

## Diagnostyka<sup>1</sup> Diagnostic

### *Plasmopara halstedii*

#### Zakres stosowania

Niniejszy standard opisuje protokół diagnostyczny dla *Plasmopara halstedii*.<sup>1</sup>

#### Zatwierdzenia i nowelizacje

Zatwierdzony we wrześniu, 2008 roku.

#### Wprowadzenie

Organizm grzybopodobny *Plasmopara halstedii* powodujący mączniaka rzekomego w uprawach słonecznika, znany jest na wszystkich kontynentach świata. Uważa się go za sprawcę ważnej gospodarczo choroby we wszystkich krajach Europy (Sackston, 1981). Ponadto, pojawiły się i rozprzestrzeniają izolaty tolerancyjne na środki grzybobójcze oraz nowe patogeniczne rasy stanowiące zagrożenie dla plantacji słonecznika (Roeckel-Drevet i wsp., 2003).

Do ważnych gospodarzy patogena należą dzikie i uprawne gatunki z rodzaju *Helianthus*, w tym słonecznik (Leppik, 1966; Novotel'nova, 1966), ale odnotowano również ponad 100 gatunków różnego rodzaju należących do rodziny *Asteraceae*. Dzicy gospodarze z rodziny *Asteraceae* (np. gatunki z rodzaju *Helianthus*, *Artemisia*, *Xanthium*, itd.) mogą również występować powszechnie w miejscu produkcji słonecznika, ale ich potencjał, jako rezerwuar patogena nie został jeszcze udowodniony (Viranyi, 1984; Walcz i wsp., 2000).

Organizm ten jest przede wszystkim patogenem odglebowym, ale może być również przenoszony z wiatrem i materiałem siewnym (Basavarju i wsp., 2004).

W regionie EPPO patogen jest obecny, wszędzie tam, gdzie rosną słoneczniki. Więcej informacji na temat jego biologii i epidemiologii można znaleźć w ulotce dla *Plasmopara halstedii* (EPPO/CABI, 1997). Szczegóły dotyczące rozmieszczenia geograficznego znajdują się w EPPO Pest Quarantine Retrieval System (EPPO, 2007).

---

<sup>1</sup> Użyte w standardach EPPO nazwy odczynników lub wyposażenia nie znaczą wykluczenia innych, które również mogą być przydatne.

<sup>2</sup> Numer protokołu EPPO poprawiono z PM7/85 (3) na PM7/85(1) dnia 11.02.2009, po oryginalnej publikacji online.

## Tożsamość

**Nazwa:** *Plasmopara halstedii* (Farlow) Berlese & de Toni

**Synonim:** *Plasmopara helianthi* Novotel'nova

**Stanowisko taksonomiczne:** Oomycetes; *Peronosporales*

**Komputerowy kod EPPO:** PLASHA

**Kategoria fitosanitarna:** II/A2

## Wykrywanie

*P. halstedii* może powodować różnego rodzaju objawy chorobowe w zależności od wieku tkanki liścia, poziomu inokulum, podatności odmiany, warunków środowiska (wilgotność i temperatura). Symptomy zależą od typu infekcji: systemicznej lub miejscowej. Te spowodowane infekcjami systemicznymi należą do bardziej typowych.

Systemicznie porażone rośliny słonecznika mogą mieć zahamowany wzrost. Na liściach tworzą się jasnozielone plamy, które rozciągają się wzdłuż nerwów głównych oraz na całej powierzchni blaszki liściowej (Rys.1). Młode liście silnie porażonych roślin są często całkowicie chlorotyczne, zwijają się, stają się sztywne i grube (Rys.2). W warunkach sprzyjającej wilgotności biała plecha złożona ze sprangioforów i zoosporangiów rozwija się na dolnej stronie liścia, a miejsce ich tworzenia ściśle odpowiada chlorotycznym obszarom na górnej powierzchni liścia. Ze względu na skracanie międzywęźli, porażony słonecznik może mieć wygląd kapusty.

Kwiatostany słoneczników mają zredukowane rozmiary i są uniesione w górę (kwiatostany horyzontalne). Z powodu ograniczonej liczny nasion lub ich braku rentowność porażonych plantacji jest niska. Straty ekonomiczne mogą być znaczne.

System korzeniowy zainfekowanych słoneczników jest słabo rozwinięty, a na ich powierzchni występują ciemnobrązowe plamy. Obserwuje się znaczne ograniczenia w tworzeniu korzeni wtórnych.

Do innych, mniej powszechnych objawów chorobowych towarzyszących infekcji systemicznej należą: ograniczenie kiełkowania nasion, przebarwienia mięszczy łądygi i/lub rdzenia, zaburzenia w rozwoju kwiatostanu, skręcanie liści oraz guzowatość podstawy łądygi (Sackston, 1981). Ponadto, systemiczna infekcja spowodowana przez mączniaka rzekomego może być zlokalizowana w dolnych tkankach łądygi (infekcja kotyledonu czy hypokotyłu (Ljubich & Gulya, 1988; Viranyi & Gulya, 1996)). W warunkach wilgotnych, takie infekcje charakteryzują się występowaniem białego zarodnikowania na liścieniach i łądygach siewek w fazie kotyledonu (Rys.3 i 4).

Mogą również występować miejscowe infekcje liścia z objawami kanciastych plamistości (małe, nieregularne, jasnozielone plamy, ograniczone nerwami). Do infekcji systemicznej (patogen przerasta przez ogonki do łądygi) dochodzi, kiedy warunki środowiska są korzystne, a ryzyko infekcji wysokie (Ratai-Vida, 1996).

Symptomy porażenia przez *P. halstedii* przed owocowaniem słonecznika mogą być mylone z objawami fitotoksyczności powodowanej przez herbicydy. Z kolei, po okresie owocowania, objawy chorobowe mogą wskazywać na porażenie przez *Albugo tragopogonis*, ale w tym przypadku typowe duże nekrotyczne, pęcherzykowate wypukłości tworzą się na górnej stronie liści. Taka deformacja na liściach nie pojawia się przy porażeniu przez *P. halstedii*.



**Rys. 1** Objawy chorobowe powodowane przez *P. halstedii* na plantacji słonecznika. Chloroza liścia, zahamowanie wzrostu i odwrócony kwiatostan.



**Rys. 3** Zarodnikowanie *P. halstedii* na powierzchni sztucznie zakażonych liści słonecznika.



**Rys. 2** Chloroza liści słonecznika – 5-6 dni wcześniej w porównaniu z Rys.3



**Rys. 4** Zarodnikowanie *P. halstedii* u podstawy siewki w warunkach kontrolowanych (fitotron).

## Identyfikacja

*P. halstedii* jest obligatoryjnym, biotroficznym patogenem roślinnym, a morfologiczna identyfikacja jest możliwa tylko w warunkach *in vivo*, na roślinie żywicielskiej. W związku z tym, morfologiczna identyfikacja z nasion i próbek gleby wymaga przeprowadzenia testów biologicznych. Opracowano również metodę molekularną do identyfikacji patogena w materiale siewnym, ale może ona być również dostosowana do identyfikacji struktur rosnących na roślinach (sporangiofory z zoosporangiami). W literaturze opisano również test ELISA

(Bouterige i wsp., 2000), ale w regionie EPPO brakuje doświadczenia w stosowaniu tej metody. Dlatego też test ELISA nie jest metodą rekomendowaną.

Wykrywanie patogena z nasion jest trudne, bowiem poziom infekcji nasion w partii może być bardzo zróżnicowany i czasami bardzo niski ze względu na mieszanie /rozcieńczenie nasion o różnych poziomach infekcji. Testy biologiczne opisane w tej sekcji oraz test molekularny określają liczbę nasion, którą należy poddać pojedynczemu badaniu. Całkowitą liczbę nasion, jaką bada się w celu wykrycia patogena przy różnych poziomach infekcji w partii, należy określić statystycznie [przydatne wskazówki podano w tabeli 2(a) i 2(b) w PM 3/65 (1) Pobieranie próbek z przesyłek do wizualnej kontroli fitosanitarnej OEPP/EPPO (2005)].

## **Test biologiczny**

### *Wykrywanie z nasion*

Wykrywanie z nasion oparte jest na obserwacji oznak zarodnikowania na kiełkujących nasionach w stadium liścienia. Pojawienie się jakichkolwiek innych symptomów, takich jak: zakłócenia wzrostu lub przebarwienia młodych siewek, nie jest specyficzną oznaką porażenia. Ponadto, kluczowe znaczenie dla wykrycia *P. halstedii* ma zapewnienie dobrych warunków wzrostu (temperatura 16-17°C, wilgotność względna od 95 do 100%).

Metoda ta została przedstawiona w załączniku 1.

### *Wykrywanie z gleby*

Test jest zalecany do badania gleby pobranej z podejrzanych pól. Standardowa próbka gleby, minimum 1500 ml/ha powinna zostać pobrana z co najmniej z 100 miejsc/ha, najlepiej po obrysie siatki prostokątnej, nie mniejszej niż 5 m na szerokość i nie większej niż 20 m na długość, między punktami pomiarowymi obejmującymi całe pole. Do testu należy użyć całą objętość próbki. Wykrywanie z gleby oparte jest na zdolności patogena do infekowania młodych siewek słonecznika, kiedy korzenie mają długość 1-2 cm, a gleba jest nasycona wodą. W takich warunkach ruchliwe zoospory migrują przez pory gleby do korzeni (Gulya i wsp., 1997). Stosunkowo prosty i szybki test biologiczny został opracowany dla celów diagnostycznych, w oparciu o metodę Gulya Radi (2002). Próbki gleby z podejrzanego pola powinny być pobrane po okresie wegetacyjnym (najwcześniej późną jesienią) lub przed siewem wiosną następnego roku. Próbki pobiera się z poziomu ryzosfery (do 20 cm), gdzie mogą pozostać potencjalnie porażone resztki roślinne. Wykrywanie z gleby jest oparte na obserwacji obecności zarodnikowania w kiełkujących nasionach w stadium liścienia.

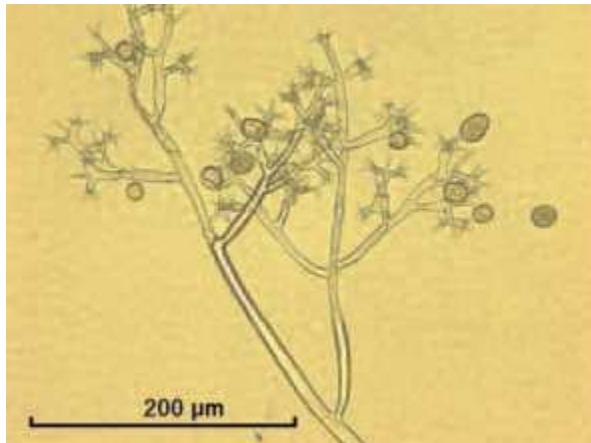
Metoda ta została przedstawiona w załączniku nr 1.

## **Morfologia**

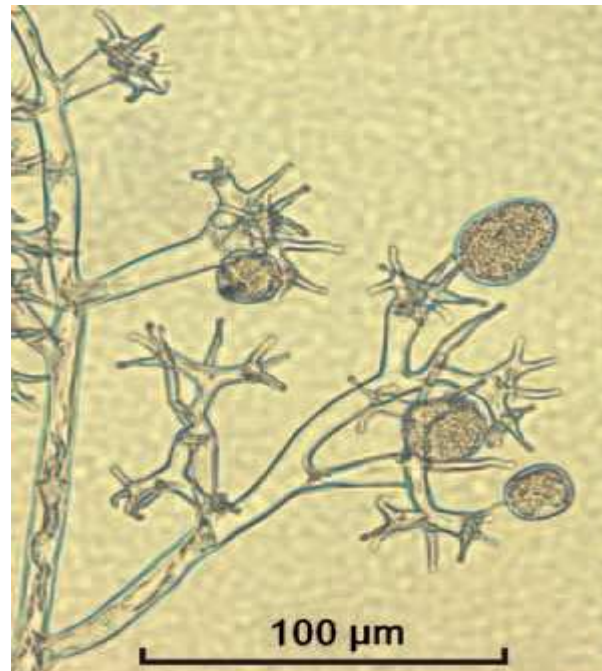
Identyfikacja morfologiczna możliwa jest pod mikroskopem.

### *Grzybnia*

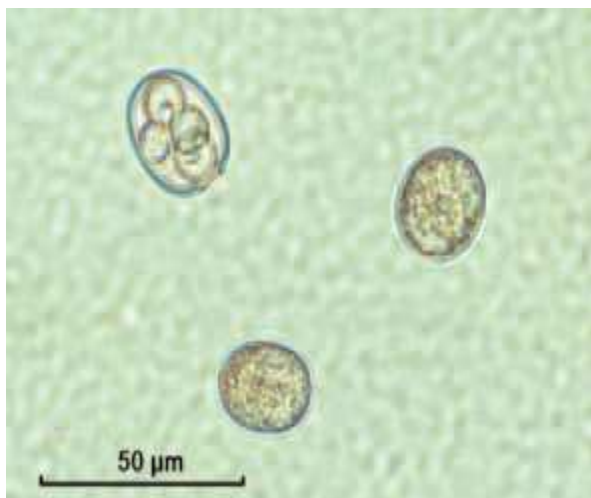
Plechę (grzybnię) stanowią komórczakowe, bezbarwne i niepodzielone strzępki o średnicy od 6 do 20 µm, często nabrzmięte i o nieregularnym kształcie, na których tworzą się okrągłe, pęcherzykowate ssawki (haustoria), o średnicy 5-10 µm, które rosną we wszystkich tkankach roślinnych.



**Rys. 5** Sporangiofory *P. halstedii* z zoosporangiami.



**Rys. 6** Sporangiofory z zoosporangiami.



**Rys. 7** Tworzenie się zoospor *P. halstedii* w zoosporangiach.

### *Sporangiofory*

Sporangiofory tworzą się na dolnej, sporadycznie na górnej stronie liścia, są rozgałęzione (drzewkowate), o długości 300-450 (750)  $\mu\text{m}$   $\times$  7-14  $\mu\text{m}$ , odwrotnie stożkowate lub ostro zakończone u podstawy, rozgałęzione w górnej części, a na końcach odgałęzień zgrubiałe; odgałęzienia tworzą 7-8 okółków. Sporangiofory rozgałęzione w sposób monopodialny, każdy z 2-5 wtórnymi odgałęzieniami o długości 40-86  $\mu\text{m}$ , na szczycie opatrzone 3-5 wyrostkami, o długości 8-15  $\mu\text{m}$  odchodzące pod kątem prostym (Rys. 5 i 6).

### *Zoosporangia (zarodnie pływkowe)*

Zarodnie pływkowe są jajowate do elipsoidalnych, o wymiarach 18-30  $\times$  14-20  $\mu\text{m}$ , z brodawką; kielkując, tworzą 20 dwuwiciowych zoospor o nerkowatym kształcie (Rys. 7).

### *Anterydia*

Anterydia są kształtu maczugowatego, o wymiarach około 12  $\times$  30  $\mu\text{m}$  oraz tworzą się na oddzielnych odgałęzieniach strzępek (*diclinous*).

## *Oogonia*

Oogonia są kuliste, bezbarwne i o średnicy 30-40 µm.

## *Oospory*

Oospory tworzą się we wszystkich organach wegetatywnych rośliny żywicielskiej, szczególnie w korzeniach i liściach; tuż pod epidermą; oospory są kuliste o średnicy (15) -23 - (30) (aplerotyczne); o zabarwieniu żółtobrazowym z lekko pomarszczoną ścianą, o grubości 3 µm. Oospory kiełkują w zarodnie pławkowe (Hall, 1989).

## **Metody molekularne**

Ioos i wsp. (2007) opracowali startery specyficzne (PHAL-F/R) do bezpośredniego wykrywania *P. halstedii* w próbkach nasion słonecznika przy zastosowaniu łańcuchowej reakcji polimerazy (PCR). Metoda ta okazała się specyficzna dla *P. halstedii* bez względu na rasę i pochodzenie geograficzne (22 izolatów) i odróżnia ten gatunek od innych gatunków z rodzaju *Plasmopara* (*Plasmopara viticola*), 14 izolatów z rodzaju *Phytophthora* oraz 15 izolatów grzybów zwykle występujących na nasionach słonecznika.

Próg wykrywalności *P. halstedii* wynikający z niniejszego protokołu oszacowano na 0,15 g zainfekowanych nasion na 35 g nasion w warunkach opisanych przez Ioos i wsp. (2007), ale powinien być interpretowany ostrożnie bowiem limit ten wynika z naturalnie zainfekowanych nasion, w których ogólna zawartość *P. halstedii* w biomacie nie była znana. Niemniej jednak, metoda PCR może dać wyniki fałszywie negatywne w próbkach o niskim poziomie infekcji, ale okazała się bardziej czuła aniżeli testy biologiczne (Ioos i wsp., 2007).

Metoda PCR może zostać zaadoptowana do identyfikacji struktur rosnących na roślinach (sporangiofory i zoosporangia).

Szczegóły metody przedstawiono w załączniku nr 2.

## **Materiały referencyjne**

Patotypy *P. halstedii* oznaczone jako 100, 330, 700, 710 i 730 można uzyskać z kolekcji kultur Uniwersytetu Szent Istvan (Prof. Ferenc VIRANYI Departament Ochrony Roślin, Szent István University 2103 Godollo, Węgry. E-mail: viranyi.ferenc@mkk.szie.hu).

Patotypy *P. halstedii* oznaczone jako 100, 300, 304, 307, 314, 330, 334, 700, 703, 704, 707, 710, 714, 717, 730 są dostępne w kolekcji INRA. ((Dr Denis de Tourvieille Labrouhe (INRA, UMR Doskonaleńia et santé des Plantes Domaine de Crouelle, 234 avenue du Brézet, 63100 Clermont- Ferrand, Francja).

## **Sprawozdawczość i dokumentacja**

Wskazówki dotyczące sprawozdawczości i dokumentacji przedstawiono w standardzie EPPO PM 7/77 (1) *Sprawozdawczość i dokumentowanie wyników badań*.

## Podziękowania

Protokół ten w wersji oryginalnej został przygotowany przez E. Dormanns-Simon & A. Kormany (Plant Protection and Quarantine Laboratory, Węgry) Csongrad County Agricultural Office, Plant Health and Soil Conservation Directorate. Część molekularna protokołu została przygotowana przez R. Ioos, Plant Protection National Laboratory, Unit of Agricultural and Forest Mycology (LNPV-UMAF), Domaine de Pixérécourt Malzéville, France.

## Informacje dodatkowe

Więcej informacji można uzyskać od prof. Ferenc VIRANYI Department of Plant Protection, Szent István Uniwersytet 2103 Gödöllő, Hungary. Zawiesinę bakterii stosowaną jako wewnętrzną kontrolę amplifikacji lub plazmid kontroli pozytywnej można uzyskać u dr R. Ioos, pod warunkiem, że laboratorium ma zgodę na pracę i przechowywanie bakterii genetycznie zmodyfikowanych.

## Materiały źródłowe (zachowana wersja angielska (przyp. tłum.))

- Basavaraju P, Chalubaraju G, Deepak SA, Amrutesh KN & Shetty HS (2004) Location and of downy mildew pathogen *Plasmopara halstedii* in sunflower seeds. *Seed Research* **32**, 108–110.
- Bouterige S, Robert R, Bouchara J-P, Marot-Leblond A, Molinero V & SENET J-M (2000) Production and characterization of two monoclonal antibodies specific for *Plasmopara halstedii*. *Applied and Environmental Microbiology* **66**, 3277–3282.
- EPPO Plant Quarantine Retrieval System (PQR) (2007) Version 4.6. EPPO, Paris (FR).
- EPPO/CABI (1997) *Plasmopara halstedii*. *Quarantine Pests for Europe*, 2nd edn, 900–904. CAB International, Wallingford (GB).
- Gulya TJ & Radi SA (2002) A seedling bioassay to detect the presence of downy mildew in soil. <http://www.sunflowerusa.com/research/researchworkshop/documents/103.pdf>
- Proceedings Sunflower Research Workshop (2003) [last accessed 2008-04-26]
- Gulya TJ, Masirovic JS & Rashid KY (1997) Diseases. In: *Sunflower Technology and Production* (Ed. Schneider AA), Monograph No.35, pp. 263– 379. Amer.Soc.Agronomy. Madison (US).
- Hall G (1989) *Plasmopara halstedii*. Cmi Descriptions of Pathogenic Fungi and Bacteria No.979. CAB International, Wallingford (GB).
- Ioos R & Iancu G (2008) European collaborative studies for the validation of PCR-based detection tests targeting regulated fungi and oomycetes. *Bulletin OEPP/EPP Bulletin* **38**, 198–204.
- Ioos R., Laugustin L., Rose S., Tourvieille J. & Tourvieille de Labrouhe D. (2007) Development of a PCR test to detect the downy mildew causal agent *Plasmopara halstedii* in sunflower seeds. *Plant Pathology* **56**, 209–218.
- Leppik EE (1966) Origin and specialisation of *Plasmopara halstedii* complex in the Compositae. *FAO Plant Protection Bulletin* **14**, 72–76.
- Ljubich A & Gulya TJ (1988) Cotyledon limited systemic downy mildew infection. In *Proceedings of the 1988 Sunflower Research Workshop*, p. 9. National Sunflower Association, Bismarck (US).
- Novotel'nova NS (1966) *Downy Mildew of Sunflower*. USSR, Nauka, Moscow
- OEPP/EPPO (2005) EPPO Standard PM 3/65. *Sampling of Consignments for Visual Phytosanitary Inspection Bulletin OEPP/EPPO Bulletin* **36**, 195–200.

- Ratai-Vida R (1996) New infections of downy mildew of sunflower. *Novenyvedelem* **32**, 533–535. (in Hungarian).
- Roeckel-Drevet P, Tourvieille J, Gulya TJ & Tourvieille de Labrouhe D (2003) Molecular variability of sunflower downy mildew, *Plasmopara halstedii*, from different continents. *Canadian Journal of Microbiology* **49**, 492–502.
- Sackton WE (1981) Downy mildew of sunflower. In: *The Downy Mildews* (Ed. Spencer DE), pp. 545–575. Academic Press, London, UK.
- Sambrook J, Fritsch EF & Maniatis T (1989) *Molecular Cloning: A Laboratory Manual*. Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, New York (US).
- Viranyi F & Gulya TJ (1996) Expression of resistance in the *Plasmopara halstedii* – sunflower pathosystem. In: *Proceedings of the ISA Symposium I, Diseases Tolerance in Sunflower*, pp. 14–21. International Sunflower Association, Beijing (CN).
- Viranyi F (1984) Recent research on the downy mildew of sunflower in Hungary. *Helia* **7**, 35–38.
- Walcz I, Bogár K & Virányi F (2000) Study on an Ambrosia isolate of *Plasmopara halstedii*. *Helia* **23**, 19–24.
- White TJ, Bruns T, Lee S & Taylor J (1990) Amplification and direct sequencing of fungal ribosomal RNA genes for phylogenetics. In: *PCR Protocols: a Guide to Method and Applications* (Eds Innis MA, Gelfand DH, Sninsky JJ & White TJ), pp. 315–322. Academic Press, New York (US).

## **Załącznik 1. Test biologiczny**

### **Wykrywanie z nasion**

Test powinien być wykonany najlepiej w 3 powtórzeniach (po 400 nasion). 400 nasion sterylizuje się powierzchniowo (0,5% NaOCl przez 10 minut, starannie płucze wodą sterylną), zawija w sterylny mokry papier i inkubuje w temp. 20°C do czasu wystąpienia kiełkowania.

Po kiełkowaniu nasiona przenosi się z papieru do pojemników z podłożem nasyconym wodą sterylną (kompost lub piasek). Doniczki umieszcza się na tacy. Nasiona przykrywa się ok. 1 cm warstwą sterylnego podłoża.

Następnie doniczki umieszcza się w fitotronie w temp. 16–18°C i wilgotności względnej od 95% do 100% i owija luźno plastikowymi workami. Od drugiego dnia stosuje się 12 godzinne naświetlanie (5000 luksów) w cyklu 24h. Podłoże powinno być utrzymywane w wilgotności i w temperaturze nieprzekraczającej 18°C.

Po upływie ok. 10 dni, kiedy pojawią się liścienie młode rośliny obserwuje się na obecność zarodnikowania.

Alternatywnym sposobem jest podkiełkowanie nasion poddanych powierzchniowej sterylizacji na szalkach Petriego w tych samych warunkach, jak w pojemnikach z podłożem (16–17°C i wilgotność względna, od 95–100%), chociaż utrzymanie wymaganej wilgotności względnej jest dużo trudniejsze.

Jeśli jedno z powtórzeń jest pozytywne, uznaje się organizm za wykryty.

### **Wykrywanie z gleby**

Każda próbka powinna być umieszczona w pojemnikach na tacy, a gleba zwilżana do momentu, kiedy woda wypłynie na tacę. W każdym pojemniku wysiewa się nasiona słonecznika linii hodowlanych podatnych na porażenie wszystkimi znanymi rasami *P.*



*halstedii* (e.g. HA-89<sup>3</sup> lub Peredovic), (ilość nasion zależy od rozmiaru pojemnika). Należy zapewnić, że użyte do testu nasiona nie są zakażone *P. halstedii*. Nasiona pokrywa się następnie 1 cm warstwą gleby, która utrzymuje się w stałej wilgotności. Do każdej próbki gleby wysiewa się minimum 50 nasion. Pojemniki umieszcza się w fitotronie w temperaturze 16-18°C i wilgotności względnej od 95% do 100% i owija luźno plastikowymi workami. Podczas pierwszych 3 dni temperatura może wzrosnąć do 20°C, w celu przyspieszenia kiełkowania, ale po kiełkowaniu temperatura nie powinna przekroczyć 18°C. Od czwartego dnia stosuje się 12 godzinne naświetlenie (5000 luksów) w cyklu 24h.

Po 2 tygodniach pojawiają się liścienie i następuje szybki wzrost młodych sadzonek. Obserwacja roślin powinna być przeprowadzona około 2 tygodni po siewie, w stadium 2 liścieni, zanim rośliny staną się zbyt wydłużone.

W przypadku, kiedy obserwuje się porażenie młodych roślin, to zarodnikowanie patogena powinno tworzyć się na liścieniach lub w dolnej części łodygi (na poziomie gleby). Liczbę sadzonek wykazujących zarodnikowanie określa się pod mikroskopem. Mogą pojawić się także inne symptomy, takie jak zahamowanie wzrostu i deformacje (ze względu na możliwie niekorzystne warunki), ale wykrycie patogena może tylko być uznane za pozytywne, jeśli obserwuje się zarodnikowanie grzyba. Uwagi do obu testów: w fitotronie zwykle trudno utrzymać niską temperaturę i 100% wilgotności, gdy włączone jest silne naświetlenie.

Niska temperatura (poniżej 18°C) i stałe nasycenie wodą ma zasadnicze znaczenie dla kiełkowania zoospor. Konieczne jest dzienne oświetlenie, ponieważ młode rośliny nie otrzymujące wystarczającej ilości światła rozwijają długie, cienkie łodygi, których nie infekuje patogen.

## **Załącznik 2. Metoda wykrywania z nasion testem PCR**

Metoda ta została w 2007 roku poddana badaniom międzylaboratoryjnym zgodnie z EN ISO 16140, w których uczestniczyło 10 europejskich laboratoriów należących do Europejskiej Sieci Mikologicznej (European Mycological Network). Wspólne badania wykazały, że dokładność, analityczna czułość i selektywność były odpowiednio na poziomie 96,6%, 94,7% i 100%, podczas gdy zgodność (tj. jakościowa powtarzalność, odtwarzalność) badania oszacowano odpowiednio na 97,5% i 87%, (Ioos i Iancu, 2008). Przedmiotowe wyniki pokazały, że metoda spełnia wymagania i jest odpowiednia do badania organizmów regulowanych przepisami.

### **1. Ogólne informacje**

Protokół został opracowany przez Ioos i wsp.(2007) do wykrywania *P. halstedii* w nasionach słonecznika. Docelowym regionem jest 28S rDNA. Sekwencje starterów dla: PHAL-F:5'-TATCTCTAAGTTGCTTATAC-3' i PHAL-R: 5'-AGCATATACAGCACATACG-3'. Wielkość amplikonu wynosi 308 pz.

---

<sup>3</sup> Nasiona słonecznika HA 89 linii podatnej można uzyskać pod adresem: Cereal Research Non-profit Co., Department of Oil Crop Breeding Station, 6775 Kiszombor, Hungary (Mrs Rozalia Nagyne-Kutni)

## 2. Metody

### 2.1. Ekstrakcja i oczyszczanie kwasu nukleinowego

Do testowania próbek nasion słonecznika, podpróbki, każda zawierająca 500 nasion są pobierane losowo i poddawane ekstrakcji DNA. Każda podpróbka po 35 g jest bezpośrednio mielona przez 1 minutę w młynku. Z każdej zmielonej podpróbki, około 500 µl zmielonej mączki (średnio od 90 do 110 mg) przenosi się w warunkach aseptycznych do osobnych, sterylnych 2 ml probówek z 500 µl DNeasy® lysis buffer (Qiagen).<sup>4</sup> Również na tym etapie dodaje się 4 µl RNase dostarczonej przez producenta, 10 µl 10 mg/ml<sup>-1</sup> proteiny K (Sigma-Aldrich, Lyon, France) i 3-4 mg Polyvinylpyrrolidone (PVPP).

DNA genomowe następnie poddaje się ekstrakcji zgodnie z instrukcją producenta, za wyjątkiem etapu inkubacji z zastosowaniem buforu do lizy, który powinien być wydłużony do 20 minut.

W celu uniknięcia kontaminacji krzyżowej pomiędzy próbkami, urządzenie do mielenia powinno być systematycznie sterylizowane po użyciu, poprzez moczenie i czyszczenie świeżo przygotowanym 1-2% roztworem podchlorynu sodu.

Do zbadania struktur rosnących na tkance słonecznika, pobiera się około 100-500 mg plechy/tkanki roślinnej i przenosi w warunkach aseptycznych do sterylnych 2 ml probówek z 400 µl DNeasy® lysis buffer (Qiagen).<sup>4</sup> Mieszaninę rozciera się przez dwie minuty z dwiema 3 mm sterylnymi kulkami ze stali nierdzewnej przy częstotliwości 30 Hz, w aparacie (Tissuelyser, Qiagen lub zamiennik). Następnie genomowe DNA ekstrahuje się zgodnie z instrukcją producenta.

### 2.2. Łańcuchowa reakcja polimerazy

**2.2.1 Master mix PCR** stanowi 20 µl mieszaniny, która zawiera 1xTag DNA polymerase buffer (Invitrogen, Cergy Pontoise, France), 2 mM MgCl<sub>2</sub>, 0,45 µM każdego startera PHAL-F i PHAL-R, 150 µM dNTPs, 0,8 µg µL<sup>-1</sup> Bovine Serum Albumin (BSA), 0,5 jednostki Tag DNA Polimerazy (Invitrogen), około 50 kopii wewnętrznej kontroli amplifikacji (IAC), 2 µl matrycy DNA (40-60 ng) i wodę do biologii molekularnej, którą uzupełnia się mieszaniną do objętości 20 µl. Można stosować różne wewnętrzne kontrole amplifikacji (Internal Amplification Control). Przedmiotowa kontrola jest przygotowana z genomowego DNA *Populus trichocarpa* x *P.deltoides* cv Beaupre i można ją uzyskać od R. Ioos (adres znajduje w sekcji podziękowania). Amplifikacja IAC ze starterami PHAL-F/R daje produkt około 800 pz.

**2.2.2 Parametry PCR.** Profil amplifikacji dla PCR specyficzny dla *P. halstedii* obejmuje etap wstępnej denaturacji przy 95°C przez 5 minut, następnie 35 cykli denaturacji, przyłączania i elongacji, przez 20 s przy 94°C, 30 s przy 58°C i 1 minutę przy 72°C odpowiednio, i końcowy etap wydłużania przy 72°C przez 7 minut.

## 3. Niezbędne informacje proceduralne

Produkty PCR są następnie rozdzielane elektroforetycznie w 1% żelu agarozowym zgodnie z standardowymi procedurami (Sambrook i wsp., 1989), razem z markerem (Invitrogen) o

---

<sup>4</sup> Inne komercyjne kity do ekstrakcji DNA mogą zostać użyte, o ile uzyska się wyniki równoważne.

wielkości 100 pz. Żele barwi się bromkiem etydyny i obrazy rejestruje kamerą w świetle ultrafioletowym. Do każdego eksperymentu powinna być dołączona kontrola negatywna (brak DNA docelowego), w celu sprawdzenia braku kontaminacji, a także kontrola pozytywna (DNA genomowe z referencyjnego szczepu odniesienia *P. halstedii*, lub z produktu amplifikacji ze starterami PHAL-F/R dla *P. halstedii*).

Kontrola pozytywna, ale nie kontrola negatywna powinna dać produkt wielkości 308 pz DNA. Podpróbki dające produkt 308 pz uważa się za porażone przez *P. halstedii*, podczas gdy podpróbki nie dające takiego produktu są negatywne, pod warunkiem, że wewnętrzna kontrola amplifikacji daje produkt o wielkości 800 pz.

Ekstrakty DNA, które nie dają produktu o wielkości 800 pz powinny być rozcieńczone i ponownie poddane badaniu metodą PCR. Jeśli rozcieńczenie nie zniesie efektu inhibicji, to ekstrakt DNA powinien być uznany za nie nadający się do analizy w/w techniką.

Alternatywnie jakość ekstraktu DNA można ocenić badając ekstrakt techniką PCR z użyciem uniwersalnych starterów ITS1 i ITS4 (White i wsp, 1990). W tym przypadku, należy zamienić startery specyficzne dla *P. halstedii* na startery uniwersalne ITS1 i ITS4 oraz obniżyć temperaturę hybrydyzacji w reakcji PCR do 55°C (pozostałe warunki PCR zostały opisane powyżej). Sygnał pozytywny uzyskany w tym teście oznacza, że ekstrakt DNA został zamplifikowany: DNA zostało wyizolowane, a poziom inhibitorów był niski.

<b>Tłumaczenie z jęz. angielskiego:</b>	<b>Sprawdził:</b>	<b>Zatwierdził:</b>
Anna Wiśniewska	Grażyna Szkuta	Janina Butrymowicz (GIORIN CL)