

Metodyka pobierania prób materiału szkółkarskiego do testów laboratoryjnych na obecność wirusów

Roślina testowana: **Truskawka – *Fragaria × ananassa* Duchesne L.**

Wirusy:

Wirus pstrości truskawki - *Strawberry mottle virus* (SMoV)

Termin pobierania prób

Materiał roślinny powinien być uznany za wolny od wirusa pstrości truskawki - *Strawberry mottle virus* (SMoV) na podstawie wyników oceny wizualnej. Pobieranie prób i badania laboratoryjne przeprowadza się w przypadku wątpliwości dotyczących obecności wirusa. Próby do testów na obecność SMoV należy pobierać wiosną (V-VI) przed nastaniem długotrwałych wysokich temperatur powietrza.

Wybór tkanki/części rośliny do testowania

Do testów zalecane jest pobieranie całkowicie rozwiniętych liści unikając przy tym liści najstarszych.

Sposób pobierania prób

Przy pobieraniu próbek należy kierować się następującymi ogólnymi zasadami:

1. Jedna próbka powinna pochodzić z jednej rośliny, oznakowanej w sposób umożliwiający jej identyfikację (*w dalszej części omówiono odstępstwa od tej reguły*). Próba powinna być reprezentatywna. Do testu należy zbierać 3-5 w pełni wykształconych liści z różnych stron rośliny, z pominięciem liści najstarszych i najmłodszych.

2. Wskazane jest oznaczenie (zaetykietowanie) roślin, z których pobrano próbki, chyba, że identyfikacja jest możliwa na podstawie istniejącego oznakowania lub szczegółowego planu nasadzenia.
3. Próby należy pobierać do trwale oznakowanych foliowych torebek, zabezpieczając przed nadmiarem wilgoci i wysychaniem (groźniejszy jest nadmiar wilgoci niż wysychanie). Torebki mogą być otwarte tylko, jeżeli będą transportowane bezpośrednio do laboratorium w sposób, który uniemożliwi zamieszanie prób. W każdym innym przypadku próby należy zabezpieczyć przez zamknięcie torebek. Na czas zbierania i transportu, próby należy zabezpieczyć przed nadmiernym nagrzewaniem przez zacienianie. 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! Po dostarczeniu do laboratorium próby należy umieścić w chłodzie (+4°C do +10°C). Próbki mogą być przechowywane w lodówce (chłodni) kilka do kilkunastu dni.
4. Jeżeli na liściach występują chlorotyczne plamy lub deformacje, należy w pierwszym rzędzie pobrać próbki liści wykazujących objawy chorobowe.
5. Pobrane próbki należy przekazać do badań laboratoryjnych załączając także "zlecenie na wykonanie badań laboratoryjnych", którego formularz można pobrać ze strony internetowej właściwego miejscowego Wojewódzkiego inspektoratu Ochrony Roślin i Nasiennictwa (piorin.gov.pl). Dodatkowo należy sporządzić i przechowywać przez 3 lata kopię "Zlecenia" oraz pisemną informację zawierającą dodatkowe dane, o ile nie zostały podane w "Zleceniu":

Rodzaj uprawy(gatunek, odmiana, ew. typ, wiek roślin)	
Rodzaj pobranego materiału (na przykład: liście, kwiaty)	
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	

UWAGA: Przy pobieraniu prób w maticzniku sadzonek, identyfikacja pojedynczej rośliny może być utrudniona. W takim przypadku należy trwale oznakować 1 metr bieżący, z którego jako jedną próbę należy z każdej rośliny pobrać do testów po dwa w pełni wykształcone liście z pominięciem liści najstarszych i najmłodszych.
Data publikacji (umieszczenia na stronie internetowej): 31.05.2019

W przypadku stwierdzenia wirusa należy usunąć rośliny z badanego metra i po jednym metrze z każdej strony (łącznie 3 metry bieżące rzędu).

Metoda laboratoryjna weryfikacji obecności SMoV

W przypadku wątpliwości dotyczących obecności SMoV, do wykrywania wirusa należy stosować test RT-PCR, w którym reakcja PCR poprzedzona jest reakcją odwrotnej transkrypcji (ang. *reverse transcription*, RT) polegającej na przepisaniu sekwencji mRNA na tzw. komplementarne DNA (cDNA). Do izolacji kwasów nukleinowych można stosować różne metody lub gotowe zestawy np.: RNeasy Plant Mini kit (Qiagen). Jedna z metod izolacji opisana w publikacjach 1 i 2 oparta jest na wykorzystaniu złoza krzemionkowego (tzw. metoda „*silica capture*”).

Opis zasad i etapów reakcji RT-PCR można znaleźć w wielu powszechnie dostępnych publikacjach naukowych np. w cytowanej poniżej publikacji 2, lub w materiałach edukacyjnych np. www.e-biotechnologia.pl. W każdym przypadku należy stosować się do zaleceń producenta zestawu odczynników do reakcji PCR.

Sekwencje starterów wykorzystywanych w reakcji RT-PCR do wykrywania SMoV przedstawione są w tabeli.

Wirus	Startery	Sekwencja startera (5' → 3')	Temperatura przyłączenia starterów (°C)	Długość produktu PCR (pz)	Literatura
SMoV	Smdetncr4a Sm2ncr1b	TAAGCGACCACGACTGTGACAAAG ATTCGGTTCACGTCCTAGTCTCAC	50	460	2

Literatura

1. Rott M.E., Jelkmann W. 2001. Characterization and detection of several filamentous viruses of cherry: Adaptation of an alternative cloning method (DOP-PCR), and modification of an RNA extraction protocol. *European Journal of Plant Pathology*, 107:411-420.
2. Thompson J.R., Jelkmann W. 2003. The detection and variation of *Strawberry mottle virus*. *Plant Disease*, 87:385-390.

Objaśnienia skrótów użytych w tekście:

RT = Reverse Transcription = odwrotna transkrypcja

PCR = Polymerase Chain Reaction = reakcja łańcuchowa polimerazy

Opracowanie: dr hab. Mirosława Cieślińska, prof. IO; e-mail: mirosława.cieslinska@inhort.pl