C, 30 s w 60°C, 30 s w 72°C), 1 cykl (7 min w 72°C). Analizie w 1% żelu agarozowym poddać 5  $\mu$ l produktu PCR lub przechowywać próbówki w -20°C do czasu wykonania analizy.

##### *Interpretacja wyników badania PCR*

Jeśli obecny jest amplikon spodziewanej wielkości, około 580 bp, wytrącić etanolem pozostałe 20  $\mu$ l produktu PCR i przeprowadzić RFLP celem potwierdzenia tożsamości TYLCV jak opisano poniżej. Jeśli nie ma żadnego amplikonu, bądź uzyskany produkt amplifikacji jest innej wielkości niżeli oczekiwana, należy wykorzystać PCR metodę 2, by określić czy próbka jest negatywna lub czy mamy do czynienia z innym gatunkiem ssDNA wirusa.

##### *RFLP*

Ponownie zawiesić DNA (wytrącone etanolem 20  $\mu$ l objętości produktu PCR) i trawić Ava 11 w objętości 10  $\mu$ l. Nałożyć całość mieszaniny reakcyjnej na 3% żel agarozowy NuSieve (lub 2% agarozę). Spodziewane dla TYLCSV produkty cięcia mają wielkość 68 bp, 360 bp oraz 150 bp. Dla TYLCV spodziewane produkty cięcia to 277 bp i 302 bp.

##### *PCR metoda 2*

Do badania MPCR/PCR w kierunku wykrycia geminiwirusów w materiale roślinnym (wirusy TYLC i ToMoV) (Deng i wsp., 1994), mieszaninę reakcyjną do reakcji PCR przygotować w 1,5 ml próbownicy wirówkowej. Skład typowej mieszaniny reakcyjnej PCR: 10x bufor PCR 5  $\mu$ l, 1,75 mM  $MgCl_2$  3,5  $\mu$ l, 0,2 mM dNTPs 1  $\mu$ l (ze 100  $\mu$ l roztworu stock), 0,2  $\mu$ M (końcowe stężenie) starter 540 2  $\mu$ l, 0,2  $\mu$ M (końcowe stężenie) starter 541 2  $\mu$ l, 2 U Taq DNA polimeraza 0,4  $\mu$ l, sterylna, ultra-czysta woda 34,6  $\mu$ l, całkowita objętość 48,5  $\mu$ l. Dla kolejnych reakcji, przeliczyć ilość każdego ze składników na wymaganą ilość reakcji (48,5  $\mu$ l na podwielokrotność próbki). Sporządzić 1 objętość więcej niżeli jest



wymagane co ułatwi pipetowanie. W celu przeprowadzenia PCR po wymieszaniu wszystkich składników, przenieść 48,5 µl mieszaniny reakcyjnej PCR, oraz 1,5 µl DNA do probówki Eppendorfa o objętości 0,5 ml. Umieścić probówki w bloku grzejnym termocyklera. W termocyklerze uruchomić następujący program: 1 cykl (2 min w 94°C), 1 cykl (1 min w 55°C), 1 cykl (2 min w 72°C), 32 cykle (45 s w 94°C, 1 min w 55°C, 2 min w 72°C), 1 cykl (45 s w 94°C, 1 min w 55°C, 5 min w 72°C). Dokonać analizy produktów lub przechowywać probówki w -20°C do czasu jej wykonania.

#### *Analiza produktów reakcji PCR*

Fragmety powstałe po PCR wykrywane są poprzez elektroforezę w żelu agarozowym i wybarwiane bromkiem etydydy. Przygotować 1–2% żel agarozowy delikatnie doprowadzając agarozę w 1xTBE do wrzenia (Załącznik 4). Schłodzić roztopioną agarozę do temperatury 50–60°C, wylać na saneczki i umieścić w żelu grzebień. Pozwolić, aby żel się zestalił. Usunąć grzebień; zanurzyć żel w 1xTBE. Do probówek zawierających po 50 µl próbki dodać po 10 µl buforu obciążającego, potrząsnąć by wymieszać roztwór. Ostrożnie napełniać studzienki (12 µl próbka + bufor). Zastosować odpowiednie markery oraz DNA zamplifikowane z kontroli pozytywnej. Elektroforezę rozciągać przy 100 V/40 mA przez 1 h do czasu, aż czoło barwnika nie osiągnie odległości około 1 cm od krawędzi żelu. Usunąć żel i poddać go barwieniu w roztworze bromku etydydy (0,5 µg ml<sup>-1</sup>) przez okres 45 min. Wyplukać żel w wodzie destylowanej. Wizualizacji zamplifikowanych fragmentów DNA dokonać za pomocą UV *trans*-iluminacji. Produkt PCR dla TYLCV z zastosowaniem zdegenerowanych starterów (Załącznik 4) jest długości 540 bp. Zweryfikować wyniki wobec markera DNA oraz kontroli pozytywnej. Sfotografować żel celem dostarczenia trwałego zapisu badania.

#### *Interpretacja wyników badania PCR/MPCR*

Jeśli mamy do czynienia z więcej niż jednym produktem PCR w studziencie, test określany jest terminem MPCR. Test jest negatywny jeśli nie mamy do czynienia z charakterystycznym fragmentem 540 bp (TYLC lub inny geminiwirus) lub z fragmentem 377 bp (ToMoV), mamy natomiast obecne fragmenty dla właściwego izolatu/ów kontroli pozytywnej. Wynik testu jest pozytywny, jeśli wykryty został fragment wielkości 540 bp (TYLC lub inny geminiwirus) lub wielkości 377 (ToMoV) i jednocześnie fragment ten jest identyczny z izolatami kontroli pozytywnej.

#### *RFLP produktów PCR otrzymanych z zastosowaniem PCR metody 2*

W celu potwierdzenia pierwszego wykrycia ToMoV wymagana jest analiza sekwencji. Nie są dostępne rozstrzygające wzory RFLP dla wszystkich gatunków TYLCV, z tego powodu aby potwierdzić tożsamość wirusa zalecane jest sekwencjonowanie.

#### **Załącznik 4**

#### **Materiały do detekcji wirusów TYLC lub ToMoV w roślinach, z zastosowaniem PCR**

*Oligonukleotydowe sekwencje starterów:*

TY1 (+): 5'-GCC CAT GTA (T/C) C G (A/G) AAG CC-3'  
TY2 (-): 5'-GG (A/G) TTA GA (A/G) GCA TG (A/C) GTA C-3'

Deng 541: 5'-TAA TAT TAC CKG WKG VCC SC-3'

Deng 540: 5'-TGG ACY TTR CAW GGB CCT TCA CA-3'

(gdzie K = G lub T, R = A lub G, S = C lub G, W = A lub T, Y = C lub T, B = C, G lub T, a V = A, C albo G)

Bufor ekstrakcyjny do metody 1 ekstrakcji DNA: 100 mM Tris-HCl pH 8; 50 mM EDTA; 500 mM NaCl; 1% SDS; 10 mM  $\beta$ -merkaptopetanol lub 10 mM kwas cytrynowy.

Bufor ekstrakcyjny do metody 2 ekstrakcji DNA: 2% CTAB; 100 mM Tris-HCl pH 8,0; 20 mM EDTA; 1,4 M NaCl; 1% Na siarczan (Na sulphate); 2,0% PVP-40. Zmieszać pierwsze 4 składniki. Uzupełnić do 1 l wodą destylowaną. Roztwór przechowywać w temperaturze otoczenia. Dodać PVP i siarczan (IV) sodu świeżo do odmierzonej ilości stoku buforu (tak sporządzony zachowa swoje właściwości przez około 2 tygodnie).

Bufor TE do metody 1 i 2 ekstrakcji DNA: 10 mM Tris-HCl; 1 mM EDTA; woda o czystości do biologii molekularnej. Doprowadzić pH do 8,0.

10 x Tris borate EDTA bufor (do elektroforezy w żelu): 108 g Tris HCl; 55 g kwasu borowego; 7,4 g EDTA. Uzupełnić do 1 l wodą o czystości do biologii molekularnej i doprowadzić pH do 8,2.

Enzymy restrykcyjne: Ava11 TYLCV/TYLCSV.

Testy lateral flow (LFDs): Numer katalogowy produktu 14-772 (10 testów) – ADGEN; Numer katalogowy produktu 14-773 (100 testów) – ADGEN

<b>Tłumaczenie z jęz. angielskiego:</b>	<b>Sprawdził:</b>	<b>Zatwierdził:</b>
Justyna Pięcińska (GIORIN CL)	Ewa Hennig (GIORIN CL)	Janina Butrymowicz (GIORIN CL)
30.11.2012	20.12.2012	