

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

Okres realizacji: 2008-2014

Kierownik zadania: dr hab. Mirosława Cieślińska

Wykonawcy: dr H. Berniak, dr hab. J. Puławska, dr H. Morgaś, D. Starzec, T. Smolarek

Celem zadania jest utrzymywanie dotychczas zgromadzonej kolekcji oraz sukcesywne jej poszerzanie o nowe patogeny tak, by znalazły się w niej różne szczepy najważniejszych wirusów, fitoplazm i wiroidów porażających rośliny ogrodnicze.

W 2013 r. do kolekcji włączono: 17 roślin z rodzaju *Rubus* porażonych wirusami: mozaiki maliny (RMD), chlorozy nerwów liści maliny (RVCV), plamistości liści maliny (RLBV), fitoplazmą choroby X lub '*Candidatus Phytoplasma rubi*'; 16 roślin truskawki porażonych wirusem cętkowanej plamistości liści truskawki (SMoV) lub '*Candidatus Phytoplasma asteris*'; 13 roślin agrestu i porzeczki czerwonej porażonych wirusem otąśnienia nerwów agrestu (GVBV); jedną roślinę porzeczki czerwonej porażoną wirusem mozaiki ogórka (CMV); trzy rośliny porzeczki czarnej porażonej wirusem rewersji porzeczki czarnej (BRV); dwie rośliny borówki wysokiej porażonych patogenem wywołującym mozaikę borówki i osiem podkładek gruszy zaokulizowanych oczkami z drzew porażonych '*Candidatus Phytoplasma pyri*'.

Fragmenty RNA1 i RNA3 wirusa plamistości liści maliny (RLBV) amplifikowano w reakcji RT-PCR. Wirusa wykryto w 15 krzewach maliny i jednej roślinie jeżyny. Do dalszych badań z wykorzystaniem analizy sekwencji wybrano osiem izolatów RLBV (w tym jeden z jeżyny). Produkty RT-PCR, po ich oczyszczeniu z żelu zsekwencjonowano. Analiza porównawcza sekwencji nukleotydów fragmentów RNA1 i RNA3 i wydedukowane na ich podstawie sekwencje aminokwasów wykazały zróżnicowanie zarówno pomiędzy badanymi izolatami, jak i szczepami referencyjnymi z bazy GenBank. Wykazano również polimorfizm długości fragmentów restrykcyjnych (RFLP) *in silico* uzyskanych sekwencji nukleotydów izolatów RLBV. Enzymy restrykcyjne dobrano na podstawie analizy komputerowej otrzymanych fragmentów sekwencji RNA1 i RNA3 wirusa. Enzymami różnicującymi izolaty RLBV w obrębie sekwencji RNA1 były *AluI*, *MaeI*, *HpaI* i *HinfI*, zaś do analizy RNA3 wybrano restryktazy *AluI*, *BsmI*, *MaeI* i *MseI*.

Na roślinach *Hippeastrum*, bazylii, peperonii i chryzantemy obserwowano objawy wskazujące na porażenie przez wirusa brązowej plamistości pomidora (TSWV). Obecność wirusa w testowanych roślinach potwierdzono przy pomocy DAS-ELISA z użyciem przeciwciał na TSWV. Izolaty H1, H2, B i ChW wirusa miały zbliżone właściwości biologiczne, gdyż wywoływane przez nie objawy chorobowe na *Chenopodium quinoa*, *Cucumis sativus* 'Kronos', *Nicotiana rustica*, *N. clevelandii*, *N. glutinosa*, *N. tabacum* 'Samsun', *Petunia hybrida* cv. Pink Beauty i *Tropaeolum majus* były podobne, a różniły się jedynie w zależności od gatunku roślin użytej go badań. Izolatu P nie udało się przenieść na rośliny testowe. Porównano właściwości serologiczne izolatów TSWV w reakcji DAS-ELISA oraz TAS-ELISA z użyciem zestawów przeciwciał firmy Loewe Biochemica, DSMZ oraz przygotowanego w Pracowni Wirusologii. Nie stwierdzono istotnych różnic w wysokości odczytów absorpcji uzyskanych w testach ELISA, co dowodzi, że właściwości serologiczne badanych izolatów były podobne. Odczytano fragmenty segmentów M i S genomowego RNA badanych izolatów TSWV, zawierające kompletne sekwencje genu białka nukleokapsydu (N), białka transportowego (NSm) oraz białka niestrukturalnego pełniącego funkcję supresora wyciszania genów (NSs). Porównanie badanych sekwencji wykazało wysokie podobieństwo (powyżej 99%) wszystkich analizowanych genów izolatów B, ChW i H2. Podobieństwo sekwencji odczytanych dla izolatu H1 było niższe i zawierało się w przedziale 94-97%. Przeprowadzono analizę filogenetyczną badanych sekwencji genów NSs i N oraz analogicznych sekwencji 25 izolatów TSWV z bazy GenBank. Cztery badane izolaty TSWV grupowały się na wspólnej gałęzi drzewa filogenetycznego, co świadczyło o ich bliskim pokrewieństwie z opisanymi wcześniej izolatami wirusa z sałaty (nr KC261967) oraz dali (AY744478). Analiza genu *NSm* wykazała wysokie podobieństwo badanych izolatów z izolatami wirusa wykrytymi w pomidorze lub papryce. Izolaty B, ChW i H2 zgrupowane zostały w tej samej klastrze, podczas gdy izolat H1 znajdował się na odrębnej gałęzi drzewa filogenetycznego. Wyniki przeprowadzonych analiz wskazują, iż ewolucja genu *NSm* badanych izolatów TSWV przebiegała niezależnie od ewolucji genów *N* i *NSs*. Ponadto wykazano, że izolat H1 znacznie różnił się pod względem właściwości molekularnych od pozostałych analizowanych izolatów wirusa.

Założono 13 kultur pędowych *in vitro* z: *Rubus* sp. porażonych RBDV, RLBV, RVCV, '*Candidatus Phytoplasma asteris*', fitoplazmą choroby X lub '*Candidatus Phytoplasma rubi*'; poziomki porażonej SMoV i wirusem marszczycy truskawki (SCV) oraz borówki wysokiej porażonej '*Candidatus Phytoplasma asteris*'.

W badaniach na obecność kilku latentnych wirusów jabłoni w kulturach pędowych jabłoni założonych w 2012 r., zastosowano metodę multiplex RT-PCR. W jednej reakcji użyto jednocześnie trzech par starterów umożliwiających wykrywanie wirusów: jamkowatości pnia jabłoni (ASPV), chlorotycznej plamistości liści jabłoni (ACLSV) i żłobkowatości pnia jabłoni (ASGV). Na podstawie wielkości uzyskanych produktów PCR, można było je przypisać odpowiednim fragmentom genomu poszczególnych wirusów.

Przy użyciu zestawu pGEM-T Vector System I do wektora bakteryjnego p-GEM-T wklonowano fragmenty: genu kodującego poliproteinę pięciu izolatów GVBV z agrestu oraz porzeczki czerwonej, regionu nie

kodującego pięciu izolatów SMOV z truskawki, regionu kodującego RNA zależną polimerazę RNA izolatu SCV z truskawki oraz RNA1 czterech izolatów RLBV.

Kolekcję poszerzono o kolejnych 30 izolatów wirusów i patogenów wirusopodobnych utrzymywanych w 60 roślinach sadowniczych, 13 kultur pędowych roślin jagodowych porażonych wirusami i fitoplazmami oraz 15 klonów cDNA fragmentów genomu GVBV, SMOV i SCV. Scharakteryzowano właściwości biologiczne, serologiczne i molekularne pięciu izolatów TSWV.