

Diagnostyka¹ Diagnostic

Candidatus *Phytoplasma mali*

Zakres

Standard opisuje protokół diagnostyczny dla Candidatus *Phytoplasma mali* (Apple proliferation phytoplasma- fitoplazma proliferacji jabłoni).

Zatwierdzenie i nowelizacja

Zatwierdzony we wrześniu 2005 roku.

Wprowadzenie

Jabłoń jest głównym żywicielem *Phytoplasma mali* (EPPO/CABI, 1996). Odmiany różnią się reakcją ale w większości, włączając w to sadzonki, wydają się być podatne. Choroba może występować zarówno na odmianach jak i podkładkach, jak również na dzikich lub ozdobnych roślinach *Malus*. Powszechnie występuje w młodych sadach i szkółkach.

Tożsamość

Nazwa: Candidatus *Phytoplasma mali*.

Synonimy: *Apple proliferation phytoplasma*.

Stanowisko taksonomiczne: *Bacteria, Firmicutes, Mollicutes, Acholeplasmatales, Acholeplasmataceae*. *P. mali* należy do grupy fitoplazm 16SrX. Jako ‘Candidatus’ zaproponowana przez Seemüller & Schneider (2004).

Kod EPPO: PHYPMA.

Kategoria fitosanitarna: EPPO- lista A2, nr 87; UE- Załącznik I/A2.

Wykrywanie

Objawy choroby

Najbardziej typowymi objawami powodowanymi przez *P. mali* są tzw. czarcie miotły (witches’ broom) na zakończeniach pędów (Web Fig. 1). Liście porażonych drzew są generalnie mniejsze i bardziej piłkowane, z reguły z powiększonymi przylistkami (Web Fig. 2). Owoce są

¹ Ryciny w niniejszym standardzie oznaczone „Web Fig.” zostały opublikowane na stronie internetowej EPPO www.eppo.org.

mniejsze i spłaszczone, o wydłużonej szypułce (Web Fig. 3). Wczesne czerwienienie się liści jest dobrym wskaźnikiem obecności choroby. Pojawienie się nadmiernie rozwiniętego systemu korzeni włóśnikowych na roślinach szkółkarskich w okresie zimy może być kolejnym takim sygnałem.

Rozmieszczenie *P. mali* w zainfekowanym drzewie jest nierównomierne i zmienne w ciągu roku. Może się ono różnić w kolejnych latach, a w niektórych objawy choroby mogą w ogóle nie być obserwowane. Wzór rozmieszczenia fitoplazm w obrębie drzewa zależy również od warunków temperaturowych. Zimą, zawartość *P. mali* w drzewie spada na skutek degeneracji rurek sitowych, a fitoplazma koncentruje się głównie w korzeniach. Podczas wiosny, wraz z początkiem przepływu soków (od kwietnia do maja), *P. mali* ponownie zajmuje wiązki przewodzące i koronę przemieszczając się z korzeni i osiagając najwyższy poziom późnym latem bądź wczesną jesienią. Od połowy lata do końca okresu krążenia soków. *P. mali* lokalizowana jest w tkankach łyka pędów. Ze względu na to, iż temperatura może wpływać na koncentrację agrofaga, wyniki badań mogą być niewiarygodne zarówno w zbyt niskich jak i za wysokich temperaturach. Detekcja z korzeni możliwa jest w ciągu całego roku, jednak należy pamiętać, że tu również mamy do czynienia z nierównomiernym rozmieszczeniem (Schaper & Seemüller, 1982; Seemüller i wsp., 1984).

Identyfikacja

Ponieważ fitoplazmy nie mogą być w prosty sposób utrzymywane i oczyszczane, do niedawna w celu umożliwienia detekcji na drzewach owocowych stosowana była jedynie inokulacja na zdrewniałe rośliny wskaźnikowe. Metoda ta była jednakże czasochłonna i kosztowna. Opracowane przez kilka grup badawczych metody genetycznej amplifikacji znacząco poprawiły sytuację. Dowiedli oni, iż metody te są szybkie, czułe i mniej kosztowne od wcześniej stosowanych. Pod koniec sezonu wegetacyjnego, fitoplazmy przemieszczają się ze szczytowej części roślin do korzeni gdzie zimują. Jeżeli badanie musi być przeprowadzone w okresie zimowym, jako próby należy pobrać korzenie. Próby świeżego materiału roślinnego powinny być przechowywane w temperaturze -20°C przez okres nie dłuższy niż 6 miesięcy.

Rośliny wskaźnikowe

Testy mogą być wykonywane zarówno w polu jak i w pomieszczeniach szklarniowych. W szklarniach, rośliny testowe są szczepione (poprzez okulizację na przystawkę boczną, przeszczepianie łodyg lub sadzonki korzeniowe), na wskaźnikowe jabłonie *Malus x domestica* odmiany 'Charden', 'Golden Delicious' lub 'Rode Schone van Boskoop'. Uprawy te mogą wykazywać symptomy po okresie spoczynku. Test jest wykonywany wiosną na roślinach wskaźnikowych w okresie wzrostu, uzyskanych z rozmnażania *in vitro* i hodowli w doniczkach. Wykonuje się 2 szczepienia na roślinę wskaźnikową w 5 powtórzeniach. Kiedy zostanie wytworzony zrost (zazwyczaj po upływie 2 tygodni), rośliny przetrzymuje się w chłodnym pomieszczeniu w $5^{\circ}\text{C} \pm 4^{\circ}\text{C}$ przez 60 – 70 dni przymusowego spoczynku. Następnie rośliny przenosi się ponownie do szklarni. Rośliny przycina się pozostawiając 1 lub 2 oczka powyżej miejsca szczepienia, w celu koncentracji *P. mali* w młodych odrostach. Miesiąc lub dwa miesiące po przycięciu, można obserwować pierwsze objawy (powiększone przylistki, obecność „czarcich mioteł”). Całkowity czas trwania testu to około 4 miesięcy. Wskaźnik powodzenia tej metody jest zróżnicowany, zależy od warunków testu i może osiągnąć 80%. W warunkach naturalnych rośliny wskaźnikowe szczepione są pod koniec lata lub jesienią. Używa się tych samych roślin wskaźnikowych w 5 powtórzeniach i poddaje się je obserwacji przez okres co najmniej 2 lat.

Barwienie DAPI

Cienkie skrawki młodych tkanek (ogonki młodych liści lub tkanka floemu pochodząca z pędów, gałęzi i korzeni), barwione są roztworem DAPI (4'6 diamidino-2-phenylindole) o stężeniu 1 µg/ml. Skrawki te obserwowane są w mikroskopie fluorescencyjnym. Obecność niebieskawej fluorescencji (w 460 nm) w rurkach sitowych wskazuje na obecność fitoplazm (Seemüller, 1976). Metoda była początkowo jedyną dostępną. Wymaga dużego doświadczenia osoby obserwującej skrawki i nie zawsze jest wystarczająco czuła. Zaletami jej są szybkość i niski koszt, nie jest to jednak metoda specyficzna. Dla każdej próbki, skrawki młodych tkanek powinny pochodzić z różnych części rośliny, co związane jest z nierównomiernym rozmieszczeniem fitoplazmy.

ELISA

Dostępność monoklonalnych przeciwciał specyficznych względem *P. mali* (Loi i wsp., 2002) umożliwia wykonanie bezpośredniego testu ELISA, który jest szczególnie użyteczny w przypadku badania dużej ilości próbek. Najbardziej wiarygodne wyniki można uzyskać, gdy badane jest użytkowanie liści lub łodygi pozyskane od późnej wiosny do końca lata (czerwiec – koniec września). Próby liści powinny być pobierane w sposób przypadkowy, wokół całej rośliny, z powodu nierównomiernego rozmieszczenia *P. mali* w ulistnieniu. Test ELISA należy przeprowadzać zgodnie z instrukcją producenta (Bioreba). W chłodniejszym klimacie oraz w przypadku infekcji latentnych, w północnej i wschodniej Europie, test ELISA może nie być wystarczająco czuły by wykryć stosunkowo niską koncentrację patogena, tak więc wynik może okazać się niewiarygodny.

Techniki molekularne

Dostępne są techniki molekularne, które łączą w sobie czułość i specyficzność. DNA jest izolowane z *P. mali* zgodnie z protokołem Ahrens & Seemüller (1992) lub wersją uproszczoną (np. Ministère de l'Agriculture, 2005), z pędów bądź korzeni jabłoni, a ekstrakt jest amplifikowany w reakcji PCR.

Dostępne są różne typy uniwersalnych starterów do amplifikacji DNA fitoplazm wyizolowanych z floemu.

Najczęściej używanymi są te, opisane przez Lorenz i wsp. (1995) oraz Lee i wsp. (1998). Obie pary zdolne są do amplifikacji produktu w reakcji PCR z jakiegokolwiek fitoplazmy, włączając *P. mali*.

Jeżeli używane są uniwersalne startery fU5/rU3 (Lorenz i wsp. 1995) lub R16F2n/R16R2 (Lee i wsp., 1998), produkt amplifikacji można poddać cięciu enzymem restrykcyjnym *AluI* w celu upewnienia się, że fitoplazma należy do grupy AP (Seemüller i wsp., 1998) lub do grupy 16SrX (podgrupa A) (Lee i wsp., 1998).

Jeżeli używane są startery fO1/rO1, specyficzne względem grupy AP-lub 16SrX (Lorenz i wsp., 1995), produkt amplifikacji można ciąć enzymami restrykcyjnymi *SspI* oraz *SfeI* (Lorenz i wsp., 1995) w celu odróżnienia *P. mali* od *P. pyri* i *P. prunorum*.

Jeżeli używany jest zestaw starterów AP5/4 specyficznych względem *P. mali* (Jarausch i wsp., 1994, 1995) z użyciem tego samego protokołu, wówczas nie wymagana jest analiza RFLP. Jednakże, przy użyciu tych specyficznych starterów, test wykazuje obniżoną czułość i pewne izolaty mogą nie zostać wykryte.

Ekstrakcja DNA do PCR

Pędy, korzenie, liście lub ogonki liściowe mogą być użyte jako materiał. Pędy oraz korzenie należy pozbawić kory, a próbkę floemu należy pobrać sterylnym ostrzem. W przypadku liści pobierana jest jedynie nerwacja. Dopuszczalna jest jakakolwiek efektywna metoda miazdżenia tkanek

(Załącznik I). Najlepsze rezultaty uzyskuje się, jeśli DNA ekstrahowane jest z nerwacji liści lub z łodyg pobieranych w okresie od późnej wiosny do końca lata (czerwiec – koniec września).

Do reakcji PCR, zalecane jest użycie zmodyfikowanej procedury izolacji fitoplazm jak opisano w Załączniku I, ponieważ niska koncentracja może uniemożliwić ich detekcję. Warunki dla amplifikacji PCR zamieszczone są w Załączniku 2. Elektroforeza prowadzona jest w 1% żelu agarozowym, pod stałym napięciem 90 V, w buforze TBE. Próba jest pozytywna jeżeli prążek pojawia się na wysokości odpowiadającej produktowi o spodziewanej ilości par zasad.

Charakterystyka fitoplazmy przy użyciu RFLP

Zamplifikowane DNA (10 µl) jest dodawane do 10 µl roztworu trawiącego (sterylna woda destylowana, 1X bufor specyficzny względem enzymu, 2 jednostki enzymu i zamplifikowane DNA). Proporcja (10 + 10) może być zmienna w zależności od koncentracji amplikonów. Mieszanina inkubowana jest przez co najmniej 2 h w 37°C, a następnie poddawana jest elektroforezie w 2% żelu agarozowym. Dalsze informacje odnośnie analizy RFLP zamieszczone są w Załączniku 2.

Wnioski

Obecność wyraźnych objawów (czarcie miotły i powiększone przylistki) daje silne podstawy, by stwierdzić porażenie rośliny. Laboratoryjne potwierdzenie można uzyskać poprzez wykonanie PCR (lub ELISA). Jeśli potrzebne jest dodatkowe potwierdzenie (np. w przypadku braku objawów) można tego dokonać poprzez RFLP lub PCR z użyciem innego zestawu starterów. Jeśli zaistnieje konieczność może zostać przeprowadzony test na roślinach wskaźnikowych (np. w przypadku sytuacji dyskusyjnych).

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:

Service de la Protection des Végétaux, Unité de virologie des ligneux, BP 81, 33883 Villenave d'Ornon Cedex (France) Laboratoire de biologie cellulaire et moléculaire, INRA–UMR 1090, BP81, 33883 Villenave d'Ornon Cedex (France)

B. Schneider, Biologische Bundesanstalt für Land- und Forstwirtschaft, Institut für Pflanzenschutz im Obstbau, Schwabenheimer Str. 101, D-69221 Dossenheim (Germany)

A. Bertaccini, UCI-STAA Patologia vegetale, Università di Bologna, Italy

N. Loi, Università di Udine, Dipartimento di Biologia Applicata alla Difesa delle Piante, Udine (Italy)

W. Jarausch, Institut für molekulare und angewandte Pflanzenforschung Rheinland-Pfalz, RLP AgroScience GmbH, Breitenweg 71, 67435 Neustadt-an-der-Weinstrasse (Germany).

Podziękowania

W oryginalnym protokół ten został napisany dla EPPO przez F. Costard, Ministère de l'Agriculture, Service de la Protection des Végétaux, Unité de virologie des ligneux, Villenave d'Ornon (France).

Materiały źródłowe²

- Ahrens U & Seemüller E (1992) Detection of DNA of plant pathogenic mycoplasma-like organisms by a polymerase chain reaction that amplifies a sequence of the 16S RNA gene. *Phytopathology* 82, 828 – 832.
- EPPO/CABI (1996) Apple proliferation phytoplasma. In: *Quarantine Pests for Europe*, 2nd edn, pp. 959–962. CAB International, Wallingford (GB).
- Jarausch W, Saillard C, Dosba F & Bové JM (1994) Differentiation of mycoplasma-like organisms (MLOs) in European fruit trees by PCR using specific primers derived from the sequence of a chromosomal fragment of apple proliferation, MLO. *Applied and Environmental Microbiology* 60, 2916 –2923.
- Jarausch W, Saillard C, Dosba F & Bové JM (1995) Specific detection of mycoplasma-like organisms in European fruit trees by PCR. *Bulletin OEPP/EPPO Bulletin* 25, 219 –225.
- Lee IM, Gundersen-Rindal DE, Davis RE & Bartoszyk IM (1998) Revised classification scheme of phytoplasmas based on RFLP analyses of 16S rRNA and ribosomal protein gene sequences. *International Journal of Systematic Bacteriology* 48, 1153 –1169.
- Lim PO & Sears BB (1989) 16S rDNA sequence indicates that plant-pathogenic mycoplasma-like organisms are evolutionarily distinct from animal mycoplasmas. *Journal of Bacteriology* 171, 5901–5906.
- Loi N, Ermacora P, Carraro L, Osler R & Chen TA (2002) Production of monoclonal antibodies against apple proliferation phytoplasma and their use in serological detection. *European Journal of Plant Pathology* 108, 81– 86.
- Lorenz KH, Schneider B, Ahrens U & Seemüller E (1995) Detection of the apple proliferation and pear decline phytoplasmas by PCR amplification of ribosomal and non ribosomal DNA. *Phytopathology* 85, 771–776.
- Menzel W, Jelkman W & Mais E (2002) Detection of four apple viruses by multiplex RT-PCR assays with coamplification of plant mRNA as internal control. *Journal of Virological Methods* 99, 81–92.
- Ministère de l'Agriculture (2005) Méthode VL/05/12 version a: détection de l'enroulement chlorotique de l'abricotier, de la prolifération du pommier et du dépérissement du poirier sur rameaux et racines par la technique d'amplification génique PCR (Polymerase Chain Reaction). *Journal Officiel de la République Française*, 2005-06-02.
- Sambrook J, Fritsch EF & Maniatis T (1989) *Molecular Cloning: A Laboratory Manual*. Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor (US).
- Schaper U & Seemüller E (1982) Condition of the phloem and the persistence of mycoplasma-like organisms associated with apple proliferation and pear decline. *Phytopathology* 72, 736 –742.
- Schneider B, Seemüller E, Smart CD & Kirkpatrick BC (1995) Phylo-genetic classification of plant pathogenic mycoplasma-like organisms or phytoplasmas. In: *Molecular and Diagnostic Procedures in Myco-plasmology* (Ed. Razin, S), pp. 369 –380. Academic Press, San Diego (US).
- Seemüller E (1976) Investigations to demonstrate mycoplasma-like organisms in diseased plants by fluorescence microscopy. *Acta Horticulturae* 67, 109 –111.

² Została zachowana oryginalna pisownia. (przyp. tłum.)

- Seemüller E, Marcone C, Lauer U, Ragozzino A & Göschl M (1998) Current status of molecular classification of the phytoplasmas. *Journal of Plant Pathology* 80, 3–26.
- Seemüller E, Schaper U & Zimbelmann R (1984) Seasonal variation in the colonization patterns of mycoplasma-like organisms associated with apple proliferation and pear decline. *Zeitschrift für Pflanzenkrankheiten und Pflanzenschutz* 91, 371–382.
- Seemüller E & Schneider B (2004) Candidatus *Phytoplasma mali*, Candidatus *Phytoplasma pyri* and Candidatus *Phytoplasma prunorum*, the causal agents of apple proliferation, pear decline and European stone fruit yellows, respectively. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology* 54, 1217–1226

Załącznik I Ekstrakcja DNA

Ekstrakcja DNA

Bufor ekstrakcyjny zawiera: 2% CTAB (rozpuszczalny w około 50°C); 1,4 M NaCl; 20 mM EDTA; 100 mM Tris-HCl pH 8. Małe, sztywne, plastikowe torebki zawierające próbkę oraz bufor ekstrakcyjny (5 ml na 1 g floemu) są rozcierane z użyciem homogenizera. Należy przenieść 1–2 ml ekstraktu do 2 ml probówek. Inkubować probówki przez co najmniej 30 min w 65°C, jeśli to możliwe wytrząsając, wirować w 2000 g przez 2 min w wirówce. Przenieść 1 ml supernatantu do nowej probówki i dodać 1 ml roztworu chloroform-octanol (24 : 1). Mieszać dwie fazy do czasu uzyskania jednolitej emulsji. Wirować w 13 000 g przez 5 min. Przenieść supernatant do nowej probówki i dodać około 800 µl schłodzonego izopropanolu. Wymieszać i wirować w 15000 g przez 10 min. Usunąć supernatant. Dodać 500 µl 70% etanolu i wirować w 15 000 g przez 5 min. Opróżnić probówki i osuszyć osad. Dodać 100 µl wody destylowanej i wymieszać poprzez worteksowanie celem ułatwienia rozpuszczenia osadu.

Alternatywnie, komercyjne kity (np. DNeasy, Qiagen) lub inne opisane metody, np. ekstrakcja z użyciem silica-suspension opisana przez Menzel i wsp. (2002), może zostać użyta w celu ekstrakcji DNA. Ekstrakty mogą być przechowywane w warunkach głębokiego mrożenia (–80°C) przez okres jednego roku.

Zmodyfikowana procedura izolacji fitoplazm

Bufor ekstrakcyjny zawiera (na 100 ml): K₂HPO₄ bezwodny 1,67 g; KH₂PO₄ 0,41 g; sacharoza 10 g; albumina surowicy wołowej (frac V) 0,15 g; polivinylpyrrolidon P.M. 10.000 2 g; kwas askorbinowy 0,53 g; doprowadzić pH do 7,6 przy użyciu KOH. Zmiażdżyć 1,5 g świeżej nerwacji liścia w sterylnym, schłodzonym moździerzu i utrzeć z dodatkiem 7– 8 ml świeżo sporządzonego buforu i 50 mg sterylnego piasku kwarcowego (Sigma, cod. S9887). Inkubować 10 – 15 min w lodzie. Dodać kolejne 5 ml tego samego buforu i dokładnie shomogenizować. Przenieść zawartość do 15 ml probówek (Corex) i wirować we wcześniej schłodzonym rotorze (Beckman JA 20) w 5000 obr. min⁻¹ przez 5 min (4°C). Przenieść supernatant do schłodzonej czystej probówki Corex. Wirować w 19 000 obr. min⁻¹ przez 20 min (Beckman JA 20). Osuszyć osad i zawiesić go w 2 ml 2% buforu CTAB, podgrzanego uprzednio do 60°C. Inkubować 10 –20 min w 60°C delikatnie mieszając. Przenieść 1 ml do czystej 2 ml probówki i postępować zgodnie z procedurą ekstrakcji DNA opisaną powyżej, poczynając od etapu ekstrakcji z użyciem odczynnika chloroform-octanol.

Załącznik II Amplifikacja PCR i analiza RFLP

Uniwersalny PCR (Lorenz i wsp., 1995)

Startery PCR 'forward' i 'reverse' to odpowiednio fU5 (5'-CGG CAA TGG AGG AAA CT-3') oraz rU3 (5'-TTC AGC TAC TCT TTG TAA CA-3'), amplifikują one fragment 16S rDNA wielkości 876-bp. Startery fU5 i rU3 odpowiadają nukleotydom 369-386 oraz 1251-1231 sekwencji 16S rDNA żółtaczki astra szczepu OAY (*Oenothera hookeri* MLO, Lim & Sears, 1989).

PCR

W skład 40 µl mieszaniny reakcyjnej wchodzi co następuje: 0,5 µM każdego ze starterów; 100 µM dNTPs; 0,2 jednostki (U) Taq DNA polimerazy (np. Goldstar polymerase, Eurogentec) i 5 µl ekstraktu DNA; w buforze reakcyjnym dostarczonym przez producenta Taq DNA polimerazy. PCR prowadzony jest w probówkach reakcyjnych o objętości 0,2 ml w termocyklerze (np. GeneAmp PCR system 9600, Applied Biosystems) z zachowaniem następujących parametrów: 2 min w 94°C; 40 cykli: 20 s w 94°C, 20 s w 55°C i 1 min w 72°C, następnie końcowa elongacja przez 4 min w 72°C i schłodzenie do 4°C. Po amplifikacji, 10 µl produktu PCR poddawane jest elektroforezie w 1% żelu agarozowym pod stałym napięciem 90 V, w buforze TBE według standardowych procedur (Sambrook i wsp., 1989) w obecności drabinki DNA (np. 100 bp-ladder, Fermentas) umożliwiającej ocenę wielkości uzyskanych fragmentów. Produkty PCR są wizualizowane i fotografowane w świetle UV.

Analiza RFLP

Produkty PCR poddawane są analizie poprzez cięcie enzymem restrykcyjnym *AluI*. Na każde 20-µl mieszaniny reakcyjnej wchodzi: 2 jednostki (Units) enzymu restrykcyjnego i 10 µl produktu PCR, w buforze reakcyjnym dostarczonym przez producenta enzymu. Reakcje prowadzi się w 37°C przez okres co najmniej 2 godzin. Strawione produkty PCR poddawane są elektroforezie w 2% żelu agarozowym w obecności drabinki DNA (np. 100 bp-ladder, Fermentas) umożliwiającej ocenę wielkości uzyskanych fragmentów. Produkty PCR są wizualizowane i fotografowane w świetle UV.

Interpretacja wzoru prążków

Fitoplazma identyfikowana jest jako przynależna do grupy AP lub grupy 16SrX, jeżeli produkt PCR trawiony *AluI* daje fragmenty wielkości 476, 189, 149 i 56 bp.

Uniwersalny PCR (Lee i wsp., 1998)

Startery PCR 'forward' i 'reverse' to odpowiednio R16F2n (5'-GAA ACG ACT GCT AAG ACT GG-3') i R16R2 (5'-TGA CGG GCG GTG TGT ACA AAC CCC g-3'), amplifikujące fragment wielkości 1239-bp 16S rDNA.

PCR

W skład 40 µl mieszaniny reakcyjnej wchodzi co następuje: 0,4 µM każdego ze starterów; 200 µM dNTPs; 1 jednostka (Unit) Taq DNA polimerazy (np. AmpliTaq, Applied Biosystems) i 5 µl ekstraktu DNA; w buforze reakcyjnym dostarczonym przez producenta Taq DNA polimerazy. Parametry PCR dla DNA Thermal Cycler 480 (Applied Biosystems): 2 min w 94°C; 35 cykli: 1 min w 94°C, 2 min w 60°C i 3 min w 72°C; następnie końcowa elongacja przez 4 min w 72°C i schłodzenie do 4°C. Jeśli używamy szybszego termocyklera (np. GeneAmp PCR System 9600/ 9700, Applied Biosystems), należy odpowiednio skrócić czas reakcji. Po amplifikacji, 5 –10 µl produktu PCR poddawane jest elektroforezie w 1% żelu agarozowym pod stałym napięciem 90 V, w buforze

TBE według standardowych procedur (Sambrook i wsp., 1989) w obecności drabinki DNA (np. 100 bp-ladder, Fermentas) umożliwiającej ocenę wielkości uzyskanych fragmentów. Produkty PCR są wizualizowane i fotografowane w świetle UV.

Analiza RFLP

Jak wyżej.

Interpretacja wzoru prążków

Fitoplazma identyfikowana jest jako przynależna do grupy AP lub grupy 16SrX jeżeli produkt PCR trawiony *AluI* daje fragmenty wielkości 476, 229, 189, 150, 139 i 56 bp.

PCR specyficzny dla fitoplazm z grupy AP- lub 16SrX (Lorenz i wsp., 1995)

Startery PCR 'forward' i 'reverse' to odpowiednio fO1 (5'-CGG AAA CTT TTA GTT TCA GT-3') i rO1 (5'-AAG TGC CCA ACT AAA TGA T-3'), amplifikujące fragment 16S rDNA wielkości 1071 bp. Startery fO1 i rO1 odpowiadają nukleotydom 65-91 i 1135-1115 sekwencji 16S rDNA żółtaczki astra szczepu OAY (*Oenothera hookeri* MLO, Lim & Sears, 1989).

PCR

W skład 40 µl mieszaniny reakcyjnej wchodzi co następuje: 0,5 µM każdego ze starterów; 100µM dNTPs; 0,2 jednostki (Unit) Taq DNA polimerazy (np. Goldstar polymerase, Eurogentec); 5 µl ekstraktu DNA; w buforze reakcyjnym dostarczonym przez producenta Taq DNA polimerazy. PCR prowadzony jest w cienkościennych probówkach reakcyjnych o objętości 0,2 ml w termocyklerze (np. GeneAmp PCR system 9600, Applied Biosystems) z zachowaniem następujących parametrów: 2 min w 94°C; 40 cykli: 20 s w 95°C, 20 s w 55°C i 1 min w 72°C; następnie końcowa elongacja przez 4 min w 72°C i schłodzenie do 4°C. Po amplifikacji, 10 µl produktu PCR poddawane jest elektroforezie w 1% żelu agarozowym pod stałym napięciem 90 V, w buforze TBE według standardowych procedur (Sambrook i wsp., 1989) w obecności drabinki DNA (np. 100 bp-ladder, Fermentas) umożliwiającej ocenę wielkości uzyskanych fragmentów. Produkty PCR są wizualizowane i fotografowane w świetle UV.

Analiza RFLP

Jak wyżej, z tym wyjątkiem, że enzymy restrykcyjne *SspI* i *SfeI* używane są w osobnych reakcjach.

Interpretacja wzoru prążków

Fitoplazma identyfikowana jest jako *P. mali* jeżeli produkt PCR jest trawiony przez *SspI* w pozycji 419, a przez *SfeI* w pozycji 998.

AP-specyficzny PCR (Jarausch i wsp., 1994, 1995)

Startery PCR 'forward' i 'reverse' to odpowiednio AP5 (5'-TCT TTT AAT CTT CAA CCA TGG C-3') i AP4 (5'-CCA ATG TGT GAA ATC TGT AG-3'), amplifikujące fragment podobny do genu białka nitroreduktazy wielkości 483-bp. Startery AP5 i AP4 odpowiadają stosownie nukleotydom 560-581 i 1042-1023, sklonowanego 1.8 kb fragmentu *P. mali* szczepu AT zdeponowanego w bibliotece danych GenBank pod kodem dostępu L22217.

PCR

W skład 40 μ l mieszaniny reakcyjnej wchodzi co następuje: 0,5 μ M każdego ze starterów; 125 μ M dNTPs; 0,5 jednostki (Unit) Taq DNA polimerazy (np. Replitherm polymerase, Epicentre); 5 μ l DNA; w buforze reakcyjnym dostarczonym przez producenta Taq DNA polimerazy. PCR prowadzony jest w cienkościennych probówkach reakcyjnych o objętości 0,2 ml w termocyklerze (np. GeneAmp PCR system 9600 (Applied Biosystems) z zachowaniem następujących parametrów: 1 min w 95 °C; 40 cykli: 10 s w 95°C, 15 s w 58°C i 45 s w 72°C; następnie końcowa elongacja przez 4 min w 72°C i schłodzenie do 4°C. Po amplifikacji, 10 μ l produktu PCR poddawane jest elektroforezie w 1% żelu agarozowym pod stałym napięciem 90 V, w buforze TBE według standardowych procedur (Sambrook i wsp., 1989) w obecności drabinki DNA (np. 100 bp-ladder, Fermentas) umożliwiającej ocenę wielkości uzyskanych fragmentów. Produkty PCR są wizualizowane i fotografowane w świetle UV.

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