

Zadanie 7.5. Prowadzenie kolekcji wirusów i patogenów wirusopodobnych roślin sadowniczych i ozdobnych

Kierownik zadania: dr M. Cieślińska

Wykonawcy: prof. dr hab. M. Kamińska, dr J. Puławska, D. Starzec, T. Smolarek

Latem 2011 r. pobierano oczka z porażonych drzew czereśni, wiśni i śliwy, które okulizowano na podkładkach: czereśni ptasiej F12/1 (dla czereśni), antypki (dla wiśni i czerechy) i ałyczy (dla śliwy). Do kolekcji drzew pestkowych utrzymywanej w szklarni i karkasach wprowadzono 30 nowych izolatów wirusów i fitoplazm w tym: 9 izolatów PNRSV*, 4 izolaty PDV, 4 izolaty LChV-1, 3 izolaty CGRMV, 3 izolaty '*Candidatus Phytoplasma prunorum*', 1 izolat '*Candidatus Phytoplasma pyri*', 1 izolat CNRMV, 1 izolat CLRV, 1 izolat ACLSV, 1 izolat CVA, 1 izolat LChV-2, 1 izolat PPV ze śliwy. Łącznie do kolekcji utrzymywanej w szklarni i karkasach włączono 50 nowych drzewek pestkowych w tym: 26 czereśni, 12 wiśni, 9 śliw i 3 czerechy. Każdy izolat wirusów i fitoplazm jest utrzymywany w 2-3 roślinach odpowiedniego gatunku *Prunus*. Niektóre z drzew pestkowych porażone są przez kilka różnych wirusów.

Testy na obecność wirusów PNRSV, PDV, ACLSV i PPV w badanych drzewach pestkowych wykonano metodą ELISA z zastosowaniem przeciwciał specyficznych dla każdego z wymienionych wirusów. Obecność CLRV, CNRMV, LChV 1 i 2, CGRMV, CVA oraz fitoplazm wykrywano metodą RT-PCR (w przypadku wirusów) oraz dwuetapowej reakcji PCR (w przypadku fitoplazm) z zastosowaniem starterów specyficznych dla wybranych sekwencji poszczególnych patogenów. Wyniki testów ELISA, RT-PCR i PCR były podstawą do określenia statusu zdrowotnego badanych roślin przed włączeniem roślin do kolekcji, a także do monitorowania obecności wykrytych patogenów po wprowadzeniu chorych roślin do kolekcji. W celu identyfikacji fitoplazm przeprowadzono analizę polimorfizmu długości fragmentów restrykcyjnych (RFLP) z użyciem enzymów *AluI*, *MseI*, *RsaI* i *SspI*. Uzyskane wzory po trawieniu enzymami fragmentu 16Sr DNA fitoplazm porównano z wzorami dla fragmentu genu kilku fitoplazm z grupy fitoplazmy proliferacji jabłoni, 16SrX (kontrola pozytywna). Zastosowana metoda umożliwiła identyfikację fitoplazmy '*Candidatus Phytoplasma prunorum*' należącej do grupy X (grupa fitoplazmy proliferacji jabłoni) w drzewach śliwy japońskiej oraz wiśni, a także '*Candidatus Phytoplasma pyri*' w czereśni.

Metoda PCR-RFLP była również wykorzystana do badania ozdobnych mieszańców rodzaju *Brassica* wykazujących zahamowanie wzrostu oraz deformację liści i kwiatów. Na podstawie wyników analizy RFLP z wykorzystaniem enzymów *HhaI*, *MseI* i *RsaI*, w roślinach mieszańców *Brassica* zidentyfikowano fitoplazmę z grupy żółtaczk astr (AY, '*Candidatus Phytoplasma asteris*'). Analiza porównawcza sekwencji nukleotydów genu 16S rRNA wykazała wysokie podobieństwo (98,5%) między badanymi izolatami AY z sekwencjami analogicznego fragmentu izolatów referencyjnych tej fitoplazmy.

W 2011 r. założono 16 kultur pędowych wiśni, czereśni, brzoskwini i śliwy japońskiej porażonych kilkoma wirusami w tym: PNRSV, PDV, CVA, LChV-1, CGRMV, ACLSV oraz fitoplazmami: '*Candidatus Phytoplasma mali*', '*Ca. P. pyri*' i '*Ca. P. prunorum*'.

Kultury pędowe roślin porażonych wirusami i fitoplazmami są utrzymywane w warunkach *in vitro* na pożywce Murashiga i Skooga (MS), modyfikowanej w zależności od potrzeb i stadium kultury. Kultury są przeszczepiane co 4-5 tygodni na świeżą pożywkę zawierającą 0,7-2,0 mg/l BAP. Obecność patogenów w kulturach *in vitro* jest weryfikowana na podstawie wyników testów ELISA (PDV, PNRSV, PPV, ACLSV), RT-PCR (CGRMV, LChV-1, CVA) i PCR ('*Ca. P. prunorum*', '*Ca. P. mali*' i '*Ca. P. pyri*'). W próbach pobranych ze wszystkich utrzymywanych kultur pędowych wykryto wymienione wirusy i fitoplazmy.

W 2011 r. do biblioteki cDNA włączono klony sześciu izolatów PNRSV, dwóch izolatów PPV, pięciu izolatów CLRV, trzech fragmentów genomu dwóch izolatów fitoplazmy '*Candidatus Phytoplasma prunorum*', '*Ca. P. prunorum*' oraz dwóch fragmentów genomu izolatu '*Candidatus Phytoplasma asteris*'. RNA wirusów nekrotycznej plamistości pierścieniowej wiśni (PNRSV), wirusa ospowatości śliwy (PPV), wirusa liściozwoju czereśni (CLRV) izolowano z porażonych roślin metodą adsorpcji na żelu krzemionkowym (SC). Amplifikację fragmentów genomu wirusów przeprowadzono z użyciem zestawu Transcriptor One-step RT-PCR kit (Roche) i starterów specyficznych dla poszczególnych wirusów. DNA fitoplazm '*Ca. P. prunorum*' i '*Ca. P. asteris*' wyizolowano z badanych drzew przy pomocy komercyjnego zestawu DNeasy Plant Mini Kit (Qiagen, Niemcy). Fragmenty genu 16S rRNA fitoplazm amplifikowano w dwuetapowej reakcji PCR z zastosowaniem komercyjnego zestawu FastStart Taq DNA Polymerase DNTP pack (Roche) i starterów uniwersalnych P1/P7 (I etap) oraz R16F2n/R16R2, P1/U3 i 16R758/P7 (II etap). Zamplifikowane i oczyszczone fragmenty genomów wirusów i fitoplazm wklonowano do wektora bakteryjnego p-GEM-T przy użyciu zestawu pGEM-T Vector System I. Specyficzność wklonowanych fragmentów DNA (fitoplazm) lub cDNA (wirusów) potwierdzono metodą PCR (dla fitoplazm) lub RT-PCR (dla wirusów). Sklonowane fragmenty genomu wymienionych wirusów i fitoplazm utrzymywane są w -70 °C.

*PNRSV – wirus nekrotycznej plamistości pierścieniowej wiśni, PDV – wirus karłowatości śliwy = wirus żółtaczk wiśni, LChV 1 i 2 – wirus drobnienia czereśni 1 i 2, CGRMV – wirus zielonej pierścieniowej pstrzości wiśni, '*Candidatus Phytoplasma prunorum*' – fitoplazma europejskiej żółtaczk drzew pestkowych, '*Candidatus Phytoplasma pyri*' – fitoplazma zamierania gruszy, '*Candidatus Phytoplasma mali*' – fitoplazma proliferacji jabłoni, CNRMV – wirus rdzawej nekrotycznej plamistości czereśni, CLRV – wirus liściozwoju czereśni, ACLSV – wirus chlorotycznej plamistości jabłoni, CVA – wirus A czereśni, PPV – wirus ospowatości śliwy.