

Charakterystyka właściwości biologicznych i genetycznych izolatów wirusa cętkowanej plamistości liści truskawki (*Strawberry mottle virus*)



Mirosława Cieślińska, Instytut Ogrodnictwa

WSTĘP

Wirus cętkowanej plamistości liści truskawki (*Strawberry mottle virus*, SMOV) jest jednym z najczęściej występujących wirusów truskawki w Europie. Rośliny truskawki zwykle nie wykazują objawów SMOV, jednak wirus powoduje obniżenie plonu owoców o ok. 30% (Mellor i Krczal, 1987). Do niedawna, do wykrywania SMOV stosowano pracochłonne i czasochłonne testy biologiczne. Po odczytaniu sekwencji nukleotydów genomu SMOV, alternatywą dla tych testów stały się metody oparte na detekcji kwasów nukleinowych patogena, a wśród nich - RT-PCR (Thompson i in., 2002; 2003).

CELEM badań była określenie zróżnicowania izolatów SMOV porażających truskawkę.

MATERIAŁY I METODY

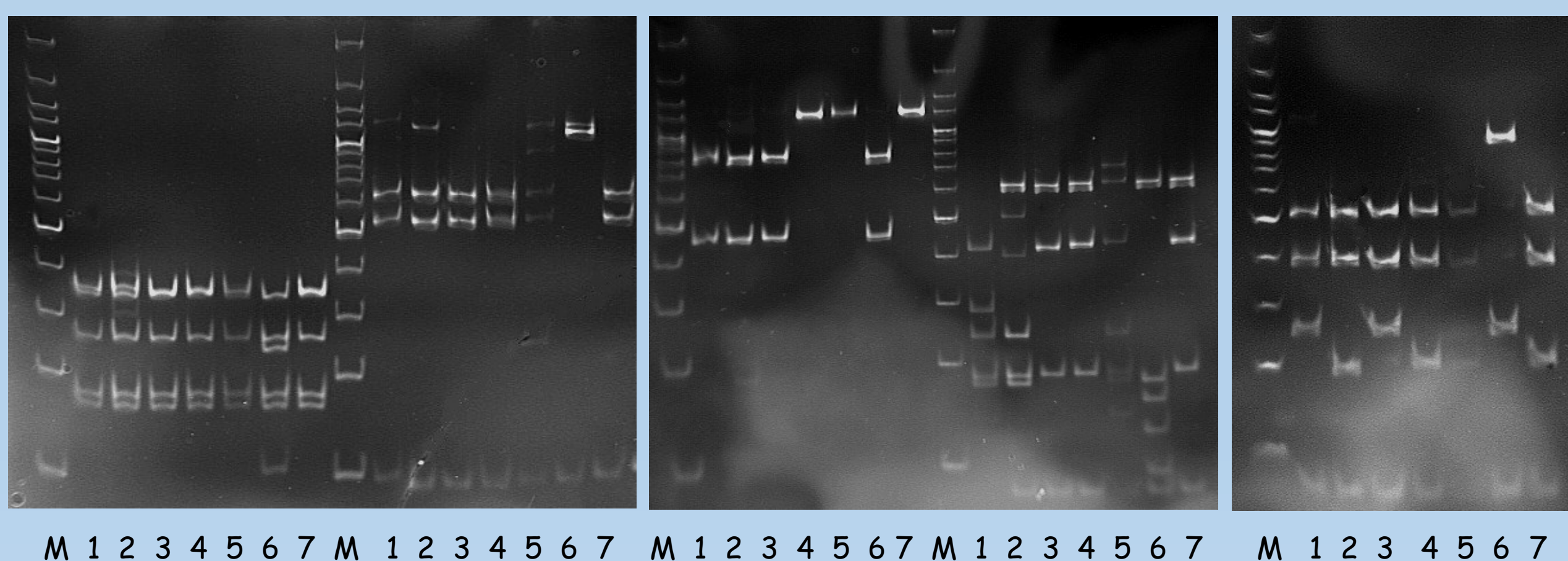
Kwasy nukleinowe izolowano metodą adsorpcji na żelu krzemionkowym (SC) z liści siedmiu roślin poziomki *Fragaria vesca* lub *F. virginiana* sztucznie zakażonych izolatami SMOV. RT-PCR przeprowadzono z zastosowaniem własnych staterów specyficznych dla fragmentu RNA2 wirusa. Przeprowadzono analizę długości fragmentów restrykcyjnych (RFLP) po trawieniu uzyskanych produktów RT-PCR enzymami *BfaI*, *FauI*, *HaeIII*, *HincI* i *TaqI*. Fragmenty RNA2 siedmiu izolatów SMOV zsekwencjonowano, a odczytane sekwencje analizowano przy użyciu programów Lasergene 7.1 (DNASTAR). Analizę filogenetyczną badanych sekwencji nukleotydów RNA2 wirusa oraz czterech analogicznych sekwencji SMOV zdeponowanych w GenBank, przeprowadzono metodą największej wiarygodności wykorzystując program MEGA 5.2. Jako grupy zewnętrznej użyto sekwencji RNA2 *Satsuma dwarf virus* (nr dostępu GenBank: AB009959).

W celu oceny reakcji na porażenie izolatami SMOV, rośliny *Chenopodium quinoa*, *Ch. amaranticolor*, *Nicotiana tabacum* 'Samsun', *N. occidentalis* 37B i *N. benthamiana* inokulowano mechanicznie sokiem z liści *F. vesca* lub *F. virginiana* zakażonych wirusem.

WYNIKI I DISKUSJA

Na podstawie wyników RT-PCR potwierdzono obecność SMOV w siedmiu roślinach poziomki z objawami cętkowanej plamistości liści. Analiza RFLP wykazała polimorfizm długości fragmentów restrykcyjnych w obrębie fragmentu RNA2 badanych izolatów wirusa. Uzyskano sześć różnych profili po trawieniu produktów RT-PCR enzymami *BfaI*, *FauI*, *HaeIII*, *HincI* i *TaqI*. (Rys. 1, Tab. 1).

Podobieństwo sekwencji fragmentu RNA2 o długości 1982 nukleotydów siedmiu polskich izolatów SMOV wynosiło 93-98%, przy czym największe różnice występowały pomiędzy izolatami CRR i Pegat. Analiza porównawcza odczytanych sekwencji nukleotydów wykazała, że były one podobne w 89-93% do analogicznych sekwencji szczepów wirusa z Holandii (GenBank: AJ311876) i Kanady (KU200454, KU200459, KU177219).



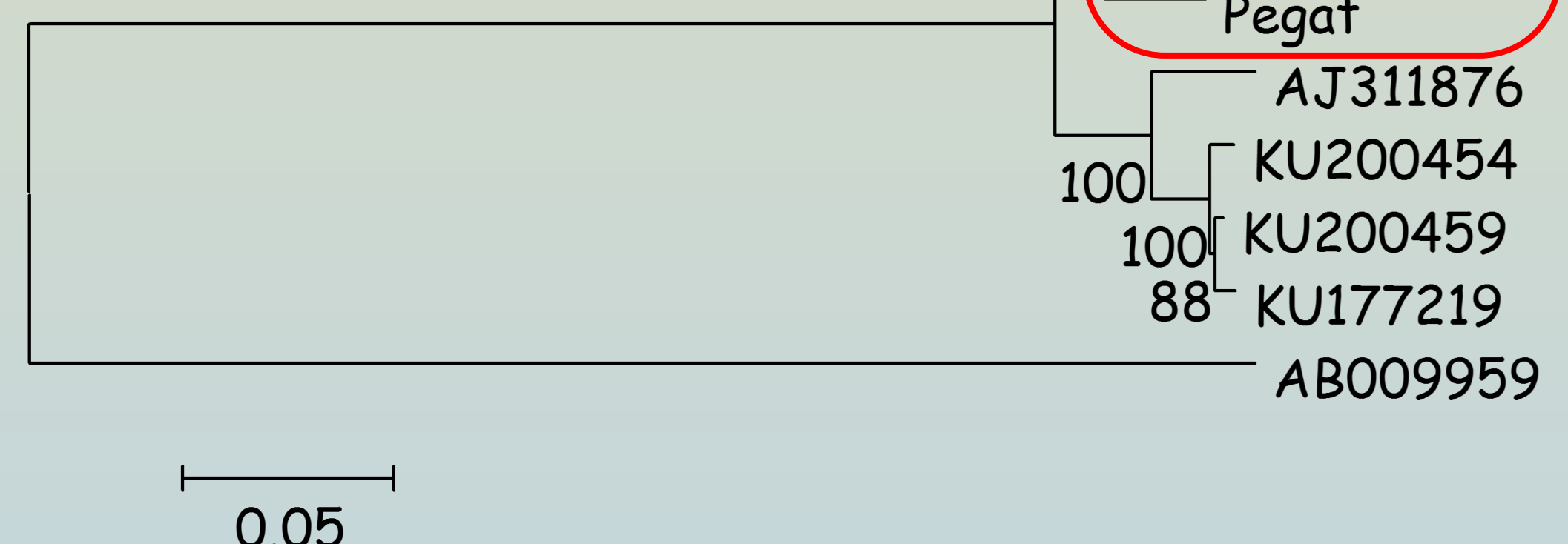
Rys. 1. Rozdział elektroforetyczny fragmentów RNA2 izolatów SMOV trawionych enzymami restrykcyjnymi *BfaI*, *FauI*, *HincI*, *TaqI* i *HaeIII*. M - marker wielkości, 1 - CRR, 2 - Grandarosa, 3 - Markat, 4 - Pink Rosa, 5 - karkas 1.4, 6 - Pegat, 7 - Granat

Tabela 1. Zróżnicowanie profili restrykcyjnych otrzymanych po trawieniu fragmentów RNA2 izolatów wirusa cętkowanej plamistości liści truskawki (SMoV).

Enzym	<i>BfaI</i>	<i>FauI</i>	<i>HaeIII</i>	<i>HincI</i>	<i>TaqI</i>	Profil
Izolat						
CRR	A	A	A	A	A	I
Grandarosa	A	B	B	A	B	II
Markat	B	B	A	A	C	III
Pink Rosa	B	B	B	B	C	IV
Karkas 1.4	B	B	B	B	B	V
Pegat	C	C	C	A	D	VI
Granat	B	B	B	B	C	IV

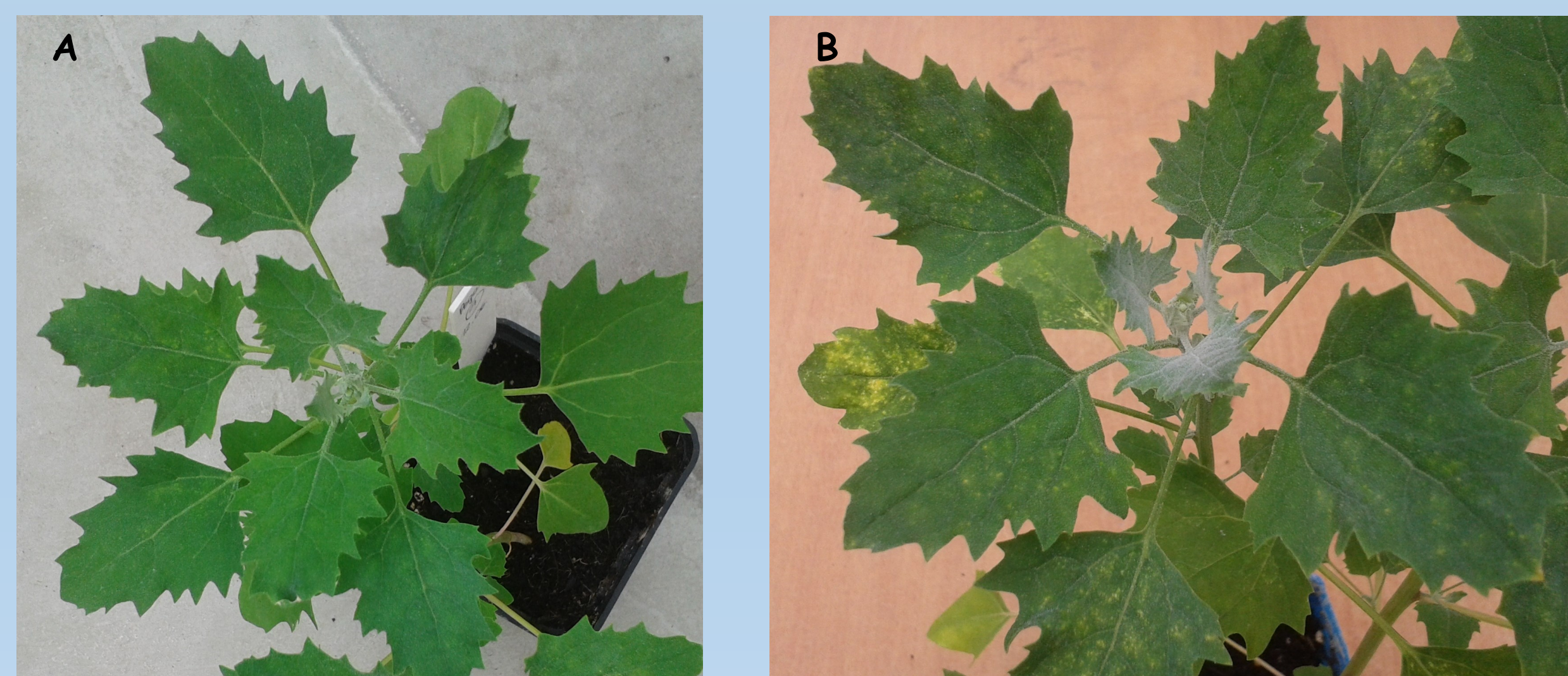
Polskie izolaty SMOV grupowały się na oddzielnej gałęzi drzewa filogenetycznego, niż szczepy wirusa pochodzące z Holandii i Kanady (Rys. 2).

Rys. 2. Dendrogram przedstawiający podobieństwo genetyczne fragmentów RNA2 badanych izolatów (w czerwonej ramce) i analogicznych sekwencji szczepów SMOV pochodzących z bazy danych GenBank.



Objawy wywołane przez badane izolaty SMOV na roślinach *Chenopodium quinoa* były zróżnicowane. Wyraźne zmiany chorobowe obserwowano jedynie po inokulacji tych roślin sokiem z liści poziomki zakażonych izolatem Markat. W przypadku innych izolatów wirusa, na *C. quinoa* występowały tylko niewielkie przebarwienia, albo nie obserwowano żadnych objawów (Rys. 3). Wyniki tych badań świadczą o zróżnicowaniu właściwości biologicznych izolatów SMOV.

Wykorzystując technikę RT-PCR, potwierdzono obecność siedmiu izolatów SMOV w inokulowanych *C. quinoa*. W roślinach pozostałych gatunków *Chenopodium* i *Nicotiana* nie wykryto wirusa i nie obserwowano też na nich objawów chorobowych.



Rys. 3. Zróżnicowane objawy chorobowe na liściach roślin *Chenopodium quinoa* inokulowanych mechanicznie izolatami SMOV Pegat (A) i Markat (B).

LITERATURA: Mellor i Krczal, 1987. USDA, Agricult. Handbook No. 631; Thompson i Jelkmann, 2003. Plant Disease, 87: 385-390; Thompson i in., 2002. J. Gen. Virol., 83: 229-239.

Badania realizowano w ramach zadania 1.5 Programu Wieloletniego na lata 2015-2020 pt.: „Działania na rzecz poprawy konkurencyjności i innowacyjności sektora ogrodniczego z uwzględnieniem jakości i bezpieczeństwa żywności oraz ochrony środowiska naturalnego”, finansowanego przez Ministerstwo Rolnictwa i Rozwoju Wsi.