

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)

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

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

Wirus marszczycy truskawki - *Strawberry crinkle virus* (SCrV)

Wirus łagodnej żółtaczki brzegów liści truskawki – *Strawberry mild yellows edge virus* (SMYEV)

Wirus otaśmienia nerwów truskawki – *Strawberry vein banding virus* (SVBV)

Wirus czarnej pierścieniowej plamistości pomidora – *Tomato black ring virus* (TBRV)

Utajony wirus pierścieniowej plamistości truskawki – *Strawberry latent ring spot virus* (SLRV)

Termin pobierania prób

Materiał roślinny powinien być uznany za wolny od: wirusa pstrości truskawki - *Strawberry mottle virus* (SMoV); wirusa mozaiki gęsiówki – *Arabidopsis mosaic virus* (ArMV), wirusa pierścieniowej plamistości maliny – *Raspberry ring spot virus* (RpRSV); wirusa marszczycy truskawki - *Strawberry crinkle virus* (SCrV); wirusa łagodnej żółtaczki brzegów liści truskawki – *Strawberry mild yellows edge virus* (SMYEV); wirusa otaśmienia nerwów truskawki – *Strawberry vein banding virus* (SVBV); wirusa czarnej pierścieniowej plamistości pomidora – *Tomato black ring virus* (TBRV); utajonego wirusa pierścieniowej plamistości truskawki – *Strawberry latent ring spot virus* (SLRV) na podstawie wyników oceny wizualnej. Pobieranie prób i badania laboratoryjne przeprowadza się w przypadku wątpliwości dotyczących obecności wirusów. Próby do testów na ich obecność 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 zacieniowanie. 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 mateczniku 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. 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 wirusów

Do wykrywania ArMV, RpRSV, SMYEV, TBRV i SLRV należy stosować test ELISA z użyciem komercyjnych zestawów przeciwciał według zaleceń producentów.

W przypadku wątpliwości dotyczących obecności SMoV, SCrV, SVBV i SMYEV, do ich wykrywania 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 złoża 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, SCrV, SVBV i SMYEV przedstawione są w tabeli.

Wirus	Startery	Sekwencja startera (5' → 3')	Temperatura przyłączania starterów (°C)	Długość produktu PCR (pz)	Literatura
SMoV	Smdetncr4a Sm2ncr1b	TAAGCGACCACGACTGTGACAAAG ATTCGGTTCACGTCCTAGTCTCAC	50	460	2
SCrV	MKC-F MKC-R	CATTGGTGGCAGACCCATCA TTCAGGACCTATTTGATGACA	58	345	3
SVBV	SVBVdeta SVBVdetb	AGTAAGACTGTTGGTAATGCCA TTTCTCCATGTAGGCTTTGA	52	422	4
SMYEV	SYEupstcp1a SYEPolyTb	CCGCTGCAGTTGTAGGGTA TTTTTTTTTTTTTTTAAGGAAAAAGAA AAACAAAC	50	932	5

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.
3. Klerks M.M., Lindner J.L., Vaskova D., Spak J., Thompson J.R., Jelkmann W., Schoen C.D. 2004. Detection and tentative grouping of Strawberry crinkle virus isolates. *European Journal of Plant Pathology*, 110: 45–52.
4. Thompson J.R., Wetzel S., Klerks M.M., Vašková D., Schoen C.D., Špak J., Jelkmann W. 2003. Multiplex RT-PCR detection of four aphid-borne strawberry viruses in *Fragaria* spp. in combination with a plant mRNA specific internal control *Journal of Virological Methods* 111 (2) 85-93
5. Thompson J.R., Jelkmann W. 2004. Strain diversity and conserved genome elements in Strawberry mild yellow edge virus. *Archives of Virology*, 149: 1897–1909

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