

Diagnostyka¹

Diagnostic

Diaporthe vaccinii

Zakres stosowania

Niniejszy standard opisuje protokół diagnostyczny dla *Diaporthe vaccinii*¹.

Zatwierdzenia i nowelizacje

Zatwierdzony we wrześniu, 2008 roku.

Wprowadzenie

Diaporthe vaccinii Shear (anamorfa *Phomopsis vaccinii* Shear) powoduje objawy chorobowe na łodygach, pędach i liściach uprawnej borówki wysokiej (*Vaccinium corymbosum* L), żurawiny wielkoowocowej (*V. macrocarpon* Aiton), borówki brusznicy (*V. vitis-idaea* L) oraz na autochtonicznych europejskich gatunkach borówki czarnej (*V. myrtillus* L.) i żurawinie błotnej (*V. oxycoccus* L.). *D. vaccinii* powoduje raka, zamieranie i nekrozy pędów oraz lepką zgniliznę owoców. Patogen występuje powszechnie na obszarach o umiarkowanym klimacie Ameryki Północnej: w Kanadzie (Nowa Szkocja), w USA (w 11 Stanach). Jest tylko kilka doniesień o występowaniu tego grzyba na roślinach w Europie: Rumunii, Wielkiej Brytanii (wyniszczony) oraz na Litwie.

Tożsamość

Nazwa: *Diaporthe vaccinii* Shear

Anamorfa: *Phomopsis vaccinii* Shear

Stanowisko taksonomiczne: Fungi: *Ascomycota*: *Diaporthales*

Komputerowy kod EPPO: DIAPVA

Kategoria fitosanitarna: lista EPPO A1, nr 211, EU: II/A1

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

Wykrywanie

Borówki porażone przez *D. vaccinii* mogą zamierać w ciągu kilku miesięcy. Pierwsze objawy pojawiają się na niezdrewniałych pędach (fot. 1A). Pędy tegoroczne więdną w ciągu 4-6 dni i pokrywają się drobnymi nekrozami. Grzyb rozprzestrzenia się przez system naczyniowy ku podstawie rośliny ze średnią szybkością 5,5 cm na 2 miesiące i zabija pojedyncze gałązki, a często całe rośliny odmian wrażliwych. Na łodygach, poniżej objawów więdnienia patogen powoduje brązowe przebarwienia ksylemu. Na nekrozach 1-2 letnich gałązek tworzy się konidiomata (fot. 1B), a askomata na gałązkach 2-3 letnich. Patogen infekuje również liście, pączki i owoce żurawiny (Fot. 2A, Fot. 3). Jagody przybierają zabarwienie brązowoczerwone, są napęczniałe i błyszczące.

Podobne objawy chorobowe i cechy morfologiczne mogą towarzyszyć innym gatunkom z rodzaju *Phomopsis*, które zostały opisane na roślinach *Vaccinium* L., np. *P. columnaris* D.F. Farr & Castlebury, *P. myrtilli* Petr. i *P. conorum* Sac. (Died.). Jednakże, gatunki te wykazują różnice w wielkości konidiomaty oraz kształcie konidiów (Tabela 1). Inne gatunki z rodzaju *Phomopsis*, które stwierdza się w Holandii na *Vaccinium corymbosum* to *P. viticola* (Sacc.) Sacc, ale konidia tego gatunku są większe (Tabela 1).

Podobne objawy do zamierania powodowanego przez *Phomopsis* mogą być związane z obecnością innych patogenów grzybowych takich, jak *Godronia cassandrae* Peck (anamorfa *Fusicoccum putrefaciens* Shear) (Fot. 4), *Colletotrichum* spp., *Fusarium* spp. i *Botryosphaeria dothidea* (Moug.: Fr) Ces. & de Not (anamorfa *Fusicoccum aesculi* Corda). Grzyby te można odróżnić od *Phomopsis* pod mikroskopem stereoskopowym (20x) lub mikroskopem złożonym (400x-1000x) na podstawie obecnych struktur zarodnikowania. W przypadku braku ich obecności, można stymulować rozwój ciał owocujących inkubując materiał roślinny w wilgotnej komorze (patrz poniżej).

Identyfikacja

Identyfikacja grzyba jest możliwa na podstawie jego morfologii, ale w przypadku niepewności powodowanej przez zróżnicowaną naturę morfologiczną *Diaporthe/Phomopsis vaccinii* i możliwej pomyłki z innymi gatunkami z rodzaju *Diaporthe* powinna zostać ona potwierdzona przez sekwencjonowanie amplikonu ITS. Schemat decyzyjny opisujący właściwe badania konieczne do postawienia pozytywnej diagnozy przedstawiono na rycinie 5.

Morfologia

Identyfikacja morfologiczna in vivo

Badanie bezpośrednie

Jeśli obserwuje się objawy chorobowe wskazujące na gatunki z rodzaju *Phomopsis* np. ciała owocujące na porażonych gałązkach *Vaccinium* spp., to postawienie wstępnej diagnozy jest możliwe na podstawie przeprowadzenia badań bezpośrednich. Za pomocą sterylnej igły pobiera się z ciał owocujących zarodniki i umieszcza je w kropli wody destylowanej na szkiełku mikroskopowym, a następnie przeprowadza się analizę mikroskopową. W celu uzyskania czystej kultury zarodniki przenosi się na pożywkę agarową, jak opisano w sekcji „*Identyfikacja morfologiczna in vitro*’.

Badanie w komorze wilgotnej

Jeśli na porażonych gałązkach, liściach i owocach nie obserwuje się ciał owocujących, to w celu ich tworzenia inkubuje się próbkę w wilgotnej komorze. Ciała owocujące określa się jako konidiomata (piknidium) (Fot. 2B). Piknidia tworzą się zwykle w ciągu 4-7 dni. W celu utworzenia się askomaty (perytecjów) inkubację można przedłużyć do 30 dni, chociaż to stadium grzyba dotychczas obserwowano tylko w Ameryce. Fragmenty gałązek tną się skalpelem (o długości 5-7 cm, z chorą i zdrową częścią), następnie obmywa w wodzie destylowanej i inkubuje w wilgotnej komorze w temp. 22-25°C, przy oświetleniu 12/12 godz. światło /ciemność. Komory zwilża się okresowo wodą, a inkubowany materiał kontroluje codziennie pod mikroskopem stereoskopowym. Wszystkie struktury zarodnikujące do badania mikroskopowego przygotowuje się w sposób opisany powyżej. W celu uzyskania czystej kultury zarodniki przenosi się na pożywkę agarową, jak opisano w sekcji „*Identyfikacja morfologiczna in vitro*’.

Tabela 1 Morfologia i cechy diagnostyczne *Phomopsis vaccinii*, *P. conorum*, *P. myrtilli*, *P. columnaris* and *P. viticola*.

Gatunek	Gospodarz (kraj obserwacji)	Konidiomata (pomiary na gospodarzu)	Konidia (pomiary na gospodarzu)	Kultury na PDA
<i>P. vaccinii</i> Shear (Jovaisiene,2005)	<i>Vaccinium macrocarpon</i>	Piknidia średnio 200 µm wysokie i 500 µm szerokie, ciemne, zanurzone w tkance, rozproszone do zlewających się kuliste, wielkie z szerszą podstawą, jednokomorowe, z pojedynczą ostiolią. Konidiofory krótkie, podzielone i rozgałęzione.	Konidia dwóch typów: alfa 6.0-10.5 x 2.2-3.2 µm, hialinowe, jednokomórkowe, wrzecionowate, ostro zakończone na obu końcach, proste, z dwiema kropelkami tłuszczu ²	Grzybnia nie zwarta, o promienistym wzroście, lekko kosmata, strefowana, biała, po 3 tygodniach czasami szarobiałe wokół wyłożonego inokulumu u niektórych szczepów

		Komórki konidiotwórcze enteroblastyczne typu fialidy		
<i>P. conorum</i> Sacc. (Died.) (Jovaisiense & Kacergius, 2008)	<i>Vaccinium myrtillus</i>	Piknidia 290-300 μm szerokie, ciemne, rozproszone, zanurzone w tkance, kuliste, jednokomorowe, z pojedynczą ostiolią.	Konidia 6.5-8.0 x 2.3-3.2 μm , hialinowe, owalnie wydłużone, niektóre z jednym tępym końcem, niektóre lekko zakrzywione z dwoma lub jedną wielką kroplą tłuszczu	Rewers grzybni biały, równomiernie watowaty, lekko kosmaty
<i>P. myrtilli</i> Petr. (Farr et al., 2002b)	<i>Vaccinium myrtillus</i> (Austria, Czechy)	Piknidia 250-350 x 100-150 μm , rozproszone, czarne, zanurzone w tkance stożkowate, z centralną owalną ostiolią, jednokomorowe lub okazjnie wielokomorowe. Konidioforów brak. Komórki konidiotwórcze butelkowate, 6-9 x 3-4 μm , holoblastyczne, obecne pierścienie.	Konidia 8.5-14.5 x 3.1 - 1.0 μm , wrzecionowate, czasami odwrotnie jajowate lub zwężające się u podstawy, hialinowe, niepodzielone, gładkie, szczyt lekko zaokrąglony, u podstawy ścięte lub zaokrąglone, proste lub lekko zakrzywione, z rozproszonymi małymi 2-4 kropelkami tłuszczu.	
<i>P. columnaris</i> Farr & Castl. (Farr et al., 2002b)		Piknidia 200-330 μm wysokie i 440-840 μm szerokie, zanurzone w tkance, rozproszone do skupiających się, jednokomorowe, czarne, szeroko kuliste do spłaszczonych, z jedną ostiolią. Konidiofory cienkościenne, ciemnobrązowe, równoległe połączone, wielokomorowe. Komórki konidiotwórcze 5-12 x 1.5-2.5 μm , odwrotnie maczugowate do cylindrycznych, proste do zakrzywionych, rozwijające się na szczycie komórek kolumnowych.	Konidia 6.4-9.4 x 3.6-4.9 μm , elipsoidalne do owalnych szczyt szeroko zaokrąglony podstawa lekko ścięta, hialinowe, jednokomórkowe z dużą kroplą tłuszczu.	Grzybnia watowata, biała do oliwkowoszarej, o wroście promienistym, rewers czarny do ciemnobrązowego bez stref
<i>P. viticola</i> Sacc.	<i>Vitis vinifera</i>	Dane niedostępne	Konidia 13, 0-17, 0	Brzeg koloni

	(Australia, Południowa Afryka) <i>Vaccinium corymbosum</i> (Holandia)		x 2,5–3,0 μm (na agarze owsianym), hialinowe, jednokomórkowe, wrzecionowate, ostro zakończone na obu końcach, z wieloma drobnymi kropelkami tłuszczu.	całkowity /lecko sfalowany, grzybnia watowata, biała. Czasami widoczne sektory. Na powierzchni w starszych kulturach obecne pomarańczowe kropelki.
--	---	--	--	---

² Konidia beta mogą być również stwierdzone w rozmiarach 15.0-24.0 x 0.8-1.5 μm, hialinowe, nitkowate, haczykowate. Te konidia nie są stosowane do identyfikacji.

Charakterystyka morfologiczna

Anamorfa: *Phomopsis vaccinii*

Konidiomata jest ciemna, kulista, płaska przy podstawie, częściowo umieszczona pod epidermą, rozproszona lub skupiona, jednokomorowa, z jedną ostiolą o średnicy 0,2 x 0,5 mm. Czasami z piknidiów wydziela się kremowa masa zarodników. Tworzą się dwa typy zarodników: alfa (α) konidia - hialinowe, jednokomórkowe, elipsoidalne, z dwiema kropelkami tłuszczu, o wymiarach 6-11 x 2-3 μm (średnio 7,8 x 2,6 μm) oraz typu beta (β) konidia – jednokomórkowe, nitkowate, zakrzywione, hialinowe, o wymiarach 15-24 x 1-1.5 μm (średnio 20 x 1 μm) (według Farr i wsp. (2002a) konidia α mają wymiary 6-11 x 2-4 μm; w badania Guerrero & Godoy (1989) konidia β 14-20 x 0,5-1 μm).

Teleomorfa: *Diaporthe vaccinii*

Caruso & Ramsdell (1995) opisali w USA stadium generatywne na *V. macrocarpon*. Askomata była umieszczona pomiędzy korą a ksylemem i czasami blisko konidiomaty. Perytecja o średnicy 0,3-0,5 x 0,2-0,4, kuliste z czarnymi, grubymi, wielowarstwowymi ścianami i płaskie u podstawy. Szyjki dojrzałych perytecjów długie i wystające ponad korę. Worki o wymiarach 37-51 x 7-12 μm, podłużne, siedzące i zgrubiałe na szczycie z wąskim ujściem; zawierające 8 zarodników workowych (askospor), o wymiarach 8-12 x 2-3 μm, dwukomórkowe, elipsoidalne, lekko zwężone w przegrodzie, czasami o nieregularnych kształtach, zawierające kroplę tłuszczu.

Z kolei, Guerrero & Godoy (1989) opisali w Chile stadium teleomorficzne na *V. corymbosum*. W tym wypadku worki były dłuższe (55-75 x 5-8 μm), a askospory większe (15-18 x 3.5-4.5 μm), jednakże inne cechy morfologiczne pozostały takie same.

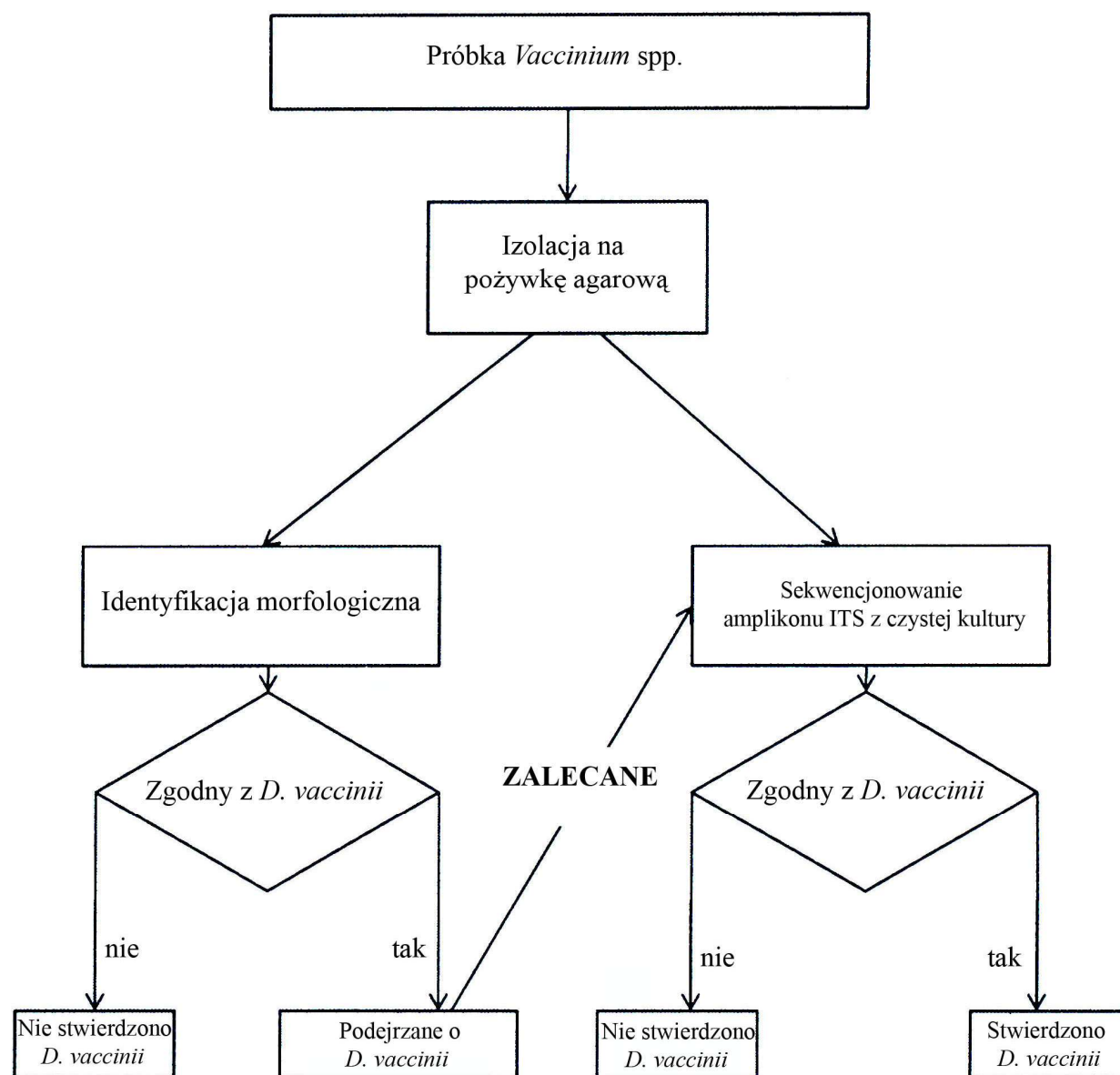
Identyfikacja morfologiczna *in vitro*

Izolacja grzyba z nadziemnych części roślin

Do identyfikacji patogen powinien zostać wyizolowany w czystej kulturze. Materiał roślinny

(liście, gałązki) z objawami chorobowymi pociąć na 1-2 cm fragmenty sterylnym skalpelem. Materiał obmyć w wodzie sterylnej, następnie zanurzyć przez 1 min w 2% roztworze NaOCl i ponownie obmyć wodą sterylną. Skrawki, po wysuszeniu, wyłożyć na pożywki agarowe, opisane poniżej.

Ryc. 5 Schemat decyzyjny do identyfikacji *Diaporthe vaccinii*



Charakterystyka wzrostu w kulturze

P. vaccinii rośnie dobrze na agarze glukozowo-ziemniaczanym (PDA), agarze słodowym (MEA) oraz agarze z nostrykiem (MSM) (Załącznik 2). Podłoże MSM jest bardziej odpowiednie do izolacji *Phomopsis/Diaporthe vaccinii* z tkanki roślinnej, a wielkość piknidiów i konidiów jest bliższa ich naturalnej wielkości. Dodatkowo, izolat może być przechowywany na tej pożywce

dłużej (do pół roku). Kolonie na PDA, MEA i MSM rosną z szybkością 10-12 mm na dzień.

Charakterystyka kultury na PDA

Kolonie *P. vaccinii* są początkowo białe, koliste i rosną do 35 mm średnicy przez 3 dni. Grzybnia powietrzna nie jest zwarta, kolonia ma regularny zarys z cieńszym marginesem (Fot. 6). Po 7 dniach kolonie osiągają średnio 60 mm średnicy, stają się lekko watowate, z niewyraźnymi koncentrycznymi pierścieniami. U niektórych szczepów, w starszych kulturach (3-4 tygodniowych) zabarwienie grzybni w centrum kolonii jest szarobiałe, ale staje się jaśniejsze, bardziej heterogeniczne i wyraźnie kosmate. U niektórych (świeżych) izolatów, średnio po 3 tygodniach inkubacji w ciemności (Fot. 7) kolor kolonii na PDA z czasem zmienia się w brązowożółty do brązowoczarne (Rayner, 1970). Grzyb dobrze rośnie w temperaturze od 20 do 28°C (optimum 25°C), zarówno na świetle, jak i w ciemności. Do sporulacji kultury powinny być inkubowane na pożywce MSM lub owsianej w cyklu 12/12 godz. światło/ciemność. Konidiomata zaczyna się tworzyć po 7-10 dniach a dojrzewa w ciągu 20-28 dni.

Charakterystyka morfologiczna

Anamorfa: *Phomopsis vaccinii*

Konidiomata jest czarna, jednokomorowa, kulista do nieregularnej, duża z szerszą podstawą, wystająca na wysokość 2/3 ponad powierzchnię pożywki, o wysokości 0,5-1,0 mm i szerokości 1,2-1,3 mm. Tworzy się pojedynczo lub czasami blisko siebie w czasie i miejscu. Z szeroko nieregularnej ostioli dojrzałych piknidiów wydobywa się kremowo zabarwiona masa zarodników (Fot. 8A). Dominują konidia typu *alfa*. Konidia te są jednokomórkowe, elipsoidalne, hialinowe, na obu końcach ostro zakończone, z dwiema kropelkami, o wymiarach 6-11 x 2,5-4 μm (średnio 8,3 x 2,9 μm). Z kolei konidia typu *beta* są jednokomórkowe, hialinowe, nitkowate, haczykowate, o wymiarach 16-24 x 1-1,5 μm (średnio 20,0 x 1,0 μm) (Fot. 8B). Konidiofory są krótkie, podzielone i rozgałęzione. Komórki konidiotwórcze proste, zwężone na szczycie, czasami wrzecionowatego kształtu, w młodych piknidiach długie (12 μm), ale w starszych dłuższe. Niektóre izolaty w kulturach przeszczepianych mogą tworzyć tylko konidia typu *alfa*.

Teleomorfa: *Diaporthe vaccinii*

Stadium teleomorficzne w kulturze opisał Wilcox (1940). W kulturach na agarze kukurydzianym askomata była wydłużona, grubościenna, z ostiolami obficie zaopatrzonymi we włoski skierowane ku górze. Worki o wymiarach 32-48 x 5,8-9,6 μm, podłużne, jajowate, bez trzonka z niewielkim ujściem. Askospory 6,4-12,8 x 2,5-4,2 μm, dwukomórkowe, z kroplami tłuszczu.

Identyfikacja za pomocą sekwencjonowania regionu ITS (KJD Hughes CSL-GB)

Tożsamość uzyskanych izolatów o cechach podobnych do *P. vaccinii* można potwierdzić przez sekwencjonowanie DNA. DNA uzyskane tylko z czystych izolatów może być testowane tą metodą. W przeciwnym wypadku, w tej samej reakcji może być poddany sekwencjonowaniu ampikon będący mieszaniną wielu organizmów. Metoda ta została opisana z Załączniku 1.

Szczepy odniesienia

Szczep wzorcowy (CBS 160.32) *D. vaccinii* jest dostępny w CBS, Utrecht, Holandia. Kulturę można również uzyskać z Sekcji Mikologii, Służby Ochrony Roślin, P.O. Box 9102, 6700 HC Wageningen (NL).

Porażony materiał gospodarza (*Vaccinium* spp.) oraz czyste kultury zostały zdeponowane w:

- Kolekcji grzybów regulowanych Badawczego Laboratorium Fitosanitarne Państwowej Służby Ochrony Roślin na Litwie, ul. Sukilelii 9A, LT-11351 Wilno, Litwa.
- Herbarium Instytutu Botanicznego i Kolekcji Czystych Kultur Mikroorganizmów, ul. Zaliujn ezerv 47, LT-2021 Wilno, Litwa.

Sprawozdawczość i dokumentacja

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

Informacje dodatkowe

Informacje dodatkowe dotyczące omawianego organizmu można uzyskać od:

Z. Jovaisiene; Phytosanitary Research Laboratory, State Plant Protection Service, Sukileliu 9a LT-11351 Vilnius (LT);

A. Kacergius; Laboratory of Phytopathogenic Microorganisms, Institute of Botany, Zaliujn ezern str. 47, LT-2021 Vilnius (LT);

K. J. D. Hughes & A.V. Barnes; Central Science Laboratory, Sand Hutton, York (GB).

J. de Gruyter & G. van Leeuwen, Plant Protection Service, National Reference Laboratory, PO Box 9102, 6700 HC Wageningen (NL).

Podziękowania

Niniejszy protokół został w oryginale opracowany przez: Z Jovaisiene, State Plant Protection Service of the Republic of Lithuania, Vilnius (LT), KJD Hughes & AV Barnes, Central Science

Laboratory, Sand Hutton, York (GB). Został poprawiony przez: G.C.M. van Leeuwen, K. Rosendahl & J. de Gruyter, National Reference Laboratory (NRL) Plant Protection Service, Wageningen (NL).

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

- Caruso F.L., Ramsdell D.C., (1995): *Phomopsis* Canker. In: *Compendium of Blueberry and Cranberry Diseases*, pp. 14-15. The American Phytopathological Society, St. Paul (US).
- Farr D.F., Castlebury L.A., Rossman A.Y., (2002a): Morphological and molecular characterization of *Phomopsis vaccinii* and additional isolates of *Phomopsis* from blueberry and cranberry in the eastern United States. *Mycologia* 94(3), 494-504.
- Farr D.F., Castlebury L.A., Rossman A.Y., Putnam M.L., (2002b): A new species of *Phomopsis* causing twig dieback of *Vaccinium vitis-idaea*. *Mycological Research* 106(6), 745-752.
- Guerrero C.J., Godoy A.I., (1989): Detection of *Phomopsis vaccinii* (Shear. Stevens and Bein) in highbush Blueberry (*Vaccinium corymbosum* L.). *Agricultura-Tecnica*. - Santiago. 49(3): 220-223.
- Hughes K.J.D., Inman A.J. & Cooke D.E.L., (2000): Comparative testing of nested PCR-based methods with bait-plant tests for detecting *Phytophthora fragariae* var. *fragariae* in infected strawberry roots from fruit crops in the UK. *Bulletin OEPP/EPPO Bulletin* 30, 533-538.
- Jovaisiene Z. & Kacergius A. (2009): Pathogenicity test and PCR-based identification of quarantine fungus *Diaporthe/Phomopsis vaccinii* in Lithuania. *Folia Cryptogamica Estonica* (in press).
- Jovaisiene Z. (2005): New fungus in Europe - *Phomopsis vaccinii* is detected on European blueberry and wild cranberry. In: *Proceedings of the XVI Symposium of Mycologists and Lichenologists of Baltic States*, pp. 81-82. Cesis (LV).
- Kacergius A., Jovaisiene Z. & Valuskaite A., (2004): *Phomopsis vaccinii* on *Vaccinium corymbosum* in Lithuania. *Botanica Lithuanica* 10(1), 75-80.
- Rayner R.W., (1970) *A mycological Colour Chart*. Commonwealth Mycological Institute, Kew (GB).
- White T.J., Bruns T., Lee S. & Taylor J., (1990): Amplification and direct sequencing of fungal ribosomal RNA genes for phylogenetics. In: *PCR Protocols, a Guide to Methods and Applications*, pp. 315-322. Academic Press, London (GB).
- Wilcox M.S., (1940): *Diaporthe vaccinii*, the ascigerous stage of *Phomopsis* causing a twig blight of blueberry. *Phytopathology* 30, 441-443.

Załącznik 1

Identyfikacja na podstawie sekwencjonowania regionu 1 i 2 wewnętrznych przerywników transkrybowanych (ITS)

- 1.1. Protokół ten został opracowany na podstawie sekwencjonowania regionu ITS rybosomowego DNA.
- 1.2. DNA izoluje się z badanej, czystej kultury.
- 1.3. Celem badania są – wewnętrzne przerywniki transkrybowane (ITS) w rRNA u grzybów.
- 1.4. Pozycja amplikonu (początek ITS 1 i koniec ITS 2).
- 1.5. Wielkość amplikonu dla *Diaporthe vaccinii* (włączając sekwencję startera) wynosi 582 pz.
- 1.6. Oligonukleotydy: Starter prawy to ITS 1 : 5' TCC GTA GGT GAA CCT GCG G 3' a starter lewy to ITS 4: 5' TCC TCC GCT TAT TGA TAT GC 3' (White i wsp., 1990).
- 1.7. Do amplifikacji stosuje się polimerazę Taq DNA w stężeniu 5 U/μl (AmpliTaq, Applied Biosystems).
- 1.8. Do wszystkich reakcji używa się wodę do analiz molekularnych.
- 1.9. Metoda ta została zwalidowana przy użyciu sprzętu ABI 9600.

2. Metody

- 2.1. Izolacja i oczyszczanie kwasu nukleinowego
 - 2.1.1. DNA izoluje się z 1 cm² fragmentu pobranego z czystej kultury badanego izolatu
 - 2.1.2. Do izolacji DNA stosuje się odpowiednie zestawy, jak np. kit do izolacji DNA z roślin NucleoSpin (Macherey-Nagel, Diiren, Germany, cat. ref. 740 570.250) lub izolację przeprowadza zgodnie z metodą tradycyjną, jak ta opisana przez Hughes i wsp. (2000).
 - 2.1.3. Wyizolowane DNA do badań bieżących przechowuje się w temp. 4°C. Jeśli badanie nie będzie przeprowadzane tego samego dnia to w temp. -20°C.
- 2.2. Reakcja łańcuchowa polimerazy (PCR)
 - 2.2.1. Całkowita objętość mieszaniny reakcyjnej dla pojedynczej reakcji wynosi 100 μl
 - 2.2.2. 60,5 μl wody do analiz molekularnych
 - 2.2.3. 10 μl 10x buforu PCR (Applied Bioscience)
 - 2.2.4. 8,0 μl 10 mM dNTPs
 - 2.2.5. 2,5 jednostki Taq polimerazy
 - 2.2.6. 0,5 μM startera ITS 1
 - 2.2.7. 0,5 μM startera ITS4
 - 2.2.8. 1,0 μl ekstraktu DNA
 - 2.2.9. Amplifikację przeprowadza się w probówkach PCR, w termocyklerze zaprogramowanym

następująco: 2 min w 94°C; 30 cykli 1 min w 94°C, 1 min w 53°C, 1,5 min w 72°C. Końcowy cykl wydłużania przez 10 min w 72°C.

2.3. Sekwencjonowanie amplikonów

W celu sprawdzenia reakcji PCR rozdzielić 10 µl zamplifikowanej mieszaniny na 1,5% żelu agarozowym. Pozostałe 90 µl oczyścić z użyciem odpowiedniego zestawu do oczyszczania PCR takich, jak QIAquick PCR (Qiagen, Crawley, UK, Cat. ref. 28106) postępując zgodnie z instrukcją producenta. Sekwencjonować z uniwersalnymi starterami dla grzybowego rDNA (ITS1 i ITS4).

3. Istotne informacje proceduralne

3.1. Amplifikacja i analiza

Jeśli to konieczne, to wyizolowane DNA odmrozić, przygotować wystarczającą ilość mieszaniny reakcyjnej i co najmniej jedną próbkę nieznanego izolatu, kontrolę pozytywną zawierającą namnożone DNA, a jako kontrolę negatywną do mieszaniny reakcyjnej stosować raczej wodę do analiz molekularnych aniżeli DNA.

3.2. Próbkę rozwinąć na 1,5% żelu agarozowym.

3.3. Porównać zgodność sekwencji dla badanych próbek (wyłączając sekwencję startera) z potwierdzonym szczepem *D. vaccinii* jak CBS 160.32, (GenBank ref AY952141) w bazie danych Banku Genów (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov>). Poziom podobieństwa powinien mieścić się w zakresie od 99 do 100%.

Załącznik 2

Skład pożywki MSM – podłoże hodowlane z nostrzykiem (*Melilotus* sp.) (zmodyfikowane przez Jovaisiene, 2009)

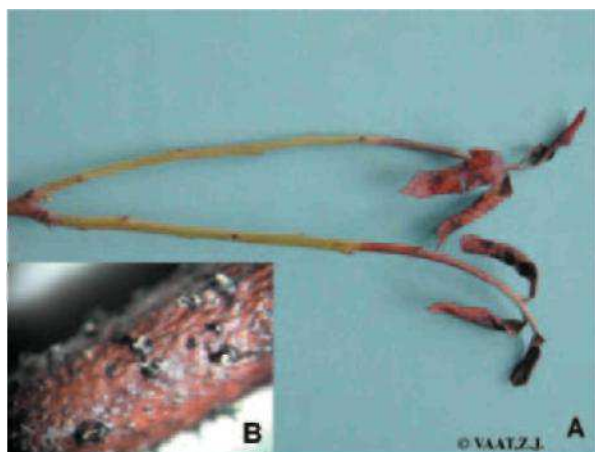
Suche łodygi nostrzyka 40 g

Agar techniczny nr 3 (Oxoid) 12 g

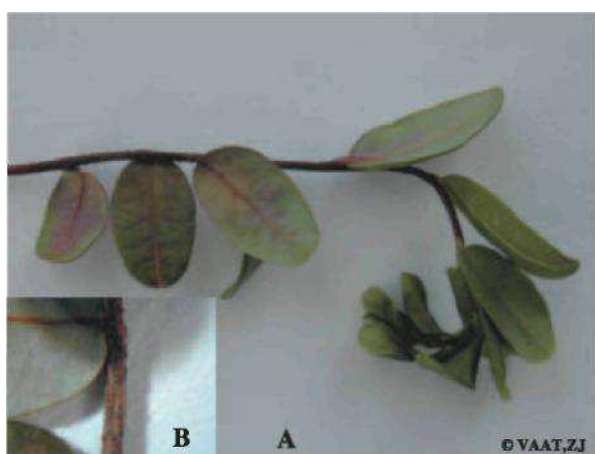
Woda destylowana do 1000 ml

Podłoże mieszać na mieszadle (~500 obrotów /min) i podgrzewać w temp. 100°C przez 60 min.

Następnie sterylizować przez 15 min., w temp. 110°C.



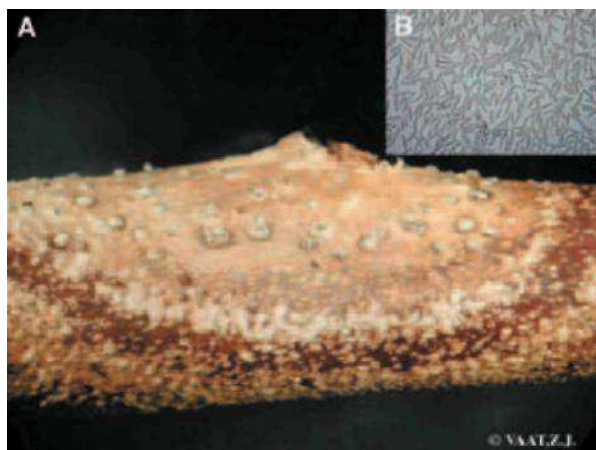
Fot. 1 (A) Objawy *Phomopsis* (*Diaporthe vaccinii*) na gałązkach *Vaccinium corymbosum*. **(B)** Konidiomata na pędach borówki.



Fot. 2 (A) Objawy powodowane przez *Phomopsis* (*Diaporthe vaccinii*) na gałązkach i liściach *Vaccinium macrocarpon*. **(B)** Konidiomata na pędach żurawiny (test w komorze wilgotnej).



Fot. 3 Owoce żurawiny z objawami lepkiej zgnilizny powodowanej przez *Phomopsis* (*Diaporthe vaccinii*) (po prawej sztuczna inokulacja) i zdrowe owoce (po lewej).



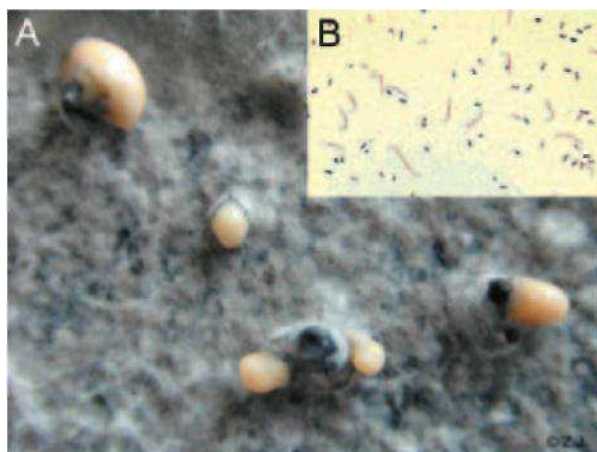
Fot. 4 (A) Typowe nekrozy powodowane przez *Fusicoccum putrefaciens* (x10). **(B)** Konidia (x400).



Fot. 6 Kolonie *Phomopsis vaccinii* na różnych podłożach hodowlanych: nr 1, MEA; nr 2, PDA; nr 3, MIX; nr 4, agar wodny (WA) po 3 dniach i 12/12 h światło / ciemność.



Fot. 7 Kolonie świeżych izolatów *Phomopsis vaccinii* na podłożu PDA (17 dni, inkubacja w ciemności)



Fot. 8 (A) Masa zarodników wypływająca z konidiomaty *Phomopsis vaccinii* (x20). (B) Konidia alfa i beta (x200).