

Metodyka pobierania prób materiału szkółkarskiego do testów laboratoryjnych na obecność wirusów

Rośliny testowane: **Borówka wysoka – *Vaccinium corymbosum* L.,
Żurawina – *Vaccinium macrocarpon* Aiton**

Wirusy odpowiednio dla danego gatunku:

Wirus nitkowatości borówki wysokiej – *Blueberry shoestring virus* (BSSV)

Wirus czerwonej pierścieniowej plamistości borówki wysokiej – *Blueberry red ring spot virus* (BRRV)

Wirus oparzeliny borówki wysokiej – *Blueberry scorch virus* (BIScV)

Wirus szoku borówki wysokiej – *Blueberry shock virus* (BIShV)

Wirus mozaiki borówki wysokiej – *Blueberry mosaic associated virus*
(BIMaV)

Wirus czerwonej pierścieniowej plamistości na żurawinie – *Blueberry red ring spot virus* (BRRV)

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 BSSV, BRRV, BIScV, BIShV, BIMaV należy pobierać wiosną (V-VI) przed nastaniem długotrwałych wysokich temperatur powietrza.

Wybór tkanki/części rośliny do testowania

Dla roślin gatunku *Vaccinium corymbosum* L. wykonuje się testy na obecność BSSV, BRRV, BIScV, BIShV i BIMaV.

Dla roślin gatunku *Vaccinium macrocarpon* Aiton wykonuje się testy na obecność BRRV.

Do testów na obecność wirusów zalecane jest wykorzystywanie 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 w tym młode, w pełni rozwinięte liście na szczycie każdej łodygi i starsze liście wyrastające w połowie pędu .
2. Jeżeli występują chlorotyczne przebarwienia, czerwono-brązowe plamy lub pierścienie na liściach i/lub pędach, zamieranie liści, kwiatów lub pędów, należy w pierwszym rzędzie pobrać próby liści wykazujących objawy chorobowe.
3. 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 BSSV, BIScV i BISHV należy stosować test ELISA.

Do wykrywania BRRV należy stosować test PCR.

Do izolacji kwasów nukleinowych można stosować różne metody lub gotowe zestawy np.: DNeasy Plant Mini Kit (Qiagen). Jedna z metod oparta na CTAB opisana jest w publikacji 1.

Opis zasad i etapów reakcji PCR można znaleźć w wielu powszechnie dostępnych publikacjach naukowych np. w cytowanej poniżej publikacji 3, 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 BRRV do przeprowadzenia reakcji PCR przedstawione są w tabeli.

Do wykrywania BIMaV należy stosować test RT-PCR, w której 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 metodę opisaną w publikacji 2 lub można wykorzystać gotowe zestawy np.: RNeasy Plant Mini Kit (Qiagen).

Opis zasad i etapów reakcji RT-PCR można znaleźć w wielu powszechnie dostępnych publikacjach naukowych np. w cytowanej poniżej publikacji 4, lub w materiałach edukacyjnych np. www.e-biotechnologia.pl. W każdym przypadku należy stosować się do zaleceń producenta zestawu odczynników do reakcji PCR.

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

Wirus	Startery	Sekwencja startera (5' → 3')	Temperatura przyłączenia starterów (°C)	Długość produktu PCR (pz)	Literatura
BRRV	RRSV3-F RRSV4-R	ATCAGTCCCAGAAGAAAAGAAGTA TCCGAAAATAGATAGTGTCAGC	57	549	3
BIMaV	RNA 1	CCATGTCTTCTACTCTTTCTCC GAAATTAGATTTTGTAACAATGCAGG	50	ok. 800	4

Literatura

1. Stewart, C. N., and Via, L. E. 1993. A rapid CTAB DNA isolation technique useful for RAPD fingerprinting and other PCR applications. *Biotechniques* 5:748-750.
2. Poudel, B., Wintermantel, W.M., Cortez, A.A., Ho, T., Khadgi, A., Tzanetakis, I.E., 2013. Epidemiology of Blackberry yellow vein associated virus. *Plant Dis.* 97,1352–1357.
3. Polashock J.J., Ehlenfeldt M.K., Crouch J.A. 2009. Molecular detection and discrimination of *Blueberry red ringspot virus* strains causing disease in cultivated blueberry and cranberry. *Plant Disease*, 93:727-733.
4. Thekke-Veetil T., Ho T., Keller K.E., Martin R.R., Tzanetakis I.E. 2014. A new ophiovirus is associated with blueberry mosaic disease. *Virus Research*, 189: 92-96.

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