

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 odpowiednio dla danego gatunku:

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

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

* *Raspberry leaf mottle virus* (RLMV), *Raspberry mottle virus* (RMoV) oraz *Raspberry leaf spot virus* (RLSV) są szczepami tego samego wirusa i przyjęto dla nich nazwę *Raspberry leaf mottle virus* (W.J. McGavin, S.A. MacFarlane. 2010. *Annals of Applied Biology*, 156: 439–448)

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, 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 i RBDV.

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

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 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 z pominięciem liści najstarszych i najmłodszych.
5. Liście należy pobierać z dolnej i środkowej części pędów.

6. Jeżeli na liściach występują chlorotyczne plamy, należy w pierwszym rzędzie pobrać próbki liści wykazujących objawy chorobowe.
7. Przy pobieraniu prób należy sporządzić i dołączyć do prób pisemną informację zawierającą:

| | |
|---|--|
| Data pobrania próbki (dd mm rrrr) | |
| Dane producenta: <ul style="list-style-type: none"> • 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, ApMV i RBDV należy stosować test ELISA.

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