



spv | dpa

SAGTEVRUGTEPLANTVERBETERINGSVERENIGING
DECIDUOUS FRUIT PLANT IMPROVEMENT ASSOCIATION

SPV F-1-1

TOETSLABORATORIUMS

(Soos gewysig op 22 November 2016)

INHOUDSOPGAWE

1.	REGISTRASIE VAN TOETSLABORATORIUMS	2
2.	VOORSKRIFTE VIR TOETSLABORATORIUMS	2
3.	PLANTVERBETERINGSVEREISTES TEN OPSIGTE VAN VIRUSUITSKAKELING	4
4.	ELISA ONDERSOEKE	4
5.	PKR ONDERSOEKE	6

1. REGISTRASIE VAN TOETSLABORATORIUMS

- 1.1 'n Laboratorium moet by die Departement van Landbou (NDL) as 'n toetslaboratorium vir plante geregistreer wees en moet voldoen aan die vereistes wat ingevolge die Plantverbeteringswet voorgeskryf word alvorens 'n laboratorium by die SPV geregistreer kan word.
- 1.2 Elke PVO moet die SPV in kennis stel van watter laboratoriums gebruik word om toetse uit te voer ten opsigte van elke patogeen, insek of virus soos voorgeskryf in die Skema.
- 1.3 Indien 'n laboratorium nie reeds ten opsigte van 'n spesifieke patogeen, insek of virus by die SPV geregistreer is nie, moet die betrokke PVO daarvoor aansoek doen.
- 1.4 Laboratoriums waarvoor aansoek gedoen word moet aan die hand van die voorskrifte in Afdeling 2 deur die aangewese paneel beoordeel word, wat hul verslag aan die Tegniiese Komitee en Raad moet voorlê vir goedkeuring.
- 1.5 Toetse in terme van die Skema kan slegs namens 'n PVO uitgevoer word deur 'n laboratorium wat ten opsigte van die spesifieke toets by die SPV geregistreer is.
- 1.6 Laboratoriums word by die Raad geregistreer op grond van die toerusting en die bevoegdheid van die personeel wat die toetse op daardie stadium uitvoer. Enige verandering of uitbreiding ten opsigte van apparaat en kundigheid van personeel moet by die Raad aangemeld word.
- 1.7 Geregistreeerde laboratoriums moet oor die nodige gedokumenteerde literatuur en verwysings beskik ten einde die verskillende swamme en bakterieë te kan identifiseer.
- 1.8 Geregistreeerde laboratoriums moet oor die voorskrifte van die goedgekeurde ELISA verskaffers beskik ten opsigte van die virussiektes waarvoor getoets word.
- 1.9 Alle apparate moet as deel van die laboratorium praktyke in 'n goeie toestand gehou word en diensrekords moet beskikbaar wees as bewys dat analitiese weegskale en ander apparate op 'n gereelde basis geyk word.
- 1.10 Alle geregistreeerde laboratoriums ten opsigte van Kern- en Steenvrugte moet jaarliks gedurende Oktober geoudit word ten opsigte van die voorgeskrewe ELISA toetse.

2. VOORSKRIFTE VIR TOETSLABORATORIUMS

Om te registreer moet 'n laboratorium oor die volgende diagnostiese toets apparate ten opsigte van virusse, patogene en insekte beskik:

2.1. Virusse

2.1.1. ELISA toetse

- pH meter
- Weegskaal (0-300g; 2 desimaal)
- Inkubator (37°C)
- Elektroniese ELISA-plaatleser (405 nm)

2.2. Swamme

- Laminêre vloeikabinet
- Outoklaaf
- Weegskaal (0-300g; 2 desimaal)
- pH meter
- Groeikamer of inkubator vir isolasies (23 – 25°C)
- Stereomikroskoop (40X)
- Ligmikroskoop (1000X)
- Nuutste gepubliseerde ID sleutels vir betrokke organisme moet gedokumenteer wees in betrokke laboratorium.

2.3. Bakterieë

- Laminêre vloeikabinet
- Outoklaaf
- Weegskaal (0-300g; 2 desimaal)
- pH meter
- Groeikamer of inkubator vir isolasies (23 – 25°C)
- Ligmikroskoop (1000X)
- Nuutste gepubliseerde ID sleutels vir betrokke organisme moet gedokumenteer wees in betrokke laboratorium.

2.4. Nematodes

- Siwwe:
 - Stapel van drie vlekvrige staal of koper siwwe.
 - 4mm siwwe
 - 90µm polyethylene-ondersteunende siwwe
- Stereomikroskoop (16X, 25X)
- Lig Mikroskoop met 'n natrekbuis (10X, 100X & 10X oogstuk)
- Temperatuur beheerde oond (40°C)
- Dessikator
- Verwysing skyfies vir eksemplare.

2.5. Insekte

- Stereomikroskoop (40X)
- Nuutste gepubliseerde ID sleutels vir betrokke organisme moet gedokumenteer wees in betrokke laboratorium.

3. PLANTVERBETERINGSVEREISTES TEN OPSIGTE VAN VIRUS UITSKAKELING

3.1. Hitteterapie en Weefselkultuur

- Hitteterapie-eenheid (40°C)
- Laminêre vloeikabinet
- Outoklaaf
- Weegskaal (0-300g; 2 desimaal)
- pH meter
- Groeikamer of inkubator (23 – 25°C)
- Stereomikroskoop (40X)

3.2. Somatiese Embriogenese en Weefselkultuur

- Laminêre vloeikabinet
- Outoklaaf
- Weegskaal (0-300g; 2 desimaal)
- pH meter
- Groeikamer of inkubator (23 – 25°C)

3.3. Kweekhuis

- Moet voldoen aan vereistes soos vir Kerneenheid ingevolge die Skema

4. ELISA ONDERSOEKE

4.1 Inleiding

ELISA is 'n akroniem vir “Enzyme Linked Immuno-Sorbent Assay.” Dis die mees algemene serologiese toets wat gebruik word vir die opsporing van plantvirsse.

Daar is twee tipes ELISA toetse wat algemeen gebruik word:

1. DAS ELISA (Double Antibody Sandwich)
2. Indirekte ELISA toets

4.2 DAS ELISA metode

Die metode word vir die opsporing van meeste plantvirsse gebruik en kan soos volg opgesom word:

- (a) Suiwer IgG teen 'n spesifieke virus word op die oppervlak van die ELISA plaat vasgevang.

- (b) Homogene viruspartikels word deur die IgG verbind terwyl nie-spesifieke partikels weggespoel word.
- (c) E-IgG (ensiemkonjugaat) word bygevoeg en bind aan die vasgevangene viruspartikels. Oormatige E-IgG word weggespoel.
- (d) 'n Ensiemsubstraat word bygevoeg om die vasgebinde E-IgG op te spoor en vorm 'n geel kleurreaksie.

4.3 Indirekte ELISA metode

Die Indirekte ELISA metode verskil nie baie van die DAS ELISA metode nie, behalwe dat twee antiliggam inkubasies volg na toevoeging van die plantsap.

- (a) Virus antiliggam A word by plaat gevoeg en bind aan oppervlak.
- (b) Plantsap word bygevoeg
- (c) Byvoeging van virus antiliggam B.
- (d) Anti-B globulien word bygevoeg ('goat anti-rabbit IgG')
- (e) Byvoeging van ensiemsubstraat

4.4 Algemene ELISA protokol

Voorskrifte soos voorgeskryf deur elke verskaffer moet gevolg word
[soos gewysig 25 Maart 2009]

4.5 ELISA vir nie-kwarantyn virusse

4.5.1 APPELS

VIRUS	AFKORTING	VERSKAFFER
Apple chlorotic leafspot trichovirus	ACLSV	Bioreba
Apple stem grooving capillovirus	ASGV	Bioreba
Apple mosaic ilarvirus	ApMV	Bioreba

4.5.2 PERE

VIRUS	AFKORTING	VERSKAFFER
Apple chlorotic leafspot trichovirus	ACLSV	Bioreba
Apple stem grooving capillovirus	ASGV	Bioreba

4.5.3 CYDONIA

VIRUS	AFKORTING	VERSKAFFER
Apple chlorotic leafspot trichovirus	ACLSV	Bioreba
Apple stem grooving capillovirus	ASGV	Bioreba

4.5.4 STEENVRUGTE

VIRUS	AFKORTING	VERSKAFFER
--------------	------------------	-------------------

Apple chlorotic leafspot trichovirus	ACLSV	Bioreba
Apple mosaic ilavirus	ApMV	Bioreba
Prune dwarf ilavirus	PDV	Bioreba
Prunus necrotic ringspot ilavirus	PNRSV	Bioreba

5. PKR ONDERSOEKE

5.1 Inleiding

Die polimerasekettingreaksie (PKR) is 'n metode vir die amplifisering van DNS met die hulp van 'n DNS polimerase ensiem en DNS voorvoerders. Geskikte voorvoerders sal voorgestel en jaarliks hersien word deur die Tegnieese Komitee. Die proses word algemeen gebruik as 'n diagnostiese toets om die teenwoordigheid van patogeen-nukleiensure te bepaal. Vir organismes met DNS genome word PKR direk gebruik, maar vir virusse met RNS genome moet die RNS vanaf 'n monster eers omgeskakel word na DNS deur middel van 'n tru-transkripsie reaksie, na die metode word verwys as TT-PKR of "*Reverse-transcription PCR*" (RT-PCR).

5.2 TT-PKR

Die metode word vir die opsporing van meeste plantvirusse gebruik en kan soos volg opgesom word:

- a) Toepaslike plantmonsters word geneem waaruit RNS gesuiwer word. Verskeie metodes is beskikbaar vir die stap en kan deur die diensverskaffer bepaal word.
- b) RNS word aan kwaliteitsbeheer blootgestel en hoë kwaliteit RNS word gebruik vir die diagnostiese toets.
- c) Voorvoerders word ontwerp wat aan spesifieke virusse of virusgroepe se genome kan bind. Die afstand (in basispare) tussen voorvoerders bepaal die grootte van die amplifikasie produk (amplikon).
- d) RNS word in 'n TT reaksie omgeskakel in komplementêre- of kopie-DNS (kDNS).
- e) Die kDNS word dan met behulp van voorvoerders in 'n PKR vermeerder indien die virus in die monster teenwoordig is.
- f) Die produk van 'n positiewe TT-PKR kan op twee maniere bepaal word:
 - i. Die vermeerderde DNS kan op 'n agarose gel onder elektriese stroom geskei word en vertoon dan as 'n band op die gel waarvan die grootte bepaal kan word, as dit gekleur (EtBr) en aan UV lig blootgestel word;

- ii. Die TT-PKR kan ook in 'n In-tyd PKR-masjien opgestel word waar die vermeerdering van DNS in-tyd, op 'n rekenaar, gemonitor word.

5.3 PKR toetse vir Skemavirusse en viroïede

VIRUS	AFKORTING
Apple chlorotic leafspot trichovirus	ACLSV
Apple mosaic ilavirus	ApMV
Apple stem grooving capillovirus	ASGV
Apple stem pitting virus	ASPV
Prune dwarf ilarvirus	PDV
Prunus necrotic ringspot ilarvirus	PNRSV
Plum viroid I	PVd-I