

Diagnostyka Diagnostic

Grapevine flavescence dorée phytoplasma

Zakres

Standard opisuje protokół diagnostyczny dla *Grapevine flavescence dorée phytoplasma*.

Zatwierdzenie i nowelizacja

Zatwierdzony we wrześniu 2005 roku.

Wprowadzenie

Grapevine flavescence dorée phytoplasma (FD) należy do grupy żółtaczk wiązu (16 SrV). Powoduje zespół dolegliwości *Vitis vinifera*, znanych jako żółtaczk winorośli, związanych z obecnością fitoplazm (Caudwell i wsp., 1971). Pomimo, iż dolegliwości te (z których większość związana jest z dystrybucją w obrębie rośliny) charakteryzują się podobną symptomatologią, powodowane są przez różne fitoplazmy należące do sześciu z dwudziestu subkładow wyszczególnionych dotychczas na podstawie identyfikacji molekularnej (Tablica 1) (Boudon-Padieu, 2003, 2005). Inne żółtaczk winorośli występujące w Europie (Tabela 1) są rozpowszechnione na innych żywicielach i nie są uznawane za organizmy kwarantannowe. Rozprzestrzenianie *flavescence dorée* zachodzi poprzez zainfekowany materiał roślinny winorośli oraz przez jej wektory, skoczki *Scaphoideus titanus*.

Tożsamość

Nazwa: *Grapevine flavescence dorée phytoplasma*.

Stanowisko taksonomiczne: *Bacteria, Firmicutes, Mollicutes, Acholeplasmatales, Acholeplasmataceae.*

Tymczasowy takson: Grupa *Phytoplasma Elm Yellows* (EY) lub 16SrV.

Kategoria fitosanitarna: EPPO - lista A2, nr 94; UE - Załącznik II/A2.

Wykrywanie

Objawy choroby

Flavescence dorée można rozpoznać w warunkach polowych dzięki objawom rozwijającym się głównie latem (poczynając od lipca). Dochodzi do żółknięcia bądź czerwienienia liści, w

zależności od odmiany. Zwijają się one w dół i stają się kruche (Ryc. 1–3). Powierzchnia międzyżyłkowa liści może ulegać nekrozie. Pędy wykazują niekompletną lignifikację, a na zielonej korze wzdłuż porażonych gałęzi pojawiają się rzędy czarnych krost; pędy są cienkie, gumowate i zwisają na roślinie. Podczas zimy czernieją i obumierają. Kwiatostany wysychają i odpadają. Dochodzi do obniżenia ilości zawiązujących się owoców. W późniejszym przebiegu infekcji, grona są nieregularne a jagody wiotczeją. Owoce mają zdecydowanie niższą zawartość cukru i wyższą kwasowość w porównaniu ze zdrowymi winogronami. Flavescence dorée pojawia się losowo w winnicach (prawdopodobnie związane jest to z przenoszeniem winorośl-winorośl powodowanym przez wektory). Może występować w podkładkach korzeniowych, nie dając widocznych objawów. Większość odmian winorośli jest podatnych na flavescence dorée. Odmiana ‘Chardonnay’ jest szczególnie podatna i wrażliwa na wszystkie żółtaczkę winorośli, szczególnie zaś flavescence dorée.



Ryc. 1 Liście winorośli odm. Chardonnay porażone flavescence dorée prezentują typowe żółknięcie blaszki liściowej i zwijanie się brzegów. Liście prezentują trójkątny kształt [zdjęcie dzięki uprzejmości Dr Federico Bondaz, Plant Protection Unit of Val d’Aosta region (IT)].

Tabela 1

Bieżący stan charakterystyki molekularnej, biologia i wektory fitoplazm powodujących żółtaczkę winorośli (Boudon-Padieu, 2003, 2005)

| Żółtaczkę winorośli | Nazwa fitoplazmy | Grupa rybosomalna (podgrupa) | Znany owadzi wektor przenoszący chorobę na winorośl | Preferowane przez wektor rośliny żywicielskie | Występowanie |
|--|--|------------------------------|---|---|---|
| Flavescence dorée | FD | 16SrV (-C, -D) lub EY | <i>Scaphoideus titanus</i> Ball | <i>Vitis</i> sp. | Francja, Włochy, Hiszpania, Serbia, Słowenia, Szwajcaria Niemcy |
| Palatinate grapevine yellows | PGY | 16SrV lub EY | <i>Oncopsis alni</i> Schrank | <i>Alnus glutinosa</i> L. | Niemcy |
| Bois noir, Legno nero, Vergilbungskrankheit Schwarzholzkrankheit | stołbur | 16SrXII-A lub stołbur | <i>Hyalesthes obsoletus</i> Sign | <i>Convolvulus arvensis</i> L. <i>Urtica dioica</i> L., <i>Ranunculus</i> , <i>Solanum</i> , <i>Lavandula</i> | Europa, Izrael, Liban |
| Australian grapevine yellows | <i>Candidatus</i> Phytoplasma australiense | 16SrXII-B | ND | ND | Australia |
| Australian grapevine yellows | <i>Candidatus</i> Phytoplasma australasia | 16SrII FBP | ND | ND | Australia |
| Buckland valley grapevine yellows (Aus) | BVGY | Związana z 16SrI lub AY- | ND | ND | Australia |
| grapevine yellows | Aster yellows | 16SrI (-B, -C) lub AY | ND | ND | Włochy, Chile |
| North American grapevine yellows (NAGY) | Virginia grapevine yellows I (VGY I) | 16SrI-A lub AY | ND | ND | Virginia (UA) |
| | Western X Virginia grapevine yellows III (VGYII) | 16SrIII-I lub WX | ND | ND | Nowy York (US) Virginia (US) |



Ryc. 2 Liście winorośli odm. Bellone porażone fitoplazmami stołburu. Objawy są nie do odróżnienia od tych obserwowanych na winoroślach porażonych przez flavescence dorée. Przeprowadzenie molekularnej diagnozy jest jedyną drogą rozróżnienia fitoplazm należących do różnych grup [fotografia dzięki uprzejmości Dr Federico Bondaz, Plant Protection Unit of Val d'Aosta region (IT)].



Ryc. 3 Liście czerwonej odmiany winorośli porażone przez flavescence dorée wykazujące skręcanie i czerwienienie blaszki liściowej. Objawy często obecne są na pojedynczym pędzie rośliny [fotografia dzięki uprzejmości Dr Federico Bondaz, Plant Protection Unit of Val d'Aosta region (IT)].

Identyfikacja flavescence dorée *Sensu stricto*

Badania biologiczne

Badanie biologiczne zaproponowana przez OEPP/EPPO (1994) nie jest wystarczające do wiarygodnej lub specyficznej detekcji bądź identyfikacji flavescentiae dorée i nie jest już dłużej zalecana.

Badania serologiczne

W celu wykrycia flavescentiae dorée w wektorze (Boudon-Padieu i wsp., 1989) oraz winorośli (Caudwell & Kuszala, 1992; Kuszala wsp., 1993; Kuszala, 1996), stosowany był test ELISA z użyciem przeciwciał poliklonalnych i monoklonalnych, jednak metoda ta bazowała na przeciwciałach, które nie są dostępne komercyjnie. W praktyce została zastąpiona przez PCR, który ma szerokie zastosowanie, jest specyficzny i czuły.

Metody molekularne

Mogą być stosowane dwie metody, z których pierwsza posiada dwa warianty. W pierwszej z metod, po bezpośrednim PCR (direct PCR) ze starterami ogólnymi do amplifikacji fitoplazmatycznego 16S rDNA przeprowadzany jest nested PCR z użyciem starterów specyficznych dla danej grupy (a), lub nested PCR z użyciem drugiej ogólnej pary starterów (b). W tym drugim przypadku, produkt amplifikacji można poddać analizie RFLP w celu identyfikacji sprawczej fitoplazmy. Drugą z metod to badanie multiplex nested-PCR, które umożliwia bezpośrednią identyfikację fitoplazm w grupach żółtaczki wiązu (16SrV) (Flavescentiae dorée) oraz stołburu (16SrXII) (Bois noir), dwóch głównych żółtaczek winorośli obecnych w Europie (c). Metody te opisane zostały w Załączniku 1.

Materiały odniesienia

Institut national de la recherche agronomique, Equipe phytoplasmes, UMR PME, INRA, BP 86510, 21065 DIJON Cedex, France.

Institut national de la recherche agronomique, UMR GDPP Bordeaux, BP 81, 33883 VILLENAVE D'ORNON Cedex, France.

Raport i dokumentacja z badań

Wytyczne odnośnie raportów i dokumentacji z badań zawarte są w Standardzie EPPO PM7/77 *Documentation and reporting on a diagnosis*.

Dodatkowe informacje

Dodatkowe informacje dotyczące tego organizmu można uzyskać od:

Dr E. Boudon-Padieu, Institut national de la recherche agronomique, Equipe phytoplasmes, UMR PME, INRA, BP 86510, 21065 DIJON Cedex, France.

Dr G. Pasquini, CRA-Istituto Sperimentale per la Patologia Vegetale, Via C.G. Bertero 22, 00156 Rome, Italy.

Podziękowania

W oryginalnym protokół ten został napisany dla EPPO przez Dr Paola Del Serrone, Istituto Sperimentale per la Patologia Vegetale, Rome (IT).

Materiały źródłowe¹

- Ahrens U & Seemüller E (1992) Detection of plant pathogenic mycoplasma-like organisms by a polymerase chain reaction that amplifies a sequence of the 16S rRNA gene. *Phytopathology* **82**, 828–832.
- Angelini E, Clair D, Borgo M, Bertaccini A & Boudon-Padieu E (2001) Flavescence dorée in France and Italy – Occurrence of closely related phytoplasma isolates and their near relationships to Palatinate grapevine yellows and an alder yellows phytoplasma. *Vitis* **40**, 79–86.
- Berges R, Rott M & Seemüller E (2000) Range of phytoplasma concentrations in various plant hosts as determined by competitive polymerase chain reaction. *Phytopathology* **90**, 1145–1152.
- Boudon-Padieu E, Larrue J & Caudwell A (1989) ELISA and dot-blot detection of flavescence dorée-MLO in individual leaf hopper vectors during latency and inoculative state. *Current Microbiology* **19** (6), 357–364.
- Boudon-Padieu E (2003) The situation of Grapevine yellows and current research directions: distribution, diversity, vectors, diffusion and control. *14th Meeting of the ICVG. Locorotondo (BARI), Italy. 12–17 Sept. 2003. Extended abstracts session 3*, 47–53. <http://www.agr.uniba.it/ICVG2003/> (accessed on 2007-09-07).
- Boudon-Padieu E (2005) Phytoplasmes de la vigne et vecteurs potentiels/ Grapevine phytoplasmas and potential vectors. *Bulletin O.I.V.* **78** (891–892), 299–320.
- Boudon-Padieu E, Béjat A, Clair D, Larrue J, Borgo M, Bertotto L *et al.* (2003) Grapevine yellows: comparison of different procedures for DNA extraction and amplification for routine diagnosis of phytoplasmas in grapevine. *Vitis* **42** (3), 141–149.
- Caudwell A, Giannotti J, Kuszala C & Larrue J (1971) Etude du rôle des particules de type ‘Mycoplasme’ dans l’étiologie de la Flavescence dorée de la vigne. Examen cytologique des plantes malades et des cicadelles infectieuses. *Annales de Phytopathologie* **3**, 107–123.
- Caudwell A & Kuszala C (1992). Mise au point d’un test ELISA sur les tissus de vignes atteintes de Flavescence dorée. *Research in Microbiology* **143**, 791–806.
- Clair D, Larrue J, Aubert G, Gillet J, Cloquemin G & Boudon-Padieu E (2003) A multiplex nested-PCR assay for sensitive and simultaneous detection and direct identification of phytoplasma in the Elm yellows group and Stolbur group and its use in survey of grapevine yellows in France. *Vitis* **42**, 151–157.
- Constable FE, Gibb KS & Symons RH (2003) Seasonal distribution of phytoplasmas in Australian grapevines. *Plant Pathology* **52**, 267–276.
- Daire X, Clair D, Reinert W & Boudon-Padieu E (1997) Detection and differentiation of grapevine yellows phytoplasmas belonging to the elm yellows group and the stolbur subgroup by PCR amplification of nonribosomal DNA. *European Journal of Plant Pathology* **103**, 507–514.
- Davis RE, Dally EL, Gundersen DE, Lee IM & Habili N (1997) ‘*Candidatus* phytoplasma australiense’, a new phytoplasma taxon associated with Australian grapevine yellows. *International Journal of Systematic Bacteriology* **47**, 262–269.
- Deng S & Hiruki C (1991) Amplification of 16S rRNA genes from culturable and non-culturable mollicutes. *Journal of Microbiological Methods* **14**, 53–61.
- Doyle JJ & Doyle JI (1990) Isolation of plant DNA from fresh tissue. *Focus* **12**, 13–15.

¹ Została zachowana oryginalna pisownia (przyp. tłum.)

- Gibb K, Padovan AC & Mogen BD (1995) Studies on sweet potato little-leaf phytoplasma detected in sweet potato and other plant species growing in northern Australia. *Phytopathology* **85**, 169–174.
- Kollar A, Seemüller E, Bonnet F, Saillard C & Bové JM (1990) Isolation of the DNA of various plant pathogenic Mycoplasma-like organisms from infected plants. *Phytopathology* **80**, 233–237.
- Kuszala C (1996) Influence du milieu d'extraction sur la détection du Bois noir et de la Flavescence dorée de la vigne, par des anticorps poly et monoclonaux dirigés contre les phytoplasmes du stolbur et de la Flavescence dorée. *Agronomie* **16**, 355–365.
- Kuszala K, Cazelles J, Boulud J, Credi R, Granata G, Kriel G *et al.* (1993) Contribution à l'étude des jaunisses de la vigne dans le monde. Prospection par test ELISA spécifique du mycoplasma-like organism (MLO) de la Flavescence dorée. *Agronomie* **13**, 929–933.
- Lee IM, Bertaccini A, Vibio M & Gundersen DE (1995) Detection of multiple phytoplasmas in perennial fruit trees with decline symptoms in Italy. *Phytopathology* **85**, 728–735.
- Maixner M, Reinert W & Darimont H (2000) Transmission of grapevine yellows by *Oncopsis alni* (Schantz) (Auchenorrhyncha: Macropsinae). *Vitis* **39**, 83–84.
- Marzachi C, Alma A, d'Aquilio M, Minuto G & Boccardo G (1999) Detection and identification of phytoplasmas infecting cultivated and wild plants in Liguria (Italian Riviera). *Journal of Plant Pathology* **81** (2), 127–136.
- OEPP/EPPO (1994) EPPO Standards PM 3/57. Mycoplasma-like organisms in fruit trees and grapevine. Inspection and test methods. *Bulletin OEPP/EPPO Bulletin* **24**, 339–342.
- Padovan AC, Gibb KS, Bertaccini A, Vibio M, Bonfiglioli RE, Magarey PA *et al.* (1995) Molecular detection of the Australian grapevine yellows phytoplasmas and comparison with grapevine yellows phytoplasmas from Italy. *Australian Journal of Grape and Wine Research* **1**, 25–31.
- Palmano S (2001) A comparison of different phytoplasma DNA extraction methods using competitive PCR. *Phytopathologia mediterranea* **40**, 99–107.
- Schneider B, Cousin MT, Klinkong S & Seemüller E (1995) Taxonomic relatedness and phylogenetic positions of phytoplasmas associated with disease of faba bean, sunhemp, sesame, soybean and eggplant. *Zeitschrift für Pflanzenkrankheiten und Pflanzenschutz* **102**, 225–232 (in German).

Załącznik 1

Metody molekularne

Próbobranie

Miano fitoplazm jest zazwyczaj niskie w zdrewniałych roślinach żywicielskich (Berges i wsp. 2000) i jest różne w winorośli w zależności od organu oraz sezonu (Constable i wsp., 2003). Próby powinny być pobierane w okresie od lipca do września, a pobierane liście powinny wykazywać objawy, ale wciąż winny być w dobrej kondycji (bez obszarów nekrotycznych) i nie powinny być porażone przez inne agrofagi. Należy pobierać losowo co najmniej 20 liści z rośliny, z których wydzielić należy nerwację (do całkowitej wagi ok 1,5 g). Materiał używany do badań diagnostycznych powinien być świeży, lub roztarty w ciekłym azocie i przechowywany w temperaturze maksymalnej -20°C (lub niżej, w zależności od okresu przechowywania, np. -80°C przez okres dłuższy niż dwa lata).

Ekstrakcja DNA

Opracowano i porównano kilka metod (Palmano, 2001; Boudon-Padieu i wsp. 2003). Dwie metody opisano poniżej. W pierwszej z nich dokonuje się rozbicia tkanki oraz wstępnego 'wzbogacenia' (Ahrens & Seemüller, 1992) a następnie dokonywana jest ekstrakcja DNA zgodnie z metodą Doyle & Doyle (1990) nieznacznie zmodyfikowaną przez Marzachi i wsp., 1999. Druga, szybsza metoda, polega na miażdżeniu tkanki winorośli w buforze CTAB. Pierwotnie stosowano Tris i CTAB do ekstrakcji kwasów nukleinowych z barwinka w niższym stężeniu (Kollar i wsp., 1990), jednak 3% stężenie CTAB w 1M Tris (Boudon-Padieu i wsp., 2003) okazało się być optymalnym dla winorośli i innych zdrewniałych roślin, które zawierają duże ilości związków fenoli, tanin i kwasów.

Zmodyfikowana procedura izolacji i ekstrakcja DNA fitoplazm

Procedura ta została zwalidowana podczas porównań międzylaboratoryjnych zorganizowanych we Włoszech w celu ustalenia ogólnego protokołu ekstrakcji DNA z winorośli.

Zmiażdżyć 1,5 g świeżej tkanki pochodzącej z unerwienia w sterylnym schłodzonym móżdżerku i utrzeć z dodatkiem 7–8 ml przygotowanego na świeżo (patrz Załącznik 2) phytoplasma grinding buffer (PGB) oraz 50 mg sterylnego piasku kwarcowego (Sigma, cod. S9887). Inkubować 10–15 min w lodzie. Dodać kolejne 5 ml PGB i dokładnie shomogenizować. Przenieść do 15 ml probówek (Corex) i wirować w schłodzonym wcześniej rotorze (Beckman JA 20) w 5000 rpm przez 5 min (4°C). Przenieść supernatant do czystej schłodzonej probówki Corex. Wirować w 19 000 rpm przez 20 min (Beckman JA 20). Osuszyć osad a następnie zawiesić go w 2 ml 3% buforu CTAB (patrz Załącznik 2), ogrzanego do 60°C. Inkubować 10–20 min w 60 °C delikatnie mieszając. Przenieść 1 ml do 2 ml czystej probówki Eppendorf i wyizolować DNA dodając 1 ml mieszaniny chloroform:izoamyl alkohol (24:1). Wymieszać i wirować w 6000 rpm przez 10 min. Zebrać fazę wodną i umieścić ją w czystej probówce Eppendorf. Dodać 1 ml schłodzonego izopropanolu i inkubować 5 min w lodzie. Wirować w 12 000 rpm przez 20 min, usunąć supernatant a osad przemyć 1 ml 70% etanolu. Wirować w 12 000 rpm przez 10 min i osuszyć osad. Ponownie zawiesić osad DNA w 400 µl TE (patrz Załącznik 2) i strącać w 900 µl 95 % etanolu i 40 µl 3 M octanu sodu pH 5,2 w –80°C przez 40 min lub w –20 °C przez noc. Wirować w 12 000 rpm przez 20 min, usunąć supernatant a osad przemyć 1 ml 70 % etanolu. Wirować w 12 000 rpm przez 10 min a następnie zawiesić osad w 100 µl TE lub dH₂O. Alternatywnie do ekstrakcji DNA można użyć komercyjnie dostępnych kitów (np. DNeasy, Qiagen).

Procedura CTAB ekstrakcji kwasów nukleinowych (Boudon-Padieu i wsp., 2003)

Metoda ta uznana została w porównaniach za prawie tak wydajną jak metoda opisana powyżej (Boudon-Padieu i wsp., 2003), jednak jest ona dużo szybsza i nie wymaga wielokrotnego strącania. Kwasy nukleinowe mogą być izolowane zarówno ze świeżych jak i mrożonych (–20°C lub –80°C) tkanek (najlepiej użyłkowanie lub ogonki) winorośli.

Zmiażdżyć 1 g tkanki w 7 ml buforu ekstrakcyjnego w temperaturze pokojowej, przy użyciu urządzenia zaopatrzonego w łożysko kulkowe (ball-bearing apparatus). Przenieść 1 ml zawiesiny do probówki Eppendorf i inkubować przez 20 min w 65 °C. Następnie dodać jednakową objętość chloroformu. Przenieść fazę wodną i wytrącić kwasy nukleinowe dodając jednakową objętość schłodzonego izopropanolu. Wirować w celu uzyskania precypitatu, przemyć osad 70 % etanolem, osuszyć i rozpuścić w 150 µl buforu TE.

Amplifikacja

a) *Ogólny direct PCR z następującym po nim nested PCR specyficznym dla określonej grupy*

- **Ogólny direct PCR**

Zalecane są startery P1/P7 (Deng & Hiruki, 1991; Schneider i wsp., 1995), o następujących sekwencjach:

P1: 5'-AAG AGT TTG ATC CTG GCT CAG GAT T-3'

P7: 5'-CGT CCT TCA TCG GCT CTT-3'

Startery te amplifikują gen 16S na całej długości oraz wewnątrzgenowy 16S–23S i małą część genu 23S rRNA.

Skład mieszaniny reakcyjnej jest następujący: 10X PCR bufor 5 µl; 25 mM MgCl₂ 3 µl, 10 mM dNTPs 4 µl; starter P1 20 µM 1 µl; starter P7 20 µM 1 µl; Taq polimeraza 5 U µl⁻¹ 0,3 µl; ekstrakt DNA 2 µl rozcieńczony 1:10; uzupełnić wodą do 50 µl.

PCR prowadzony jest następująco: 1 cykl w 95°C przez 3'; 35 następujących cykli: 94°C przez 1 min, 50 °C przez 2 min; 72 °C przez 3 min; końcowa elongacja 72 °C przez 5 min.

Krok ten potwierdza obecność fitoplazmy.

- **Nested PCR ze starterami specyficznymi dla grupy 16SrV**

Etap ten wymaga użycia specyficznych starterów R16(V)F1 i R16(V)R1 (Lee i wsp., 1995), o następujących sekwencjach:

R16(V)F1: 5'-TTA AAA GAC CTT CTT CGG-3'

R16(V)R1: 5'-TTC AAT CCG TAC TGA GAC TAC C-3'

Skład mieszaniny reakcyjnej i cykle PCR są takie jak dla direct PCR, z zastosowaniem nowych starterów w takich samych ilościach. DNA dostarczane jest jako 2,0 µl produktu P1/P7 PCR, rozcieńczonego 1:40. Produkt wizualizowany jest w 1,0% żelu agarozowym barwionym bromkiem etydyny.

Jeśli to konieczne, w celu rozróżnienia grapevine flavescence dorée *sensu stricto* od innych fitoplazm należących do tej samej grupy (grupa żółtaczk wiązu), w szczególności Palatinate grapevine yellows, można przeprowadzić analizę RFLP, używając enzymu *Bfa I*.

b) *Ogólny direct PCR z następującym po nim ogólnym nested PCR i analizą RFLP*

Po pierwszym ogólnym PCR ze starterami P1 i P7 jak opisano powyżej, uzyskany produkt amplifikacji jest rozcieńczony 1:100 i używany jako matryca w procedurze nested PCR, ze starterami fU5 i rU3 (Lorenz i wsp., 1995) lub ze starterami 16r758f (Gibb i wsp., 1995) i M23Sr (Padovan i wsp., 1995) o następujących sekwencjach:

fU5: 5'-CGG CAA TGG AGG AAA CT-3'

rU3: 5'-TTC AGC TAC TCT TTG TAA CA-3'

16f758f: 5'-GTC TTT ACT GAC GCT GAG GC-3'

M23Sr: 5'-TAG TGC CAA GGC ATC CAC TGT G-3'

Warunki PCR są następujące:

Mieszanina reakcyjna: 0,5 µM każdego ze starterów, 0,25 mM każdego dNTP, 1,5 U Appligen *Taq* polimerazy oraz bufor dostarczony wraz z enzymem, 1 µl rozcieńczonego produktu pierwszego PCR, w całkowitej objętości reakcji 25 µl.

Amplifikacja prowadzona jest przez 35 cykli w warunkach wyszczególnionych w Tabeli 2.

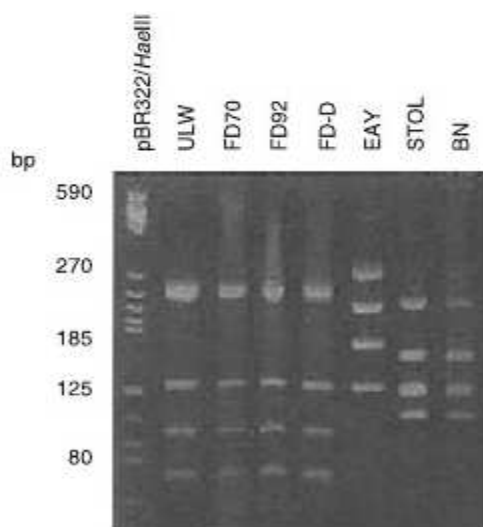
Produkty PCR są następnie poddawane cięciu enzymami restrykcyjnymi w celu identyfikacji przynależności do określonej grupy lub podgrupy.

Tabela 2 Warunki amplifikacji dla ogólnego direct PCR, po którym następuje ogólny nested PCR i analiza RFLP.

| Para starterów | Predenaturacja | Denaturacja | Annealing | Elongacja | Końcowa elongacja |
|----------------|----------------|-------------|------------|------------|-------------------|
| fU5/rU3 | 92°C 120 s | 92°C 30 s | 57°C 30 s | 72°C 50 s | ” |
| 16r758f/M23Sr | 92°C 120 s | 92°C 60 s | 50°C 120 s | 72°C 180 s | ” |

Analiza RFLP amplikonu fU5/rU3 w celu określenia przynależności fitoplazmy do określonej grupy

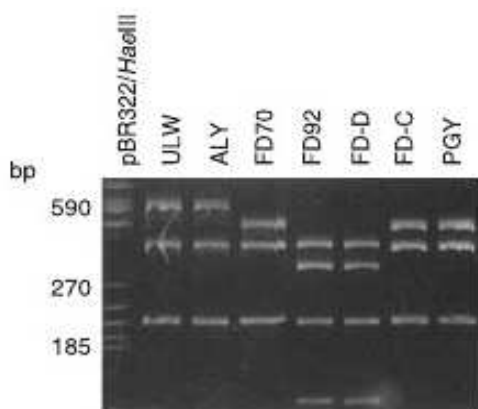
Od pięciu do 20 µl produktu amplifikacji fU5/rU3 poddawane jest hydrolizie z użyciem enzymu restrykcyjnego *Tru9I* w temperaturze 65°C, zgodnie z zaleceniami producenta. Produkty cięcia poddawane są elektroforezie w 10 % żelu akrylamidowym a rozmiar produktu określany jest za pomocą drabinki MW ladder *pBR 322/HaeIII* (Appligene) (Ryc. 4)



Ryc. 4 Analiza RFLP w żelu poliakrylamidowym (10 %) fragmentów fitoplazmatycznego rDNA fU5/rU3 powstałych po cięciu enzymem restrykcyjnym *Tru9I*. Ścieżki: pBR322/*HaeIII*, drabinka Appligene; ULW, żółtaczka wiązu (izolat z Francji, Morvan); FD70 i FD92, referencyjne izolaty FD z Francji; FD-D i FD-C, FD izolaty z Włoch (FD92 oraz FD-D do dziś są podobne pod każdym względem); EAY, Eastern aster yellows; STOL, stołbur; BN, winorośl porażona przez Bois noir (fitoplazmę stołburu).

Analiza RFLP amplikonu 16r758f/M23Sr w celu identyfikacji do podgrupy 16SrV

Produkt PCR 16r758f/M23Sr poddawany jest analizie RFLP przy użyciu enzymu *TaqI* a produkt trawienia wizualizowany jest poprzez rozdzielanie elektroforetyczne w 10% żelu akrylamidowym lub w 3% żelu agarozowym, barwionym bromkiem etydyny (Angelini i wsp., 2001) (Fig. 5). Wielkość produktów określana jest przy użyciu MW ladder *pBR 322/HaeIII* (Appligene).



Ryc. 5 Analiza RFLP w żelu poliakrylamidowym (10%) fragmentów rDNA 16r758f/M23Sr po cięciu enzymem restrykcyjnym *TaqI*. Ścieżki: pBR322/*HaeIII*, drabinka Appligene; ULW, żółtaczkę wiązu (izolat z Francji, Morvan); ALY, żółtaczkę olchy (izolat z Włoch, Marcone); FD70 i FD92, FD referencyjne izolaty z Francji; FD-D oraz FD-C, FD izolaty z Włoch (FD92 i FD-D do dziś są podobne pod każdym względem); PGY, Palatinate grapevine yellows (izolat PGY-A, Maixner), przenoszony w sposób naturalny z olchy na winorośl przez *Oncopsis alni* (Maxiner i wsp. 2000).

c) *Multiplex nested-PCR dla jednoczesnej detekcji FD i BN*

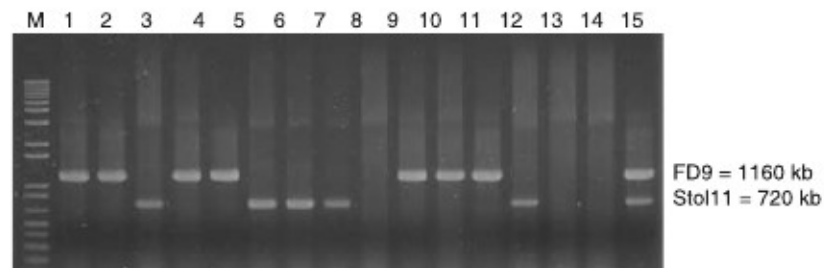
Ta bi-specyficzna procedura multiplex nested-PCR stworzona została (Clair i wsp., 2003) by amplifikować jednocześnie dwa nierybosomalne fragmenty DNA, wielkości 1150 bp oraz 720 bp, które są specyficzne odpowiednio dla grupy żółtaczek wiązu (16SrV) oraz fitoplazm z grupy stołburu (16SrXII). Fitoplazmy w grupach 16SrV i 16SrXII są następnie identyfikowane na podstawie wielkości uzyskanych prążków otrzymanych w rozdziale elektroforetycznym produktów amplifikacji. Metoda ta jest oficjalnie stosowaną we Francji (JORF N°112, 14 Maja, 2004, p. 08635). Analiza RFLP produktów FD9 umożliwia charakterystykę subgrup w obrębie grupy 16Sr V. Sekwencje starterów do amplifikacji fragmentów nierybosomalnego DNA FD9 i STOL11 wyszczególnione są w Tabeli 3.

Tablica 3 Sekwencje starterów do amplifikacji nierybosomalnych fragmentów DNA FD9 oraz STOL11

| Nazwa starterów | Sekwencja | bp | Materiał źródłowy | Wielkość fragmentu |
|-----------------|---------------------------------|----|------------------------|--------------------|
| FD9f1 | 52-GAATTAGAAGCTGTTTGAAGACG-32 | 22 | Daire i wsp. (1997) | 1300 bp |
| FD9r1 | 5'-TTTGCTTTCATATCTTGTATCG-3' | 22 | Daire i wsp. (1997) | |
| STOL11f2 | 5'-TATTTTCCTAAAATTGATTGGC-3' | 22 | Daire i wsp. (1997) | 830 bp |
| STOL11r1 | 5'-TGTTTTTGCACCGTTAAAGC-3' | 20 | Daire i wsp. (1997) | |
| FD9f3b | 5'-TAATAAGGTAGTTTTATATGACAAG-3' | 25 | Clair i wsp. (2003) | 1150 bp |
| FD9r2 | 5'-GACTAGTCCC GCCAAAAG-3' | 18 | Angelini i wsp. (2001) | |
| STOL11f3 | 5'-ACGAGTTTTGATTATGTTCAC-3' | 21 | Clair i wsp. (2003) | 720 bp |
| STOL11r2 | 5'-GATGAATGATAACTTCAACTG-3' | 21 | Clair i wsp. (2003) | |

Skład mieszaniny reakcyjnej do bezpośredniego PCR jest następujący: wyizolowane DNA 1 µl, każdy dNTP 150 µM, starter FD9f1/r1 0,375 µM, starter STOL11f2/r1 0,0625 µM, bufor Tris-HCl pH 9,0 10 mM, MgCl₂ 2,5 mM, KCl 50 mM, Triton X100 0,1 %, BSA 0,2 mg ml⁻¹, Taq Polimeraza (Q. Biogene) 0,2 U w końcowej objętości 20 µl. Skład mieszaniny reakcyjnej do Nested-PCR jest następujący: wyizolowane DNA 1 µl (1:1000 produkt pierwszej amplifikacji), każdy dNTP 150 µM, starter FD9f3b/r2 0,375 µM, starter STOL11f3/r2 0,375 µM, bufor Tris-HCl pH 9,0 10 mM, MgCl₂ 2,5 mM, KCl 50 mM, Triton X100 0,1 %, BSA 0,2 mg ml⁻¹, Taq Polimeraza (Q. Biogene) 0,2

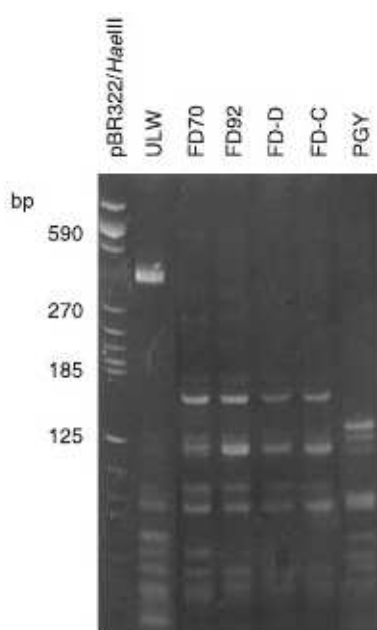
U w końcowej objętości 20 μ l. Warunki PCR: Predenaturacja 92°C przez 90 s, następnie 30 cykli dla pierwszego PCR lub 35 cykli dla nested PCR, z denaturacją 92°C przez 40 s, hybrydyzacją 55°C przez 40 s, elongacją 72°C przez 70 s. Rozdział produktów amplifikacji podczas elektroforezy w 1,2 % żelu agarozowym, wizualizacja w świetle UV po wybarwieniu bromkiem etydyny (Fig. 6).



Ryc. 6 Elektroforeza w żelu agarozowym produktów amplifikacji uzyskanych w reakcji Multiplex-nested PCR dla *flavescence dorée* oraz bois noir (BN), detekcja w winoroślach. Ścieżka M: 1 kb drabinka. Ścieżka 1–13: podejrzane o infekcję GY winorośle różnych odmian (FD: ścieżka 1, 2, 4, 5, 10–12; BN: ścieżka 3, 6, 7, 8, 13; próbka podwójnie negatywna: ścieżka 9). Ścieżka 14: ekstrakt zdrowej winorośli. Ścieżka 15: wodna kontrola. Ścieżka 16: podwójnie zainfekowany FD+stolbur (BN) barwinek (D. Clair, INRA Dijon (FR), według Clair i wsp., 2003).

Analiza RFLP produktów amplifikacji pary starterów FD9 w celu charakterystyki subgrupy 16SrV

PCR produkt powstały przy użyciu FD9f3b/r2 poddawany jest analizie RFLP z użyciem enzymu *Tru9I*, którego produkt wizualizowany jest następnie po elektroforezie w 10% żelu akrylamidowym lub w 3% żelu agarozowym, wybarwionym bromkiem etydyny (Angelini i wsp., 2001) (Fig. 7).



Ryc. 7 Żel poliakrylamidowy (10 %). Analiza RFLP fragmentów FD9 f3b/r2 DNA fitoplazm grupy 16SrV po cięciu enzymem restrykcyjnym *Tru9I*.

Ścieżki: pBR322/*HaeIII*, drabinka Appligene; ULW, żółtaczka wiązu (izolat z Francji, Morvan); FD70 i FD92, izolaty referencyjne FD z Francji; FD-D i FD-C, izolaty FD z Włoch (FD92 i FD-D do dziś są podobne pod każdym względem); PGY, Palatinate grapevine yellows (izolat PGY-A, Maixner), przenoszone w sposób naturalny z olchy na winorośl przez *Oncopsis alni*.

Załącznik 2

Bufory

Phytoplasma grinding buffer (PGB) na 100 ml:

K₂HPO₄ bezwodny - 1,67 g

KH₂PO₄, - 0,41 g

Sacharoza - 10 g

BSA (frac V) - 0,15 g

PVP P.M. 10,000 - 2 g

Kwas askorbinowy - 0,53 g

pH 7,6 przy użyciu kropli KOH.

Trzymać w lodzce do czasu użycia.

3% bufor CTAB:

3% CTAB (cetyl-trimethyl-ammonium bromide) w 1 M Tris-HCl pH8, 10 mM EDTA, 1,4 M NaCl, 0,1 % 2-merkaptoetanol.

Bufor TE

10 mM Tris, 1 mM EDTA, pH 7,6.

| Tłumaczenie z jęz. angielskiego: | Zatwierdził: |
|----------------------------------|--------------------------------|
| Justyna Moszczyńska (GIORiN CL) | Janina Butrymowicz (GIORiN CL) |
| 28.09.2010 | |