



WYKRYWANIE I CHARAKTERYSTYKA IZOLATÓW WIRUSA ŻÓŁTACZKI NERWÓW LIŚCI MALINY (RUBUS YELLOW NET VIRUS, RYNV)

WSTĘP

Wirus żółtaczki nerwów liści maliny (rubus yellow net virus, RYNV) należy do rodzaju Badnavirus, rodziny Caulimoviridae (Jones i in., 2002). Występowanie RYNV odnotowano w kilku krajach Europy oraz w USA, Kanadzie i Chile. U większości odmian maliny wirus ten nie wywołuje objawów chorobowych, u innych powoduje chlorotyczne przebarwienia wzdłuż nerwów liści, zahamowanie wzrostu oraz deformacje liści i owoców (Stace-Smith i Jones, 1987). Wraz z wirusami nekrozy jeżyny i pstrości liści maliny jest sprawcą mozaiki maliny, która jest jedną z najbardziej wyniszczających chorób. Wektorem RYNV w Europie jest mszyca maliniarka (*Amphorophora idaei*). Dotychczas w bazie danych GenBank opublikowane są pełne sekwencje genomu pięciu szczepów RYNV.

Celem badań była charakterystyka molekularna sześciu izolatów RYNV pochodzących z plantacji maliny zlokalizowanych w trzech różnych rejonach Polski.

MATERIAŁY I METODY

Próby liści do badań na obecność RYNV pozyskiwano podczas lustracji plantacji maliny oraz testów wykonywanych na zlecenie podmiotów zewnętrznych. Z liści maliny izolowano kwasy nukleinowe metodą adsorpcji na żelu krzemionkowym (Boom i in., 1990), a następnie fragmenty RNA amplifikowano w reakcji RT-PCR z pięcioma parami samodzielnie zaprojektowanych starterów. Uzyskane produkty sekwencjonowano, a otrzymane sekwencje kodujące m.in. białko płaszczka, odwrotną transkryptazę, RNazę H o długości ok. 3,14 kbp składano, analizowano (Lasergene 7.1, DNASTAR) i porównywano z sekwencjami dostępnymi w bazie GenBank. Analizę filogenetyczną przeprowadzono metodą największej wiarygodności (MEGA 5.2., Tamura i in., 2011).

PODSUMOWANIE

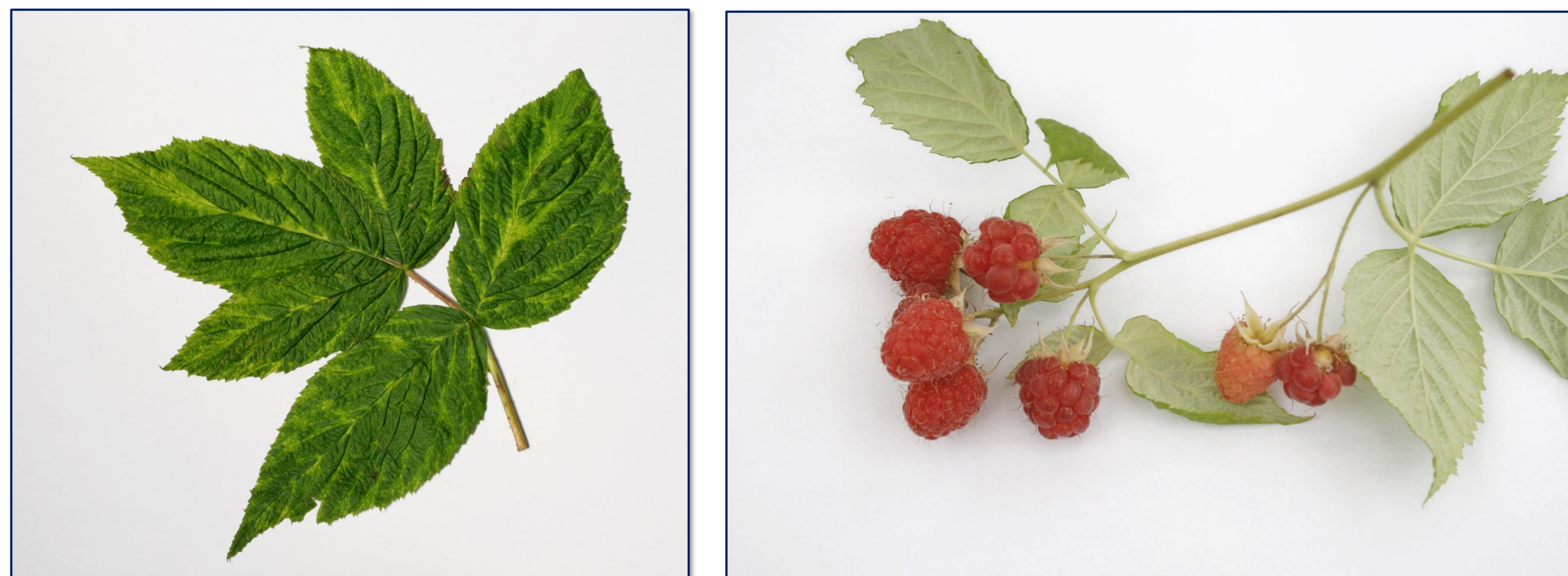
- Stosując metody biologii molekularnej, po raz pierwszy w Polsce wykryto wirusa żółtaczki nerwów maliny.
- Na podstawie analizy sekwencji fragmentu genomu stwierdzono zróżnicowanie genetyczne badanych izolatów RYNV pochodzących z różnych rejonów geograficznych.

LITERATURA

- Boom R. i in. 1990. Rapid and simple method for purification of nucleic acids. J. Clin. Microbiol., 28: 495-503.
- Jones A.T. i in. 2002. Identification of Rubus yellow net virus as a distinct badnavirus and its detection by PCR in Rubus species and in aphids. Ann. Appl. Biol. 141: 1-10.
- Stace-Smith R., Jones A.T. 1987. Rubus yellow net. Agric. Handb. - U. S. Dep. Agric. Comb. For. Pest Res. Dev. Program USA.
- Tamura K. i in. 2011. MEGA5: Molecular Evolutionary Genetics Analysis using Maximum Likelihood, Evolutionary Distance, and Maximum Parsimony Methods. Mol. Biol. Evol. 28: 2731-2739.

WYNIKI

Na niektórych krzewach maliny rosnących na czterech plantacjach w woj. lubelskim, jednej w woj. dolnośląskim oraz w kolekcji odmian maliny i jeżyny w Skierniewicach (woj. łódzkie) obserwowano żółknięcie blaszki liściowej wzdłuż nerwów oraz deformację liści i owoców (Rys. 1).



RYS. 1. Żółtaczka nerwów liści i zdeformowane owoce maliny porażonej RYNV

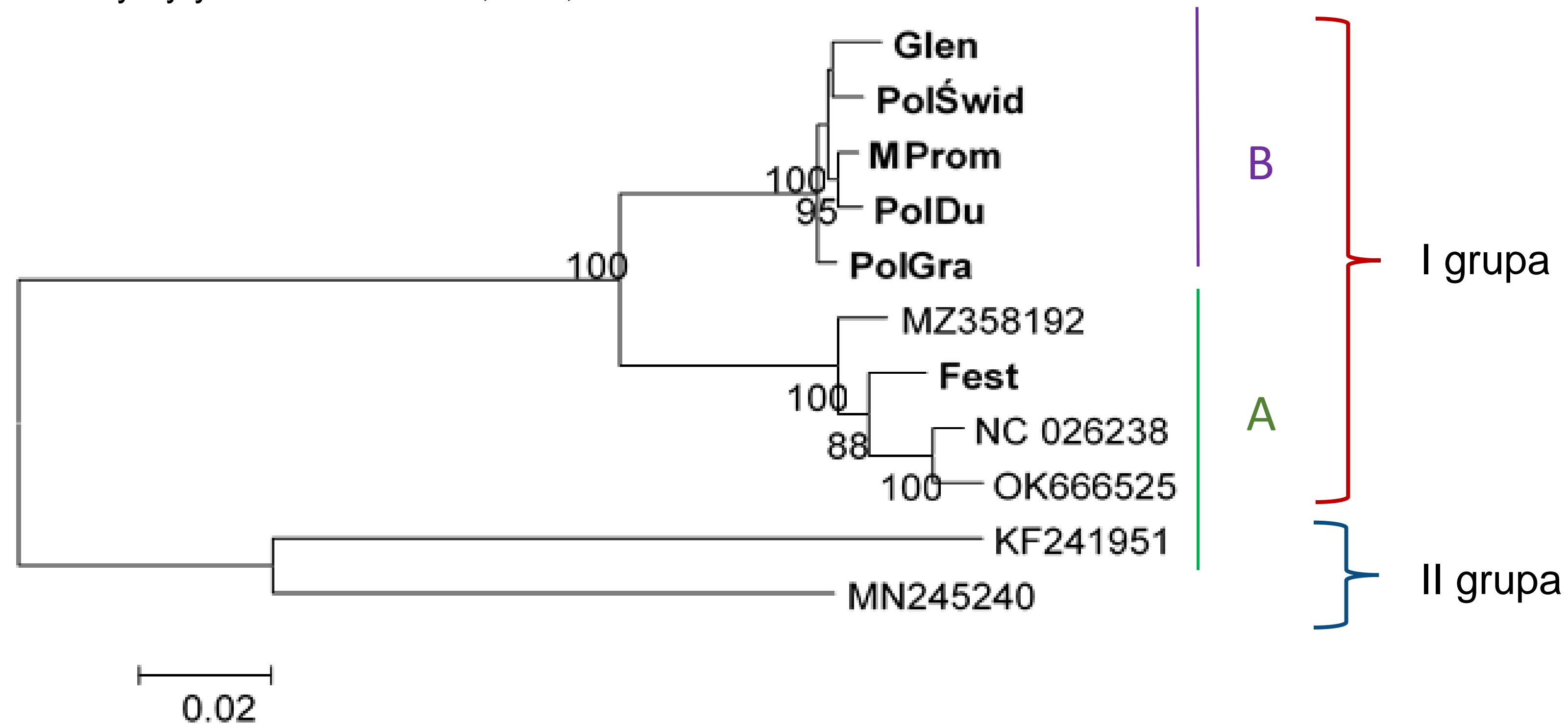
W reakcji RT-PCR wykryto RYNV w próbach z sześciu roślin (po jednej z każdej plantacji) odmian: Glen Ample (Glen), Malling Promise (MProm), Polka (PołŚwid, PołDu, PołGra) oraz Festival (Fest).

Podobieństwo sekwencji nukleotydów badanego fragmentu genomu tych izolatów wynosiło 92,8-99,4%, a najwięcej różnic stwierdzono w sekwencji izolatu Fest. Wykazano 78,0-97,9% podobieństwo sekwencji badanych izolatów oraz pięciu szczepów z maliny w tym: scharakteryzowanego w USA szczepu RYNV-BS z Europy (NC026238), LG z Wielkiej Brytanii (OK666525), Canadian2 z Kanady (KF241951), RYNVCu z Chile (MN254240) oraz szczepu RYNV-BiH z Bośni i Hercegowiny wykrytego w jeżynie (MZ358192).

Na podstawie zróżnicowania sekwencji badanych izolatów oraz szczepów RYNV pochodzących z różnych regionów geograficznych wyróżniono dwie grupy. Szczepy z Europy, w tym te wykryte w Polsce, tworzyły dwie podgrupy w grupie I, zaś szczepy z Chile i Kanady - grupę II.

Wykazano bliskie pokrewieństwo genetyczne izolatów Glen, PołŚwid, MProm, PołDu i PołGra, które lokowały się na tej samej gałęzi drzewa filogenetycznego w grupie I B. Z kolei, izolat Fest wraz ze szczepami RYNV-BiH, LG i RYNV-BS tworzył podgrupę A w tej grupie. Istnieje prawdopodobieństwo, że izolat Fest, wykryty w jednym z krzewów maliny rosnących w kolekcji odmian *Rubus* sp., został przeniesiony z porażonym materiałem roślinnym sprowadzonym z zagranicy.

Grupę II tworzyły szczepy Canadian2 oraz RYNVCu, których podobieństwo sekwencji nukleotydów do sekwencji pozostałych trzech referencyjnych szczepów wirusa wynosiło 77,7-79,1%, zaś do sekwencji izolatów wykrytych w Polsce - 78,0-79,9%.



RYS. 2. Drzewo filogenetyczne przedstawiające podobieństwo sekwencji nukleotydów fragmentu genomu (~3,14 kbp) izolatów wirusa żółtaczki nerwów liści maliny wykrytych w Polsce (pogrubione) oraz analogicznych sekwencji RYNV opublikowanych w bazie GenBank. Dendrogram skonstruowano metodą największej wiarygodności (MEGA 5.2)