

Metodyka pobierania prób materiału szkółkarskiego do testów laboratoryjnych na obecność wirusów

Rośliny testowane: **Malina – *Rubus idaeus* L., Jeżyna – *Rubus fruticosus* i inne gatunki *Rubus* ssp.**

Wirusy:

Wirus mozaiki jabłoni – *Apple mosaic virus* (ApMV)

Wirus nekrozy jeżyny – *Blackberry necrosis virus* (BRNV)

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

Wirus pstrości liści maliny – *Raspberry leaf mottle virus* (RLMV)*

Wirus plamistości liści maliny – *Raspberry leaf blotch virus* (RLBV)

Wirus chlorozy nerwów liści maliny – *Raspberry vein chlorosis virus* (RVCV)

Wirus żółtaczkli nerwów liści maliny – *Rubus yellow net virus* (RYNV)

Wirus krzaczastej karłowatości maliny – *Raspberry bushy dwarf virus* (RBDV)

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

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

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

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

* *Raspberry leaf mottle virus* (RLMV), *Raspberry mottle virus* (RMOV) oraz *Raspberry leaf spot virus* (RLSV) są szczepami tego samego wirusa o nazwie *Raspberry leaf mottle virus* (McGavin W.J., MacFarlane S.A., 2010. *Annals of Applied Biology*, 156: 439–448) – wirus pstrości liści maliny. Wirus żółtej plamistości liści maliny - *Raspberry yellow spot* jest prawdopodobnie szczepem RLMV. Na podstawie objawów chorobowych nie można odróżnić wirusa żółtej plamistości liści maliny od RLMV. Obydwa patogeny przenoszone są przez te same wektory (Martin R.R., MacFarlane S., Sabanadzovic S., Quito D., Poudel B., Tzanetakis J.E. 2013. *Plant Diseases*, 97 (2): 168-182).

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 ApMV, RpRSV, TBRV, SLRV, ArMV, BRNV, CMV, RLMV, RLBV, RVCV, RYNV i

RBDV należy pobierać wiosną (V-VI) przed nastaniem długotrwałych wysokich temperatur powietrza.

Wybór tkanki/części rośliny do testowania

Dla roślin gatunków *Rubus* spp. wykonuje się testy na obecność CMV, BRNV, RYNV, TBRV i RBDV.

Dla roślin gatunków *R. idaeus*, *R. fruticosus* wykonuje się testy na obecność ApMV, ArMV, RpRSV, SLRV.

Dla roślin gatunku *R. idaeus* wykonuje się testy na obecność RLMV, RLBV i RVCV. (źródło: Certification scheme for *Rubus*. EPPO Standard PM 4/10 (2), 2009. Bulletin OEPP/EPPO Bulletin 39, 271-277)

Do testów na obecność wirusów 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 jej identyfikację (*w dalszej części omówiono odstępstwa od tej reguły*).
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). Próbkę 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 z pominięciem liści najstarszych i najmłodszych.
- Liście należy pobierać z dolnej i środkowej części pędów.
 - Jeżeli na liściach występują chlorotyczne plamy, należy w pierwszym rzędzie pobrać próbki liści wykazujących objawy chorobowe.
 - Przy pobieraniu prób należy sporządzić i dołączyć do prób pisemną informację zawierającą:

Data pobrania próbki (dd mm rrrr)	
Dane producenta: • imię i nazwisko • adres kontaktowy • telefon • e-mail	
Adres plantacji	
Rodzaj uprawy (gatunek, odmiana, ew. typ, wiek roślin)	
Rodzaj pobranego materiału (na przykład: liście)	
Plan (szkic) lub opis umożliwiający jednoznaczne odnalezienie roślin w terenie, z których pobierano próby	
Dodatkowe informacje dotyczące m.in. występowania chorób, szkodników, izolacji od źródeł infekcji	

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 obecności wirusów

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

Do wykrywania BRNV, RLMV, RLBV, RVCV i RYNV 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 np. oparte na wykorzystaniu złoża krzemionkowego (tzw. metoda „silica capture”) opisane m.in. w publikacji 1 i 2 lub gotowe zestawy np.: RNeasy Plant Mini Kit (Qiagen).

Opis zasad i etapów reakcji RT-PCR można znaleźć w wielu powszechnie dostępnych publikacjach naukowych np. cytowanych poniżej 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 BRNV, RLMV, RLBV, RVCV i RYNV do przeprowadzenia reakcji RT-PCR przedstawione są w tabeli.

Wirus	Startery	Sekwencja startera (5' → 3')	Temperatura przyłączania starterów (°C)	Długość produktu PCR (pz)	Literatura
BRNV	BRNV1F* BRNF1R*	TGCTGAGCCACTTGTGA TCTGGTGTGTTCCGCAT	55	417	3
RLMV	CPhF CPhR	CGAACTTYTACGGGGAAC CCTTTGAAYTCTTTAACATCGT	55	452	4
RLBV	1499 1500	CCTTACTTAAATTGTGTCAGGG GGCAACATAACCAGAGCAGTG	55	557	5
RVCV	RVCV776F RVCV12784R	GGGAACTAAACCCACACCT AGGGTCCACCCTTTCTGTCT	60	499	6
RYNV	RYN1-f RYN1-r	TCCAAAACCTCCCAGACCTAAAAC ATAATCGCAAAAGGCAAGCCAC	64	350	7

* w cytowanej publikacji brak jest nazwy starterów

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., Wetzel S., Klerks M.M., Vasková D., Schoen C.D., Spak 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: 85-93.
 3. Halgren A., Tzanetakis I.E., Martin R.R. 2007. Identification, characterization, and detection of *Black raspberry necrosis virus*. *Phytopathology*, 97 (1): 44-50.
 4. Tzanetakis J.E., Halgren A., Mosier N., Martin R.R. 2007. Identification and characterization of *Raspberry mottle virus*, a novel member of the *Closteroviridae*. *Virus Research*, 127:26-33.
 5. McGavin W.J., Mitchell C., Cock P.J.A., Wright K.M., S.A. MacFarlane. 2012. Raspberry leaf blotch virus, a putative new member of the genus Emaravirus, encodes a novel genomic RNA. *Journal of General Virology*, 93: 430–437.
 6. McGavin W.J., Cock P.J.A., MacFarlane S.A. 2011. Partial sequence and RT-PCR diagnostic test for the plant rhabdovirus *Raspberry vein chlorosis virus*. *Plant Pathology*, 60:462-467.
 7. Jones A.T. McGavin W.J., Geering A.D., Lockhard B.E. 2002. Identification of *Rubus yellow net virus* as a distinct badnavirus and its detection by PCR in *Rubus* species and in aphids. *Annals of Applied Biology*, 141:1-10.

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