

Metodyka pobierania prób materiału szkółkarskiego do testów laboratoryjnych na obecność wirusów

Rośliny testowane: **Porzeczka czarna – *Rubus nigrum* L., porzeczka czerwona – *Ribes rubrum* L., agrest – *Ribes uva-crispa* L.**

Wirusy odpowiednio dla danego gatunku:

Wirus mozaiki gęsiówki – *Arabidopsis mosaic virus* (ArMV)

Wirus rewersji porzeczki czarnej – *Blackcurrant reversion virus* (BRV)

Wirus mozaiki ogórka – *Cucumber mosaic virus* (CMV)

Wirus otaśmienia nerwów agrestu – *Gooseberry vein banding virus* (GVBaV)

Utajony wirus pierścieniowej plamistości truskawki - *Strawberry latent ring spot virus* (SLRSV)

Wirus pierścieniowej plamistości maliny – *Raspberry ring spot virus* (RpRSV)

Termin pobierania prób:

Materiał roślinny powinien być uznany za wolny od wirusów na podstawie wyników oceny wizualnej. Pobieranie prób i badania laboratoryjne przeprowadza się w przypadku wątpliwości dotyczących obecności wirusów. Próby do testów na obecność ArMV, BRV, CMV, GVBaV, SLRSV i RpRSV należy pobierać wiosną (V-VI) przed nastaniem długotrwałych wysokich temperatur powietrza.

Wybór tkanki/części rośliny do testowania

Dla roślin gatunku *R. nigrum* wykonuje się testy na obecność CMV, ArMV, GVBaV, BRV, CMV i SLRSV.

Dla roślin gatunku *R. rubrum* wykonuje się testy na obecność CMV, ArMV, GVBaV, BRV, CMV, SLRSV i RpRSV.

Dla roślin gatunku *R. uva-crispa* wykonuje się testy na obecność CMV, ArMV i GVBaV.

(źródło: Certification scheme for *Ribes*. EPPO Standard PM 4/9 (2), 2008. Bulletin OEPP/EPPO Bulletin 38, 14-18).

Do testów zalecane jest wykorzystywanie młodych liści pobranych z fragmentu pędu do 2/3 długości od nasady.

Sposób pobierania prób

Przy pobieraniu próbek należy kierować się następującymi ogólnymi zasadami:

1. Jedna próbka powinna pochodzić z jednej rośliny, oznakowanej w sposób umożliwiający indywidualną identyfikację zainfekowanych roślin.
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 zacielenie. 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. Próba powinna być reprezentatywna dla rośliny, tzn.:
 - a) z roślin 4-letnich i młodszych, próbka pobierana jest z maksymalnie czterech różnych pędów, po dwa do czterech liści (pąków) lub mniej tak, aby nie uszkodzić badanej rośliny.
 - b) z roślin 5-letnich i starszych próbka pobierana jest z czterech różnych pędów (z czterech stron krzewu), po dwa do czterech liści.
5. Liście należy pobierać z dolnej i środkowej części pędów.
6. Jeżeli na liściach występują chlorotyczne plamy lub deformacje, należy w pierwszym rzędzie pobrać próbki liści wykazujących objawy chorobowe.
7. 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	

Metoda laboratoryjna weryfikacji obecności wirusów

Do wykrywania ArMV, CMV, SLRSV i RpRSV należy stosować test ELISA.

Do wykrywania BRV 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 BRV można stosować gotowe zestawy np.: RNeasy Plant Mini Kit (Qiagen).

W oparciu o metodykę opisaną w publikacji 1, można też stosować metodę „immunocapture”, w której przy izolacji wykorzystuje się specyficzne dla BRV przeciwciała.

Opis zasad i etapów reakcji RT-PCR można znaleźć w wielu powszechnie dostępnych publikacjach naukowych np. 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 RT-PCR.

Startery specyficzne dla BRV do przeprowadzenia reakcji RT-PCR przedstawione są w tabeli.

Do wykrywania GVBaV należy stosować test PCR. Metodyka izolacji kwasów nukleinowych, przeprowadzenia reakcji PCR oraz sekwencja starterów specyficznych dla GVBaV opisane są w publikacji 4. Do izolacji można również stosować gotowe zestawy np.: DNeasy Plant Mini Kit (Qiagen). Opis zasad i etapów reakcji PCR można znaleźć w wielu powszechnie dostępnych publikacjach naukowych np. w cytowanej poniżej publikacji 4, lub w materiałach edukacyjnych np. „Przykłady analiz DNA” Ryszard Słomski (red.), Poznań 2001; www.e-biotechnologia.pl. W każdym przypadku należy stosować się do zaleceń producenta zestawu odczynników do reakcji PCR. Startery specyficzne dla GVBV do przeprowadzenia reakcji PCR przedstawione są w tabeli.

Wirus	Startery	Sekwencja startera (5' → 3')	Temperatura przyłączenia starterów (°C)	Długość produktu PCR (pz)	Literatura
BRV	P5 P6	AAACCAGACCCAGGTGAGTG GGACACTTCCATATAAGTCGGC	60	481	2, 3
GVBV	GVB2 for GVB2 rev	TCAGACAGGCTCTCAACAATAC TTCTAAAAGCATCCACTACCAC	60	309	4

Literatura:

1. Lemmetty A., Latvala S., Jones A.T., Susi P., McGavin W.J., Lehto K. 1997. Purification and properties of a new virus from black currant, its affinities with nepoviruses, and its close association with black currant reversion disease. *Phytopathology*, 87: 404-413.
2. Lehto K., Lemmetty A., Keränen M. 2004. The long 3' non-translated regions of *Blackcurrant reversion virus* RNAs are highly conserved between virus isolates representing different phenotypes and geographic origins. *Archives of Virology*, 149: 1867-1875.
3. Lemmetty A., Latvala-Kilby S., Lehto K. 2001. Comparison of different isolates of black currant reversion virus. *Acta Horticulturae*, 551, 45-49.
4. Jones A.T., McGavin W.J., Geering A.D.W., Lockhart B.E L. 2001. A new badnavirus in *Ribes* species, its detection by PCR, and its close association with gooseberry vein banding disease. *Plant Disease*, 85:417-422.

Objaśnienia skrótów użytych w tekście:

ELISA = Enzyme Linked ImmunoSorbent Assay = test immunoenzymatyczny

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