

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

Kierownik zadania: **dr hab. M. 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 2012 r., wyniki testów ELISA i PCR były podstawą do określenia statusu zdrowotnego badanych roślin przed włączeniem roślin do kolekcji, a także do monitorowania obecności wykrytych patogenów w czasie utrzymywania chorych roślin w kolekcji. Z użyciem analizy polimorfizmu długości fragmentów restrykcyjnych (RFLP) i sekwencjonowania przeprowadzono również identyfikację wybranych patogenów oraz charakterystykę ich izolatów. W celu identyfikacji wirusa krzaczastej karłowatości maliny (RBDV) z prób liści pobranych z roślin malin ‘Karmazyn’ i ‘Polka’ i mieszańca maliny z jeżyną wykonano testy DAS-ELISA z użyciem surowicy poliklonalnej (Loewe Biochemica, Niemcy). Testy potwierdziły obecność RBDV w badanych krzewach *Rubus* sp. Metodę tę wykorzystano również do wykrycia obecności wirusa mozaiki jabłoni (ApMV) w siedmiu drzewach jabłoni (trzy z nich włączono do kolekcji) oraz wirusa chlorotycznej plamistości liści jabłoni (ACLSV) w jabłoni odmiany ‘Szampion’ oraz dwóch drzewach grusz: ‘Bera Hardy’ i nieznannej odmiany. W testach RT-PCR zamplifikowano fragment genu białka transportowego wirusa krzaczastej karłowatości maliny (RBDV) o wielkości 1072 pz. Stosując metodę RFLP *in silico*, z użyciem kilku enzymów restrykcyjnych (*KpnI*, *MaeI*, *NruI* i *HhaI*), uzyskano odmienne profile restrykcyjne dla trzech badanych izolatów RBDV. Otrzymane amplikony zsekwencjonowano, a otrzymane sekwencje przeanalizowano przy pomocy programu Lasergene (DNASTAR, USA). Analiza porównawcza sekwencji badanych izolatów RBDV wykazała podobieństwo na poziomie 97,7% i ich bliskie pokrewieństwo z izolatem R15 z maliny (97,9-99,8%), (nr dostępu GenBank: EU796088). Na podstawie wyników analizy PCR/RFLP z wykorzystaniem dwóch par starterów uniwersalnych (P1/P7 i R16F2n/R16R2) oraz enzymów restrykcyjnych (*HpaII*, *RsaI*, *HhaI* i *BfaI*) w trzech roślinach maliny zidentyfikowano ‘*Candidatus Phytoplasma rubi*’ - fitoplazmę wywołującą chorobę karłowatości maliny. Metodę PCR/RFLP zastosowano również do analizy fragmentu genu 16S rRNA kilku izolatów fitoplazmy zamierania gruszy (‘*Ca. P. pyri*’) pochodzących z drzew gruszy, u których obserwowano przedwczesne czerwienienie liści i osłabienie wzrostu. Po trawieniu enzymami *AluI*, *RsaI*, *MseI*, *HhaI* i *HpaII* produktu PCR amplifikowanego ze starterami uniwersalnymi R16F2n/R16R2 nie wykazano zróżnicowania między badanymi izolatami ‘*Ca. P. pyri*’. Podobieństwo sekwencji podjednostki 16S rybosomowego RNA (16S rRNA) izolatów tego patogena wynosiło 99,2-100%, zaś między badanymi izolatami a sekwencjami izolatów wzorcowych z bazy GenBank – 99,1-100%. Analizowano również sekwencje genu *pnp* kodującego fosforylaze polinukleotydową izolatów fitoplazmy zamierania gruszy. Wykazano, że wzajemne podobieństwo sekwencji tego fragmentu genomu badanych izolatów, a także ich podobieństwo w stosunku do izolatów ‘*Ca. P. pyri*’ zdeponowanych w bazie GenBank wynosiło 94,9-99,4%.

W przeprowadzonych badaniach określono zróżnicowanie molekularne dwóch izolatów fitoplazm należących do gatunku ‘*Candidatus Phytoplasma asteris*’. Izolat ‘Simp’ wykryto w lilii orientalnej ‘Simplon’ z objawami nekrozy i deformacji liści oraz zamierania pąków kwiatowych. Izolat ‘Acer’ pochodził z klonu jesionolistnego na którym obserwowano zahamowanie wzrostu oraz rozety licznych, skróconych pędów. W reakcji PCR zastosowano startery umożliwiające amplifikację: genu podjednostki 16S rRNA (startery P1/P7, R16F2n/R16R2), genu białka rybosomowego *rp* (*rp1/rp2*, *rp3/rp4*, *rpF1/rpR1*, *rp(I)F1A/rp(I)R1A*) genu *tuf* kodującego czynnik elongacji Tu (*fTuf1/rTuf1*, *fTufAY/rTufAY*) oraz genu *secY* kodującego białko translokazy błony (*AYsecYF1/AYsecYR1*). Produkty PCR poddano analizie RFLP z użyciem endonukleaz *AluI*, *HhaI*, *HpaII* i *RsaI*. Analiza sekwencji amplikonów wykazała, że najmniej zróżnicowane były sekwencje

genu 16S rRNA (podobieństwo 99,6%). Na podstawie analizy restrykcyjnej oraz filogenetycznej tego regionu oba testowane izolaty zaklasyfikowano do podgrupy 16SrI-B. Podobieństwo sekwencji genów *rp*, *tuf* i *secY* było niższe i wynosiło odpowiednio: 97, 97 oraz 94%. Większe zróżnicowanie sekwencji tych genów umożliwiło rozróżnienie badanych izolatów fitoplazm metodą RFLP. Dla ampliconów uzyskanych ze starterami AYsecYF1/R1 enzymem różnicującym był *AluI*, dla produktu PCR ze starterami rp1/rp2 - enzymy *AluI* i *HhaI*, natomiast dla produktów otrzymanych w PCR ze starterami fTufAY/rTufAY - enzymy *AluI*, *HhaI* i *HpaII*.

Po uzyskaniu pozytywnych wyników testów, do kolekcji utrzymywanej w szklarni włączono izolaty następujących patogenów:

- trzy izolaty wirusa krzaczastej karłowatości maliny (*Raspberry bushy dwarf virus*, RBDV),
- trzy izolaty fitoplazmy karłowatości maliny ('*Candidatus Phytoplasma rubi*'),
- trzy izolaty wirusa mozaiki jabłoni (*Apple mosaic virus*, ApMV),
- trzy izolaty wirusa chlorotycznej plamistości liści jabłoni (*Apple chlorotic leaf spot virus*, ACLSV) z jabłoni (1) i gruszy (2),
- cztery izolaty fitoplazmy zamierania gruszy ('*Candidatus Phytoplasma pyri*'),
- dwa izolaty fitoplazmy żółtaczkii astra ('*Candidatus Phytoplasma asteris*') z jabłoni,
- dwa izolaty fitoplazmy proliferacji jabłoni ('*Candidatus Phytoplasma mali*').

Wiosną z pąków wierzchołkowych chorych drzew jabłoni, gruszy i leszczyny założono 12 kultur pędowych porażonych następującymi wirusami i patogenami wirusopodobnymi:

Jabłoń: wirus chlorotycznej plamistości liści jabłoni (ACLSV), wirus żółtkowatości pnia jabłoni (ASGV), wirus mozaiki jabłoni (ApMV), czynnik chorobotwórczy powodujący gumowatość drewna jabłoni, '*Candidatus Phytoplasma mali*'.

Grusza: wirus jamkowatości pnia jabłoni (ASPV).

Leszczyna: ApMV.

Kultury pędowe roślin porażonych wirusami i fitoplazmami utrzymywane są w warunkach *in vitro* na pożywce Murashige i Skoog'a (MS) modyfikowanej w zależności od potrzeb i stadium kultury. Obecność patogenów w pędach roślin *in vitro* weryfikowano na podstawie wyników testów RT-PCR (ACLSV, ApMV ASPV, ASGV) i PCR ('*Ca. P. mali*'). W próbach pobranych ze wszystkich utrzymywanych kultur pędowych wykryto wymienione wirusy i fitoplazmy.

Przy użyciu zestawu pGEM-T Vector System I wklonowano do wektora bakteryjnego fragmenty następujących genów:

- białka transportowego pięciu izolatów wirusa krzaczastej karłowatości maliny (RBDV),
- białka transportowego pięciu izolatów wirusa mozaiki jabłoni (ApMV) z leszczyny i jabłoni,
- 16S rybosomowego RNA dwóch izolatów '*Candidatus Phytoplasma pyri*' z gruszy,
- kodującego fosforylazę polinukleotydową trzech izolatów '*Candidatus Phytoplasma pyri*' z gruszy.

Specyficzność wklonowanych fragmentów DNA potwierdzono metodą PCR. Sklonowane fragmenty utrzymywane są w -70 °C.