

Metodyka pobierania prób materiału szkółkarskiego do oceny laboratoryjnej na obecność *Exobasidium vaccinii*

Testowane rośliny: **Borówka wysoka - *Vaccinium L.***

Termin pobierania prób

Oceny polowej materiału szkółkarskiego kategorii elitarny w stopniu przedbazowy oraz elitarny w stopniu bazowy dokonuje się dwa razy w roku w trakcie sezonu wegetacyjnego, natomiast kategorii kwalifikowany oraz CAC raz w roku. W przypadku podejrzenia wystąpienia objawów wywoływanych przez grzyba *Exobasidium vaccinii* podczas polowej oceny wizualnej materiału szkółkarskiego, należy pobrać próby ze wszystkich kategorii i stopni kwalifikacji oraz wykonać ocenę laboratoryjną na obecność *E. vaccinii* (Rozporządzenie Ministra Rolnictwa i Rozwoju Wsi z dnia 31 marca 2017 r. w sprawie szczegółowych wymagań dotyczących wytwarzania i jakości materiału szkółkarskiego; Dz.U. 2017 poz. 757 z późniejszymi zmianami). Próby do badań należy pobierać w okresie od połowy lipca do końca października.

Wybór tkanki/części rośliny

Grzyb *E. vaccinii* jest sprawcą czerwonej plamistości liści borówki wysokiej. Objawy choroby w postaci nieregularnych, czerwonych plam często obejmujące całą powierzchnię liścia są widoczne na krzewach w połowie lata. Do zmiany zabarwienia blaszki liściowej dochodzi na pojedynczych pędach lub na kilku pędach krzewu. Porażone liście są pogrubione i pofałdowane. Na poziomie komórkowym liczba chloroplastów jest wyraźnie zmniejszona. Czerwony pigment jest ograniczony do górnego naskórka i palisadowych komórek mezofilu. Na spodniej stronie liścia w miejscu przebarwień tworzy się zbita warstwa białej grzybni *E. vaccinii*. Po zarodnikowaniu grzyba porażone części liścia brązowieją i wysychają. Zainfekowane rośliny zawiązują mniej owoców i powoli zamierają w okresie kilku lat (Bristow, 2017).

E. vaccini zimuje w roślinie – gospodarzu. Poraża rośliny z rodziny wrzosowatych, w tym gatunki z rodzajów *Vaccinium*, *Rhododendron* i *Camelia*. Nie wiadomo, czy patogen przemieszcza się systemicznie w roślinie. Liście na nowych przyrostach wyrastających z wcześniej zainfekowanych łodyg zwykle rozwijają objawy czerwonej plamistości liści. Źródłem inokulum dla uprawy borówki wysokiej są dziko rosnące

gatunki roślin z rodziny wrzosowatych. Rozwojowi choroby sprzyjają chłodne, wilgotne warunki oraz stosowanie wysokich dawek nawozów azotowych.

Do testów na obecność grzyba *E. vaccinii* zalecane jest pobranie pędów borówki wysokiej z liśćmi wykazującymi objawy choroby.

Sposób pobierania prób

Przy pobieraniu próbek należy kierować się następującymi ogólnymi zasadami:

1. W pierwszej kolejności należy pobrać pędy z liśćmi wykazującymi objawy czerwonej plamistości liści borówki wysokiej.
2. Wskazane jest oznaczenie (zaetykietowanie) roślin, z których pobrano próby, chyba, że identyfikacja jest możliwa na podstawie istniejącego oznakowania lub szczegółowego planu nasadzenia.
3. Pobrany materiał należy zapakować do trwale oznakowanych foliowych torebek i szczelnie zamknąć. W przypadku wyższych temperatur (powyżej 25°C) zaleca się umieszczenie prób w tzw. lodówce turystycznej, pojemniku styropianowym albo "torbie na mrożonki" z wkładem chłodzącym. Nie dopuszczać do zamrożenia prób!

Pobrane próby należy przekazać do badań laboratoryjnych załączając zlecenie na wykonanie badań laboratoryjnych (formularz można pobrać ze strony internetowej Państwowej Inspekcji Ochrony Roślin i Nasiennictwa, www.gov.pl/piorin) . Dodatkowo należy sporządzić i przechowywać przez 3 lata kopię "Zlecenia" oraz pisemną informację zawierającą dodatkowe dane, o ile nie zostały podane w "Zleceniu":

Data pobrania próby (dd mm rrrr)	
Dane producenta <ul style="list-style-type: none">• Imię i nazwisko• Adres kontaktowy• Telefon• Adres e-mail	
Adres plantacji	
Rodzaj uprawy (gatunek, odmiana, ew. typ, wiek roślin)	
Rodzaj pobranego materiału (na przykład: liście)	
Plan (szkic) lub opis umożliwiający jednoznaczne odnalezienie roślin w terenie, z których pobierano próby	
Dodatkowe informacje dotyczące m.in. występowania podejrzanych symptomów, chorób, szkodników, lub rozpoznanych źródeł infekcji w pobliżu badanych roślin	

Metody laboratoryjne badania obecności *E. vaccinii*

Po dostarczeniu do laboratorium próby materiału roślinnego należy umieścić w chłodzie (+4°C do +10°C). Próby mogą być przechowywane w lodówce (chłodni) maksymalnie przez okres kilku dni.

Badania na obecność patogena w materiale roślinnym można przeprowadzić w dwóch etapach: (1) wykrywanie grzyba bezpośrednio w porażonym materiale, (2) izolacja i hodowla grzyba na pożywce agarowej, a następnie jego identyfikacja na podstawie morfologii oraz reakcji PCR.

1) Wykrywanie grzyba bezpośrednio w porażonym materiale. (a) Jeśli sadzonki wykazują objawy w postaci przebarwiania się liści, a na ich spodniej stronie nie obserwuje się jeszcze białego nalotu grzybni należy umieścić je w warunkach wysokiej wilgotności powietrza i temperatury nieznacznie powyżej 20°C w celu stymulacji zarodnikowania. (b) Jeżeli na porażonej tkance obecne są struktury zarodnikotwórcze (Mims & Richardson, 1987) jak np. podstawki, z których wydostają się zarodniki podstawkowe, należy pobrać końcówką sterylnej igły grzybnię z zarodnikami i umieścić ją w kropli wody destylowanej na szkiełku podstawowym, w celu obserwacji morfologii zarodników pod mikroskopem optycznym.

2) Fragmenty materiału roślinnego z pobranych prób umieszcza się na pożywce ziemniaczano – glukozowej PDA i inkubuje w świetle w temperaturze około 20°C. Po 7 dniach określa się cechy morfologiczne kultur *E. vaccinii*, które wyrosły z fragmentów tkanki roślinnej wyłożonych na pożywkę (Bristow, 2017). Do identyfikacji patogena wykorzystuje się również metody bazujące na analizie DNA. Do izolacji kwasów nukleinowych, zarówno z czystych kultur grzyba, jak i materiału roślinnego z wyraźnymi objawami choroby, można wykorzystać komercyjne zestawy jak np. GeneMATRIX Plant & Fungi DNA Purification Kit (EURx). W każdym przypadku należy stosować się do zaleceń producenta. Z uzyskanym DNA grzyba należy przeprowadzić reakcję PCR ze starterami ITS1: 5' TCC GTA GGT GAA CCT GCGG 3' oraz ITS2: 5' GCT GCG TTC TTC ATC GATGC 3' (White i in., 1990), a następnie odczytać sekwencję produktu i porównać ją z wynikami dostępnymi w bazie danych GenBank dla grzyba *E. vaccinii*. Warunki do przeprowadzenia reakcji PCR ze starterami do regionów ITS oraz DNA *E. vaccinii*, jak i stężenia poszczególnych reagentów zostały wymienione w publikacji White i in., (1990).

Literatura:

Bristow P.R. (2017). Compendium of blueberry, cranberry, and lingonberry diseases and pests (No. Ed. 2). American Phytopathological Society (APS Press).

Mims C.W., & Richardson E.A. (1987). An ultrastructural study of the asexual spores of the plant pathogenic fungus *Exobasidium vaccinii*. Botanical Gazette 148: 228-234.

White T.J., Bruns T., Lee S., & Taylor J. (1990). Amplification and direct sequencing of fungal ribosomal RNA sequencing of fungal ribosomal RNA genes for phylogenetics. W: PCR Protocols: A Guide to Methods and Applications. Innis M.A., Gelfand D.H., Sninsky J.J., White T.J. (ed.) Academic Press, San Diego, CA.: 315-322.

Objaśnienia skrótów użytych w tekście:

PCR = Polymerase Chain Reaction = reakcja łańcuchowa polimerazy

Opracowanie: dr inż. Anna Poniatowska, e-mail: anna.poniatowska@inhort.pl