

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 7/6(1)



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

Zatwierdzanie

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 dotyczące agrofagów podlegających przepisom są przeznaczone do stosowania przez Krajowe Organizacje Ochrony Roślin (NPPO), jako ciała odpowiedzialne za stosowanie środków fitosanitarnych, w celu wykrycia i identyfikacji agrofagów podlegających przepisom w EPPO i/lub Unii Europejskiej.

W roku 1998 EPPO rozpoczęła nowy program przygotowywania protokołów diagnostycznych dla agrofagów podlegających przepisom w regionie EPPO (włączając Unię Europejską). Prace są prowadzone przez Panel Diagnostyczny EPPO oraz inne panele specjalistyczne. Celem programu jest utworzenie dla każdego agrofaga podlegającego przepisom zatwierdzonego międzynarodowego protokołu diagnostycznego. Protokoły bazują na wieloletnich doświadczeniach ekspertów EPPO. Pierwsze projekty są przygotowywane przez wyznaczonego eksperta – autora(ów). Są one pisane zgodnie z „ogólnym formatem i zawartością protokołu diagnostycznego”, przyjętymi przez Panel Diagnostyczny i dostosowanymi, o ile to konieczne, do poszczególnych agrofagów. Z reguły, protokół zaleca szczegółowy sposób wykrywania lub identyfikacji, który został uznany za lepszy (niezawodność, łatwość w użyciu itd.) od innych metod. Inne metody mogą być również wymienione ze wskazaniem ich wad i zalet. Jeśli jest stosowana metoda niewymieniona w protokole, należy to uzasadnić.

Materiały źródłowe¹

¹ W nawiasach kwadratowych podana oryginalna pisownia. (przyp. tłum.)

- 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).]
- OEPP/EPPO (1999) Standardy EPPO PM 1/2(8): 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 (8): EPPO A1 and A2 lists of quarantine pests. EPPO Standards PM1 General phytosanitary measures, 5–17. OEPP/EPPO, Paris (France).]

Definicje

Agrofag podlegający przepisom: agrofag kwarantannowy lub agrofag niekwarantannowy podlegający przepisom.

Agrofag kwarantannowy: agrofag o potencjalnym znaczeniu ekonomicznym dla zagrożonego obszaru, ale jeszcze nie występujący na tym obszarze lub obecny, ale nie rozprzestrzeniony szeroko i podlegający urzędowemu zwalczaniu.

Zarys wymagań

Protokoły diagnostyczne EPPO dotyczące agrofagów podlegających przepisom dostarczają wszystkich niezbędnych informacji dotyczących określonego agrofaga w celu jego wykrycia i prawidłowej identyfikacji dokonanej przez ogólnego eksperta (np. entomologa, mikologa, wirusologa, bakteriologa itp.) ale nie koniecznie przez specjalistę odnośnie danego organizmu lub jego grupy taksonomicznej. 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).

Wiele protokołów zawiera opis badań laboratoryjnych wymagających użycia odczynników chemicznych lub aparatury, które mogą stanowić określone zagrożenie. We wszystkich przypadkach należy ściśle stosować lokalne procedury dotyczące bezpieczeństwa.

W protokołach tych podano nazwy handlowe używanych produktów. Inne, podobne produkty mogą być równie efektywne.

Standardy EPPO z tej serii

Do tej pory zostało zatwierdzonych i opublikowanych pięć 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*. *Biuletyn OEPP/EPPO Biuletyn* **31**, 41–44

PM 7/2(1) *Tobacco ringspot nepovirus*. *Biuletyn OEPP/EPPO Biuletyn* **31**, 45–51

PM 7/3(1) *Thrips palmi*. *Biuletyn OEPP/EPPO Biuletyn* **31**, 53–60

PM 7/4(1) *Bursaphelenchus xylophilus*. *Biuletyn OEPP/EPPO Biuletyn* **31**, 61–69

PM 7/5(1) *Nacobbus aberrans*. *Biuletyn OEPP/EPPO Biuletyn* **31**, 71–77

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

Chrysanthemum stunt pospiviroid

Zakres

Standard opisuje protokół diagnostyczny dla *Chrysanthemum stunt pospiviroid*.

Zatwierdzenie i nowelizacja

Po raz pierwszy zatwierdzony jako Standard EPPO we wrześniu 2001 r.

Wprowadzenie

Karłowatość złocieni jest ekonomicznie ważną chorobą kwiatowych odmian chryzantem (*Dendranthema x grandiflorum*), w szczególności tych całorocznych. Zidentyfikowano ją w większości rejonów (jeśli nie we wszystkich) uprawy chryzantem na świecie. Czynnikiem sprawczym choroby jest *Chrysanthemum stunt viroid pospiviroid* (CSVd), spokrewniony blisko z *Potato spindle tuber pospiviroid*. CSVd nie zawiera w swej strukturze białek. Zbudowany jest on wyłącznie z jednoniciowego, kolistego RNA o długości pomiędzy 354 a 356 nukleotydów. Z powodu wewnętrznej komplementarności sekwencji, RNA wiroida ulega pofałdowaniu i wiąże się wewnętrznie, formując dwuniciową cząsteczkę, wykazującą wysoki stopień struktury drugorzędowej, co czyni CSVd wyjątkowo stabilnym. W rezultacie, rozprzestrzenianie może odbywać się w sposób mechaniczny (zwłaszcza poprzez kontakt ze skontaminowanymi narzędziami bądź kontakt pomiędzy roślinami), jednak to rozmnażanie z zainfekowanych roślin macierzystych jest głównym sposobem transmisji CSVd.

Nie istnieją silne dowody na to, że transmisja CSVd zachodzi poprzez nasiona, kaniankę lub przez owadzie wektory, ale nawet jeśli zdarza się przenoszenie w jakikolwiek z tu wymienionych sposobów, zachodzi ono rzadko. W celu uzyskania większej ilości ogólnych informacji dotyczących CSVd, patrz EPPO/CABI (1997).

Tożsamość

Nazwa: *Chrysanthemum stunt viroid*

Synonimy: *Chrysanthemum stunt mottle virus* (częściowo)

American stunt virus (częściowo)

Stanowisko taksonomiczne: Rodzina *Pospiviroidae*, Rodzaj *Pospiviroid*

Akronim: CSVd

Komputerowy kod Bayera: CSVD00

Kategoria fitosanitarna: EPPO - lista A2, nr 92; UE - Załącznik II/A2

Wykrywanie

Rośliny żywicielskie

Jedynymi istotnymi roślinami żywicielskimi CSVd są kwiatowe odmiany chryzantem (*Dendranthema x grandiflorum*). CSVd jest zdolny w sposób naturalny infekować również *Argyranthemum frutescens*, *Petunia hybrida* hybrydy surfinii oraz *Ageratum* spp., ale wszystkie one uważane są za pomniejszych żywicieli. Dodatkowo w sposób sztuczny, poprzez inokulację z soku bądź poprzez szczepienie, może zostać zainfekowany szereg innych roślin żywicielskich z *Asteraceae*, jak również pomidor (*Lycopersicon esculentum*).

Objawy choroby

W wielu uprawach chryzantem, aż do 30 % zainfekowanych roślin nie wykazuje objawów porażenia. Gdy objawy są widoczne, często są zróżnicowane i wysoce zależne od panujących warunków środowiskowych, w szczególności temperatury oraz światła. Głównym symptomem, jak wskazuje sama nazwa organizmu, jest karłowacenie, z redukcją nawet do 50 % ogólnego wzrostu dojrzałych roślin. Łodygi stają się bardzo kruche i łatwo łamliwe w miejscach rozgałęzień. Inne, częste symptomy dotyczą kwiatu. Porażone rośliny mają zredukowaną wielkość kwiatu i wykazują przedwczesne kwitnienie, czasem do 10 dni. Rzadziej kwitnienie może być także opóźnione. W przypadku niektórych odmian, szczególnie tych o czerwonym pigmentowaniu, symptomy mogą obejmować również nieregularności w budowie kwiatu bądź jego blednięcie (redukcję w intensywności koloru). Objawy liściowe występują rzadziej a obecność jasnych, sztywno osadzonych na łodydze młodych liści często jest jedynym wskaźnikiem infekcji. Czasami obserwuje się również kropki lub plamki na liściach, często powiązane ze zniekształceniami liści (marszczenie/kurczenie), najbardziej skrajny przykład symptomu opisywany jako 'measles' (z ang. odra, przyp. tłum), objawia się jako rozległe, żółte plamy na liściach. Objaw ten ograniczony jest jedynie do niewielkiej części odmian (np. odmiany Mistletoe oraz Bonnie Jean) i jako że większość z tych odmian nie jest dłużej dostępna komercyjnie, bardzo rzadko obserwowany jest w naturalnie zainfekowanych roślinach. Objawy CSVd na *Argyranthemum frutescens* są podobne do tych na *Dendranthema*, z obserwowanym karłowaceniem i przedwczesnym kwitnieniem u niektórych odmian. W przypadku surfinii, generalnie nie obserwuje się objawów, aczkolwiek u niektórych odmian dochodzi do karłowacenia (W. Menzel, University of Hannover, DE, pers. comm.).

Pobieranie próbek

Z powodu wysokiego poziomu bezobjawowych nosicieli, przynajmniej 10 % całości winna być poddana wizualnej ocenie. Z powodu dużej różnorodności objawów należy wykonać badania laboratoryjne w celu potwierdzenia porażenia podejrzanych roślin. Należy zwrócić uwagę na czas w jakim pobierane są próbki. Wczesniejsze badania wskazały, że dochodzi do spadku koncentracji CSVd w porażonych roślinach w miesiącach zimowych (od listopada do lutego na półkuli północnej) i sugeruje się, aby w tych miesiącach najlepiej unikać próbobrania. Użycie bardziej nowoczesnego i czułego testu udowodniło jednak, że możliwa jest detekcja CSVd w ciągu całego roku z uwzględnieniem, że pobieranie prób preferowane jest wiosną i latem, jednak nie jest to czynnik krytyczny.

Ilość i rodzaj pobieranej tkanki zależy od rodzaju badania jakie ma być przeprowadzone, ale dla metod molekularnych opisanych w tym protokole nawet pojedynczy liść powinien być wystarczający. Dystrybucja CSVd w obrębie porażonych, dojrzałych roślin wydaje się być ujednolicona, niemniej jednak zaleca się pobieranie kilku w pełni wykształconych liści, pochodzących z kilku różnych łodyg należących do tej samej rośliny. Poddawane badaniu mogą być również łodygi, jednak są one trudniejsze w próbobraniu i obróbce.

Identyfikacja

W celu wykrycia CSVd w próbie, dostępne są cztery metody:

- elektroforeza powrotna w żelu poliakrylamidowym (R-PAGE) – metoda ta umożliwi jedynie wykrycie obecności wiroida a nie jego identyfikację [to drugie możliwe jedynie, kiedy R-PAGE połączony jest z hybrydyzacją kwasów nukleinowych (Northern blot)];
- hybrydyzacja kwasów nukleinowych z użyciem sondy cRNA znakowanej digoxigeniną [(DIG)-labelled] – metoda ta jest czuła i wiarygodna, ale ekonomiczna jedynie w przypadku, gdy mamy do czynienia z analizą dużej liczby prób;
- odwrotna transkryptaza- łańcuchowa reakcja polimerazy (RT-PCR) – jest to preferowana metoda wykrywania i identyfikacji, jeśli połączy się ją z analizą polimorfizmu długości fragmentów restrykcyjnych (RFLP) produktów RT-PCR, polecana w momencie, gdy nie dysponujemy wyposażeniem do przeprowadzenia reakcji TaqMan (patrz niżej);
- technika 5'-nukleazy (TaqMan) – jest to bardzo czuła i specyficzna metoda umożliwiająca wykrycie i identyfikację CSVd. Preferowana metoda w momencie gdy dysponujemy odpowiednim wyposażeniem.

Metoda R-PAGE

Metoda ta opracowana została przez J.W. Roenhorst (Roenhorst i wsp., 2000). Jest to udoskonalona wersja protokołu zamieszczonego w Procedurze Fitosanitarnej EPPO Nr. 24 (OEPP/EPPO, 1989).

Przygotowanie próbki

Sok jest ekstrahowany z kilku liści (do 1 g) z użyciem prasy serologicznej, np. Pollähne Press (Meku, Niemcy). 0,5 ml soku dodawane jest do 2- ml probówki wirówkowej, zawierającej 250 µl buforu ekstrakcyjnego (1 M Tris-HCl pH 8,0, 100 mM NaCl, 10 mM EDTA, 2 % (w/v) SDS) i 750 µl pozbawionego wody fenolu (zawierającego 0,1 % 8-hydroxyquinoline). Po dodaniu soku, zawartość probówki jest mieszana poprzez vorteksowanie przez 90 s, a następnie wirowana w 12 000 g przez 10 min w 4°C. Porcja górnej, wodnej fazy (400 µl) jest następnie przenoszona do kolejnej probówki wirówkowej, zawierającej 1 ml 96 % etanolu i 40 µl 3 mM octanu sodu, pH 5,6. RNA jest następnie strącany poprzez inkubację w -20 °C przez przynajmniej 1 h, a następnie wirowany jak opisano powyżej. Supernatant jest usuwany, a osad osuszany przed zawieszeniem w 30 µl wody wolnej od RNaz, zawierającej 0,05 % xylene cyanol FF (dodawany jako barwnik elektroforetyczny). Próby mogą być przechowywane w -20 °C przez okres przynajmniej jednego tygodnia. Przed

nałożeniem, próbki są wirowane przez 2 min w 12 000 g w celu usunięcia jakiegokolwiek nierozpuszczonego materiału.

Przygotowanie żelu

Żele poliakrylamidowe przygotowywane są na GelBond PAGfilm (124 x 258 mm) z zastosowaniem zestawu Multiphor II casting kit (Amersham Pharmacia Biotech). Przed użyciem, szklane płytki pokrywane są Repel- Silane ES (Amersham Pharmacia Biotech). Żele przygotowuje się do grubości 1 mm, używając 5 % mieszaniny akrylamidu: 3,75 ml 40 % (w/v) roztworu akrylamid/bis (stosunek: 37,5:1; Bio-Rad), 1,5 ml 10 x TBE stek (890 mM Tris pH 8,3; 890 mM kwas borowy; 20 mM EDTA; Bio-Rad), 36 μ l TEMED i 200 μ l 10 % nadsiarczanu amonu (przygotowanego na świeżo), uzupełnić do końcowej objętości 30 ml wodą destylowaną. Studzienki formuje się przy użyciu 40-zębego grzebienia (dającego studzienki o rozmiarze 4x 4 x 0,25 mm).

Elektroforeza w żelu

Elektroforeza prowadzona jest z użyciem horyzontalnego systemu Multiphor II (Amersham Pharmacia Biotech), w kombinacji z zasilaczem (zdolnym dostarczyć do 400 V) i jednostką chłodząco-grzejącą z systemem cyrkulacji (np. Amersham Pharmacia Biotech MultiTemp III). Kiedy żel jest już przygotowany, umieszczany jest on na ceramicznej płycie jednostki Multiphor, uprzednio pokrytej cienką warstwą oleju zabezpieczającego płytę grzewczą (melting-point bath oil Sigma, Nr kat. M-6884) i ułożony tak, że czołowe krawędzie studzienek umieszczone są na pozycji 4. Paski elektrodowe (250 x 50 mm x 1,2 mm grubości; Schleicher & Schull, GB004), nasączone 1,67x TBE, umieszczane są tak, by pokryły krawędzie żelu szerokości 10–15 mm. Następnie próbki (5 μ l) nakładane są do studzienek. Do badania dołącza się przynajmniej jedną kontrolę pozytywną i jedną kontrolę negatywną. Szklana płyta (125 x 260 x 3 mm) umieszczona zostaje na wewnętrznych krawędziach pasków, przykrywając w ten sposób całą powierzchnię żelu. Następnie nałożona zostaje pokrywa aparatu w taki sposób, by umożliwić kontakt elektrod w odległości około 5 mm od zewnętrznej krawędzi pasków. Pierwszy rozdział żelu przeprowadza się w warunkach natywnych w 15 °C, pod stałym natężeniem 20 mA. Po upływie około 6 min, natężenie zwiększa się do 30 mA i rozdział kontynuowany jest przez kolejnych około 55 min, po upływie których marker czołowy osiąga pozycję 8 na ceramicznej płycie. W tym punkcie następuje zamknięcie zaworu kontrolującego przepływ z łaźni wodnej do ceramicznej płyty, a temperatura łaźni wodnej podniesiona zostaje do 75°C. Podczas gdy łaźnia podgrzewa się, rozdział kontynuowany jest przez kolejnych 15 min, bądź do czasu gdy czoło barwnika znajdzie się pomiędzy pozycją 10 a 11, a temperatura wody w odłączonej łaźni wodnej osiągnie 75°C.

Zanim rozpocznie się rozdział powrotny (w warunkach denaturujących), paski elektrodowe zastępuje się świeżymi, a żel wraz z paskami przykrywa się dwoma poliestrowymi arkuszami, w celu zapobiegnięcia odwodnieniu. Pierwszy arkusz (95 x 270 mm) umieszcza się pomiędzy papierowymi paskami elektrodowymi (przykrywając żel), a drugi (175 x 270 mm) przykrywa zarówno żel jak i paski. Szklana płyta i elektrody są ponownie nakładane, a zawór ostrożnie otwierany, by osiągnąć stopniowe ogrzanie żelu. Temperatura łaźni wodnej zredukowana zostaje do 60°C, biegunowość odwrócona i rozpoczęty zostaje rozdział powrotny; początkowo w stałym natężeniu 2 mA przez 8 min, a następnie należy zwiększyć natężenie do 50 mA i prowadzić rozdział przez 25–30 min, po upływie których marker obciążający powinien dotrzeć do paska znajdującego się po lewej stronie. Wówczas żel usuwany jest z ceramicznej płyty i ostrożnie przepłukiwany w 96 % etanolu w celu usunięcia pozostałości oleju, przed płukaniem w wodzie destylowanej.

Barwienie srebrem

Po zakończeniu elektroforezy żel umieszczany jest na 10 min w 10 % etanolu zawierającym 0,5 % kwas octowy (rozrobiony w wodzie destylowanej). Utrwalanie i wszystkie następne etapy wykonywane są w temperaturze pokojowej z delikatnym wytrząsaniem. Żel przenoszony jest do 10 mM azotanu srebra na 20 min, a następnie płukany dwukrotnie w wodzie destylowanej (každorazowo 1 min). Następnie żel umieszczany jest w roztworze 375 mM wodorotlenku sodu, zawierającym 2,3 mM borowoderek sodu oraz 0,4 % formaldehyd (37 % w/v) i pozostawiony na 3–5 min, tak by umożliwić rozwój wybarwienia, a następnie zatrzymać proces przez traktowanie żelu przez 10 min 1 % kwasem octowym. W przypadku próbek pozytywnych prążek wiroida powinien pojawić się jako wyraźny prążek, oddzielony od pozostałych kwasów nukleinowych. W celu utrwalenia żelu należy inkubować go w 10 % kwasie octowym i 5 % glicerolu przez co najmniej 15 min, następnie owinąć celofanem, umieścić na szklanej płycie i pozostawić do wyschnięcia na około 2 dni w temperaturze pokojowej.

Metoda hybrydyzacji kwasów nukleinowych

Przygotowanie sondy

W metodzie tu opisaney, używanym klonem jest pCSVd-5 (wygenerowany przez R.A. Mumford, Central Science Laboratory, GB), który składa się z pojedynczej, pełnej długości kopi cDNA CSVd, wklonowanej w plazmidowy wektor pGEM (Promega). Inne klony, jak pCS9 (Candresse i wsp., 1990), są bardzo podobnymi konstruktami i mogłyby być również używane. Plazmid oczyszczony jest przy użyciu kitu Wizard (Promega) lub podobnego, postępując zgodnie z zaleceniami producenta. Oczyszczony plazmid cięty jest przy użyciu enzymu restrykcyjnego *Sma I* (Promega), z zachowaniem warunków zalecanych przez producenta. Zlinearyzowany plazmid jest oczyszczany poprzez ekstrakcję fenol:chloroform i strącany etanolem, przy użyciu standardowych metod. Po etapie strącania plazmidowy osad przemywany jest 70 % etanolem, osuszany i zawieszany w 50 µl sterylnej, destylowanej wody. Następnie dokonuje się oceny ilościowej plazmidu przy pomocy zestawu Nucleic dot metric quantitation kit (VH Bio, UK) lub podobnej, odpowiedniej metody. Sonda znakowana DIG syntetyzowana jest poprzez transkrypcję *in-vitro*. Reakcje prowadzone są poprzez dodanie 1 µg linearnego plazmidu do 1 x buforu transkrypcyjnego (Promega), 10 mM DTT, 1 x DIG RNA labelling mix (Roche Diagnostics²), 40 U RNasin (Promega) oraz 20 U T7 RNA polimerazy (Promega). Reakcja uzupełniana jest do końcowej objętości 20 µl, przy użyciu wody wolnej od RNaz i inkubowana w 37 °C aż do 2 h. Po zakończeniu syntezy, ilość powstałej wyznakowanej sondy oznaczana jest względem znanego standardu RNA znakowanego DIG (Roche Diagnostics), z użyciem rekomendowanych metod. Sondy cRNA należy przechowywać w –20 °C (lub niżej), co zapewni im stabilność nawet do roku czasu.

Przygotowanie próbki oraz membrany testowej

Próby przygotowywane są przy użyciu metody zaadaptowanej od Podleckis *i* wsp. (1993). Tkanka liścia (do 0,5 g) miążdzona jest w buforze ekstrakcyjnym AMES (3 % SDS, 20 % etanol, 1 M

² Roche Diagnostics to nowa nazwa handlowa Boehringer Mannheim, dotychczas związanej z systemem sond znakowanych DIG.

NaCl, 0,5 M octan sodu, 10 mM MgCl₂, pH 6,0), w stosunku 1:1,5 (w/v). Otrzymany ekstrakt jest następnie przenoszony do 1,5-ml probówki wirówkowej i inkubowany w 37 °C przez 15 min. Po zakończeniu inkubacji, do probówki dodawana jest jednakowa objętość chloroformu, całość jest mieszana do momentu utworzenia się jednolitej emulsji i wirowana w maksymalnej prędkości przez 5 min, w celu rozdzielenia warstw. Próbki używane są natychmiast lub mogą być przechowywane w 4°C do dnia następnego (najczęściej).

Dla każdej próbki, pobierane jest 3–5 µl wodnej, górnej warstwy i pipetowane bezpośrednio na powierzchnię pozytywnie naładowanej nylonowej membrany (Roche Diagnostics). Dodatkowo obok badanych próbek, stosuje się odpowiednie kontrole pozytywne (zainfekowane oraz plazmid) i negatywne (niezainfekowane oraz bufor). Po nałożeniu próbek, membrana jest suszona (w 80 °C przez 10 min), a następnie utrwalana w UV-crosslinkerze w 70 000 µJ cm⁻² w celu utrwalania można również zapiekać membranę w 80 °C przez 2 h, ale podnosi to sygnały tła. Jeżeli jest to wymagane, na tym etapie, membranę można przechowywać przez okres kilku dni w ciemności, w temperaturze pokojowej.

Hybrydyzacja

Hybrydyzacja prowadzona jest z zapewnieniem ogólnych warunków zalecanych przez Roche Diagnostics, przy pracy z sondami RNA znakowanymi DIG. Membrana testowa umieszczona zostaje w hybrydyzacyjnym naczyniu, zawierającym 10 ml buforu DIG Easy-Hyb (Roche Diagnostics) i podlega prehybrydyzacji w 68 °C, w piecu hybrydyzacyjnym (Hybaid). Po upływie 1–2 h, bufor do prehybrydyzacji jest zlewany i zastępowany 6 ml wcześniej podgrzanego DIG Easy-Hyb zawierającego 100–250 ng sondy; naczynie jest ponownie umieszczane w piecu i inkubowane przez noc w 68°C. Po etapie hybrydyzacji, membrana przenoszona jest do pudełka śniadaniowego i przemywana cztery razy na orbital / rocking platform shaker (wytrząsarce/kołysce laboratoryjnej); dwa płukania odbywają się w temperaturze pokojowej w 2 X SSC + 0,1 % SDS przez 30 min, a następnie dwa kolejne 15 minutowe płukania w 68 °C w 0,5 X SSC + 0,1 % SDS.

Detekcja

Detekcja prowadzona jest z użyciem substratu CSPD (Tropix), postępując zgodnie z protokołem zalecanym przez Roche Diagnostics dla chemiluminescencyjnej detekcji znakowanych DIG sond RNA. Jeśli używany jest film Kodak X-Omat, 1 h czas ekspozycji jest w zasadzie idealny by dać wyrazisty wynik. W zależności od siły powstałego sygnału może okazać się niezbędna dodatkowa (dłuższa bądź krótsza) ekspozycja .

Metoda alternatywna

Jako alternatywa dla laboratoriów, które nie są wyposażone w sposób umożliwiający przeprowadzenie badań z użyciem hybrydyzacji, komercyjnie dostępny jest kit CSVd hybridization test kit firmy Agdia (Elkhart, Indiana, US). Używając tego systemu użytkownik przygotowuje próbki i membranę, które następnie wracają do firmy Agdia w celu przeprowadzenia badania, i która to firma następnie dostarcza ostateczny wynik. System ten okazał się dawać identyczne rezultaty jak sposób hybrydyzacji opisany tutaj.

Metoda RT-PCR

Postępowanie tu opisane zgodne jest z metodą opisaną przez Mumford i wsp. (2000).

Ekstrakcja całkowitych kwasów nukleinowych

Całkowite kwasy nukleinowe (Total nucleic acid - TNA) są izolowane z prób z użyciem metody zaadaptowanej od Lohdi i wsp. (1994). Tkanka liścia (100 mg) umieszczana jest w 10 x 15 cm polietylenowej torebce, grubości 500-gauge (ok. 125 mikrometrów przyp. tłum.) i mrożona w ciekłym azocie, a następnie rozcierana na drobny proszek przy użyciu małego ręcznego rolera. Rozcieranie kontynuowane jest aż do momentu rozmarzania tkanki, kiedy tworzy ona gładką pastę. Dodawany jest jeden ml (10 objętości) buforu do maceracji tkanki (grinding buffer) (2 % CTAB, 100 mM Tris-HCl (pH 8,0), 20 mM EDTA, 1,4 M NaCl, 1,0 % siarczyn sodu, 2,0 % PVP-40) i całość mieszana jest poprzez użycie rolera. Sok z rozmiążdżonej tkanki zlewany jest do 1,5-ml probówek wirówkowych i inkubowany w 65°C przez 10–15 min. Po okresie inkubacji, probówki wirowane są w maksymalnej prędkości przez 5 min (w temperaturze pokojowej). Sklarowany sok (700 µl) przenoszony jest do kolejnej mikroprobówki, do której dodawana jest jedna objętość mieszaniny chloroform:izoamyl alkohol (24:1 v:v). Całość mieszana jest do uzyskania emulsji poprzez obracanie probówki. Zawartość probówki jest wirowana w maksymalnej prędkości w mikrowirówce przez 5 min (w temperaturze pokojowej). Górna (wodna) warstwa jest ostrożnie usuwana i przenoszona do nowej probówki. Ponownie dodawana jest jedna objętość mieszaniny chloroform:izoamyl alkohol, całość jest mieszana i wirowana jak poprzednio. Wodna warstwa jest ponownie przenoszona, uważając przy tym by nie naruszyć interfazy i dodawane jest do niej 0,5 objętości 5 M NaCl oraz tyle samo zimnego izopropanolu. Całość jest dobrze mieszana i inkubowana w 20 °C przez noc. TNA strącamy poprzez wirowanie przez 10 min w maksymalnej prędkości. Sól/etanol są zlewane a osad jest przemywany poprzez dodanie 500 µl 70 % etanolu i wirowany przez 3–4 min. Etanol jest zlewany, a osad pozostawiamy do wysuszenia by usunąć pozostały etanol. Następnie osad jest zawieszany w 100 µl wody o czystości do biologii molekularnej.

RT-PCR

Jeden µl TNA lub kontroli (zainfekowane RNA, niezainfekowane RNA i woda) nakładany jest do 0,2-ml probówki PCR, do której dodawane jest 20 pm każdego ze starterów Vir 1 (5'-CTTCAGTTGTTTCCACCGGGTAG-3') i Vir 2 (5'-TTCCTGTGGTGCACCTCCTGACC-3'). Końcowa objętość 15 µl osiągana jest poprzez dodanie wody o czystości do badań molekularnych. RNA wiroida jest denaturowane przez ogrzewanie w 95 °C przez 3 min, a następnie schłodzone do 4 °C (lub niżej) przez 5–10 min (dla ułatwienia, można tego dokonać używając termocyklera, jeśli posiada on możliwość chłodzenia). Kiedy etap denaturacji zostanie zakończony, można dodać pozostałe składniki mieszaniny reakcyjnej (1,25 U *Taq* polimerazy, 10 U AMV odwrotnej transkryptazy, 1 x bufor *Taq* zawierający 1,5 mM MgCl₂ i 300 µM dNTPs; wszystkie składniki firmy Promega), dopełnić do całkowitej objętości 35 µl sterylną, wolną od nukleaz wodą. Po wymieszaniu, probówki ponownie umieszcza się w termocyklerze i przeprowadza RT-PCR według następującego programu: 50 °C przez 30 min, 95 °C przez 4 min, następnie 30 cykli po 95 °C, 60 °C, 72 °C (każdy po 1 min), oraz końcowa wydłużona elongacja prowadzona w 72 °C przez 5 min.

Elektroforeza w żelu agarozowym

Produkty powstałe w reakcji RT-PCR, analizowane są następnie poprzez elektroforezę w żelu. PCR mix (12,5 µl) łączony jest z 2,5 µl 6 x buforu obciążającego, nakładany na 2 % żel agaroz-TBE i poddawany rozdzielaniu w 1 x buforze TBE, pod napięciem 5–10 V cm⁻¹. Dodatkowo w celu określenia wielkości uzyskanych fragmentów na żelu, obok próbek rozdzielaniu ulega również drabinka 100-bp (AB Gene, UK). Po zakończeniu rozdzielania żel barwiony jest bromkiem etydyny (1 µg ml⁻¹ w wodzie dejonizowanej), a następnie jest on wizualizowany w świetle UV. Próbki pozytywne dają prążek wielkości 262 par zasad (bp). Obraz (film lub wersja cyfrowa) żelu zachowywany jest by dołączyć go do końcowego raportu z badania.

RFLP

Produkty RT-PCR z próbek pozytywnych są oczyszczane przy użyciu kitu do oczyszczania produktu PCR (MN Nucleo-Spin Extract lub podobny). Następnie oczyszczony produkt jest poddany trawieniu przez enzym restrykcyjny *Hind* III (Promega), w reakcji na którą składa się 17 µl produktu, 10 U enzymu, 2 µl 10 x buforu. Reakcje są następnie inkubowane przez 2 h w 37 °C. Po okresie inkubacji produkty reakcji poddawane są analizie poprzez elektroforezę w żelu agarozowym, jak opisano powyżej. Dla produktów powstałych z użyciem pary starterów *Vir*, *Hind* III potnie produkt będący CSVd (by dać prążek wielkości 220-bp) ale nie potnie PSTVd.

Technika 5'-nukleazy (TaqMan)

Postępowanie tu opisane zgodne jest z metodą opisaną przez Mumord i wsp. (2000).

Ekstrakcja całkowitych kwasów nukleinowych

TNA izolowany jest z użyciem tej samej metody jak opisano powyżej, dla RT-PCR.

Badanie TaqMan

Reakcje prowadzone są w duplikacie, w 96-dołkowej płytce reakcyjnej z użyciem odczynników dostarczonych przez Applied Biosystems (jeśli nie określono inaczej). W każdej reakcji 1 µl ekstraktu TNA dodawany jest do 7,5 pmol startera „reverse” (CSVd 297R: 5'-GGAAAAAAGGCGTTGAAGCTT-3') i uzupełniany do końcowej objętości 5 µl wodą o czystości do biologii molekularnej. Mix ten jest następnie podgrzewany do 95 °C przez 3 min zanim zostanie schłodzony na lodzie. Po 5-10 min chłodzenia, zdenaturowana mieszanina RNA - „reverse” starter dodawana jest do pozostałego master mixu zawierającego 1 x Buffer A (dostarczony razem z AmpliTaq Gold), 5,5 mM MgCl₂, 0,5 mM dNTPs, 7,5 pmol „forward” starter (CSVd 220F: 5'-CTGCCCTAGCCCGGTCTT-3'), 2,5 pmol sondy TaqMan (CSVd 249T: 5'- [FAM] - CAGTTGTTTCCACCGGGTAGTAGCCAA-[TAMRA]-3'), 0,625 U AmpliTaq Gold i 10 U M-MLV RT (Promega), uzupełnione do końcowej objętości 25 µl wodą o czystości do biologii molekularnej. Płytki są następnie poddane serii cykli w określonych warunkach (48 °C przez 30 min, 95 °C przez 10 min i 40 cykli po 60 °C przez 1 min, 95 °C przez 15 s) z użyciem urządzenia 7700 Sequence Detection System (Applied Biosystems), umożliwiającego gromadzenie danych w czasie rzeczywistym. Uzyskane dane są analizowane przy użyciu pakietu oprogramowania Sequence Detector dostarczonego przez Applied Biosystems.

Porównanie z podobnymi gatunkami

R-PAGE: wiroidy takie jak *Potato spindle tuber pospiviroid* (PSTVd) i inne pospiviroidy, które są bardzo zbliżonych rozmiarów, nie mogą być odróżnione od CSVd przy użyciu R-PAGE. W celu identyfikacji do poziomu gatunku, wymagane będą dodatkowe badania (patrz niżej).

Hybrydyzacja: technika hybrydyzacji jest bardzo specyficzna jeśli chodzi o CSVd. W rygorystycznych warunkach opisanych powyżej, nie powinna mieć miejsca żadna krzyżowa hybrydyzacja pomiędzy sondą CSVd a żadnym innym, roślinnym wiroidem lub wirusem (choć w przypadku nienaturalnie wysokiej koncentracji PSTVd, można otrzymać bardzo słaby sygnał).

RT-PCR: startery tu opisane zaprojektowane są w odniesieniu do wysoce konserwatywnych rejonów, które dzielone są z innymi pospiviroidami włączając w to PSTVd i *Citrus exocortis viroid*. Startery mogą również amplifikować PSTVd, w efekcie dając produkt wielkości 264 bp. W celu identyfikacji do poziomu gatunku, wymagane będą dalsze analizy produktów PCR poprzez analizę RFLP z użyciem enzymu restrykcyjnego *Hind III* (jak opisano).

TaqMan: opisana tutaj kombinacja starter-sonda zaprojektowana została tak, by była specyficzna dla CSVd, ale nie dla innych pospiviroidów (lub innych patogenów). Wykazano, że w badaniu na obecność CSVd nie zostaną wykryte izolaty PSTVd.

Kolekcje izolatów referencyjnych

Izolaty CSVd (i inne wiroidy) dostępne są w:

ATCC 12301 Parklane Drive, Rockville, Maryland 20852-1776 (USA)

Wymagania dla pozytywnej diagnozy

Należy przestrzegać postępowania odnośnie detekcji i identyfikacji opisanego w tym protokole. Do czynienia z pozytywną identyfikacją CSVd mamy w przypadku, gdy:

- podczas wykonywania badania metodą hybrydyzacji kwasów nukleinowych badane próbki dają wyraźne sygnały, które są porównywalne do uzyskiwanych przez kontrolę pozytywną

lub

- użycie pary starterów Vir 1 oraz Vir 2 prowadzi do uzyskania produktu RT-PCR wielkości 262 bp, który po analizie RFLP z użyciem *Hind III* daje produkt 220-bp lub który w hybrydyzacji Southern daje sygnał z sondą DNA skierowaną do CSVd,

lub

- wartość CT (punkt, w którym zaczyna się wykładniczy wzrost amplifikacji) wygenerowany przy użyciu TaqMan osiąga wartość poniżej 40.

Wszystkie wyniki powinny być potwierdzone w oparciu o wyniki odpowiednich kontroli pozytywnych lub negatywnych (w tym drugim przypadku we wszystkich metodach powinniśmy obserwować brak sygnału/produktu/amplifikacji). Jednoznaczna identyfikacja winna być oparta na pozytywnych reakcjach w przynajmniej dwóch niezależnych badaniach (np. RFLP lub hybrydyzacji produktu RT-PCR określonej wielkości).

Raport z badania

Sprawozdanie z badań przeprowadzonych zgodnie z niniejszym protokołem powinno zawierać:

- informacje dotyczącą pochodzenia zainfekowanego materiału
- potwierdzenie wyników, łącznie z kopią fotografii żelu lub obrazem cyfrowym (dla R-PAGE i RT-PCR), autoradiogramem (dla hybrydyzacji) lub wykresem amplifikacji (dla TaqMan).

Porażony materiał powinien być przechowywany zamrożony w $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$ lub niżej, celem przyszłych odwołań lub konieczności przeprowadzenia powtórnych badań. Ponieważ CSVd jest wyjątkowo stabilny, może przeżyć w postaci zamrożonej przynajmniej rok, a prawdopodobnie znacznie dłużej.

Informacje dodatkowe

Dodatkowe informacje na temat technik wyszczególnionych w tym protokole mogą zostać uzyskane od:

R-PAGE

Naktuinbouw, PO Box 135, 2370 A C Roelofarendsveen (Holandia) Plant Protection Service, PO Box 9102, 6700 HC Wageningen (Holandia)

Hybrydyzacja

Central Science Laboratory, Sand Hutton, York, YO41 1LZ (UK)

INRA, Station de Pathologie Végétale, Domaine de la Grande-Ferrade BP 81, 33883 Villenave-d'Ornon cedex (Francja)

Agdia Inc., 30380 County Road 6, Elkhart, Indiana 45614 (US)

RT-PCR & TaqMan

Central Science Laboratory, Sand Hutton, York, YO41 1LZ (UK)

Podziękowania

W oryginalne protokół ten został napisany przez: R. Mumford, Central Science Laboratory, Sand Hutton, York YO41 1LZ (UK)

Materiały źródłowe

- Candresse T, Macquaire G, Brault V, Monsion M & Dunez J (1990) 32P- and biotin-labelled *in-vitro* transcribed cRNA probes for the detection of potato spindle tuber viroid and chrysanthemum stunt viroid. *Research in Virology* **141**, 97–107.
- EPPO/CABI (1997) Chrysanthemum stunt viroid. *Quarantine Pests for Europe*, 2nd edn, pp. 1227–1230. CAB International, Wallingford (GB).
- Lodhi MA, Ye GN, 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.
- Mumford RA, Walsh K & Boonham N (2000) A comparison of molecular methods for the routine detection of viroids. *Bulletin OEPP/EPPO Bulletin* **30**, 341–346.
- OEPP/EPPO (1989) EPPO Standards PM 3/24 Phytosanitary procedures for *Chrysanthemum stunt viroid*. *Bulletin OEPP/EPPO Bulletin* **19**, 161–164.
- Podleckis EV, Hammond RW, Hurtt SS & Hadidi A (1993) Chemiluminescent detection of potato and pome fruit viroids by digoxigeninlabelled dot blot and tissue blot hybridization. *Journal of Virological Methods* **43**, 147–158.
- Roehorst JW, Butôt RPT, van der Heijden KA, Hooftman M & van Zaayen A (2000) Detection of chrysanthemum stunt viroid and potato spindle tuber viroid by return-polyacrylamide gel electrophoresis. *Bulletin OEPP/EPPO Bulletin* **30**, 453–456.

Tłumaczenie z jęz. angielskiego:	Zatwierdził:
Justyna Moszczyńska (GIORiN CL)	Janina Butrymowicz (GIORiN CL)
15.10.2010	