



CHARAKTERYSTYKA IZOLATÓW WIRUSÓW POWODUJĄCYCH MOZAIKĘ MALINY

WSTĘP

Malina może być porażana przez ponad 30 wirusów. Jedną z powszechnie występujących chorób wirusowych jest mozaika maliny powodowana przez kompleks kilku wirusów. W Europie sprawcami tej choroby są wirus żółtaczkowy nerwów liści maliny (rubus yellow net virus, RYNV, rodzaj Badnavirus, rodzina Caulimoviridae), wirus nekrozy jeżyny (black raspberry necrosis virus, BRNV, rodzaj Sadwavirus, rodzina Secoviridae) i wirus pstrzości liści maliny (raspberry leaf mottle virus, RLMV, rodzaj Closterovirus, rodzina Closteroviridae).

W zależności od wirusa i jego szczepu, objawy mozaiki maliny są zróżnicowane - od przebarwień na liściach do deformacji owoców (Rys. 1), a nawet zamierania krzewów.

MATERIAŁY I METODY

Próby pobrano losowo ze 146 roślin maliny, z których 17 wykazywało objawy chorobowe. Z liści maliny izolowano kwasy nukleinowe metodą adsorpcji na żelu krzemionkowym (Boom i in., 1990), a następnie fragmenty RNA wirusa żółtaczkowego nerwów liści maliny i wirusa pstrzości liści maliny amplifikowano w reakcji RT-PCR. Uzyskane produkty sekwencjonowano, a otrzymane sekwencje RYNV (białko płaszczka, odwrotna transkryptaza i RNaza H) oraz RLMV (homolog białka płaszczka (CPh) i helikaza) składano, analizowano (Lasergene 7.1, DNASTAR) i porównywano z sekwencjami dostępnymi w bazie GenBank. Analizę filogenetyczną wykonano metodą największej wiarygodności (MEGA 5.2., Tamura i in., 2011).



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

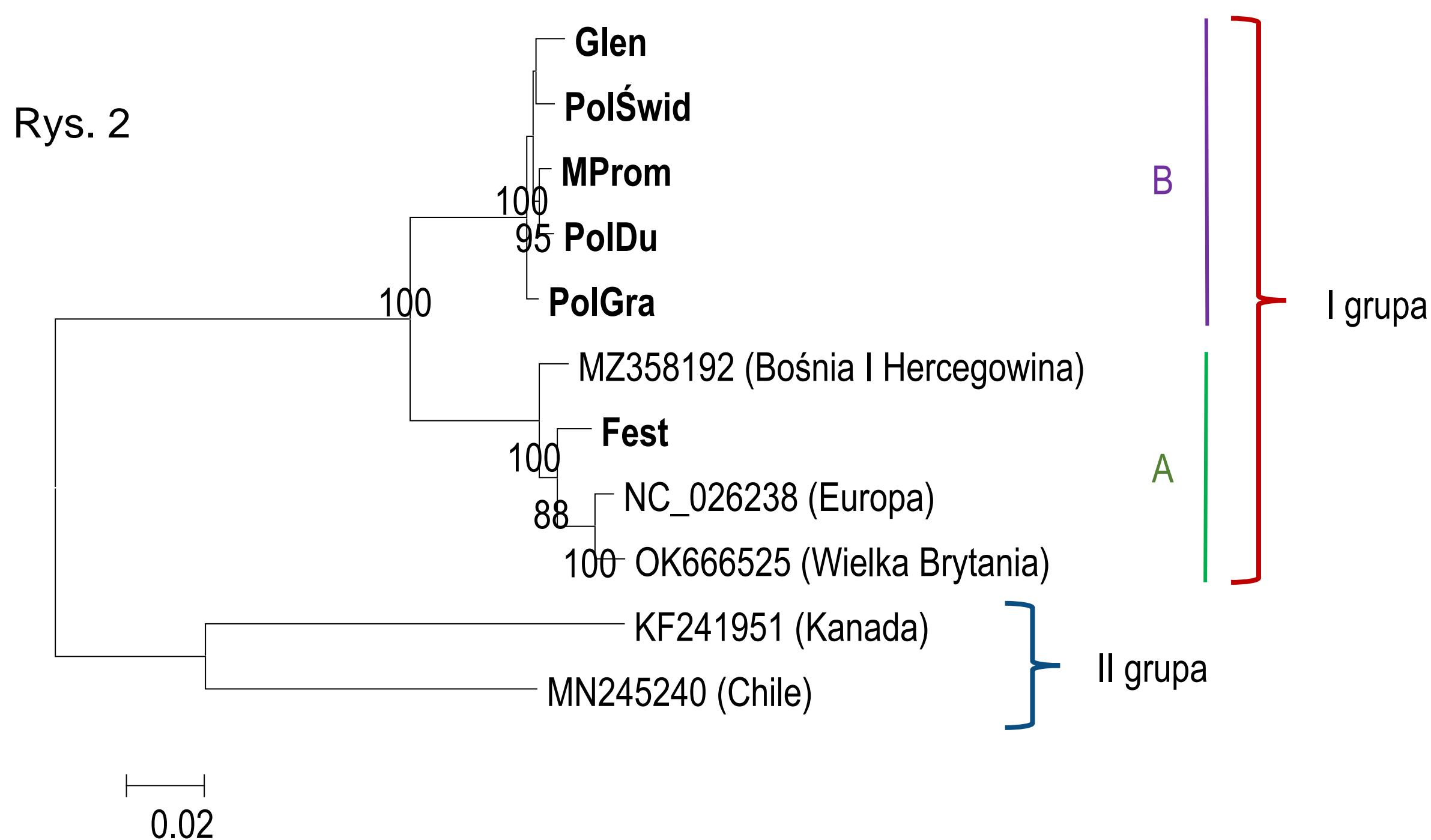
Chlorotyczne przebarwienia na liściach maliny porażonej RLMV

WYNIKI RYNV

RYNV wykryto w próbach liści sześciu roślin maliny odmian: Glen Ample (Glen), Malling Promise (MProm), Polka (PolŚwid, PolDu, PolGra) oraz Festival (Fest).

Podobieństwo sekwencji nukleotydów fragmentu genomu (3,14 kbp) tych izolatów wynosiło 92,8-99,4%, przy czym najwięcej różnic stwierdzono w sekwencji izolatu Fest. Wykazano 78,0-97,9% podobieństwo sekwencji badanych izolatów oraz szczepów referencyjnych RYNV z maliny w tym: scharakteryzowanego w USA szczepu RYNV-BS (NC_026238) z Europy, LG (OK666525) z Wielkiej Brytanii, Canadian 2 (KF241951) z Kanady, RYNVCu (MN254240) z Chile oraz szczepu RYNV-BiH (MZ358192) z Bośni i Hercegowiny wykrytego w jeżynie.

Izolaty RYNV wykryte w Polsce oraz szczepy z Europy tworzyły dwie podgrupy w grupie I, zaś szczepy z Chile i Kanady - grupę II. Wykazano bliskie pokrewieństwo genetyczne izolatów Glen, PolŚwid, MProm, PolDu i PolGra, 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 grupie I (Rys. 2).

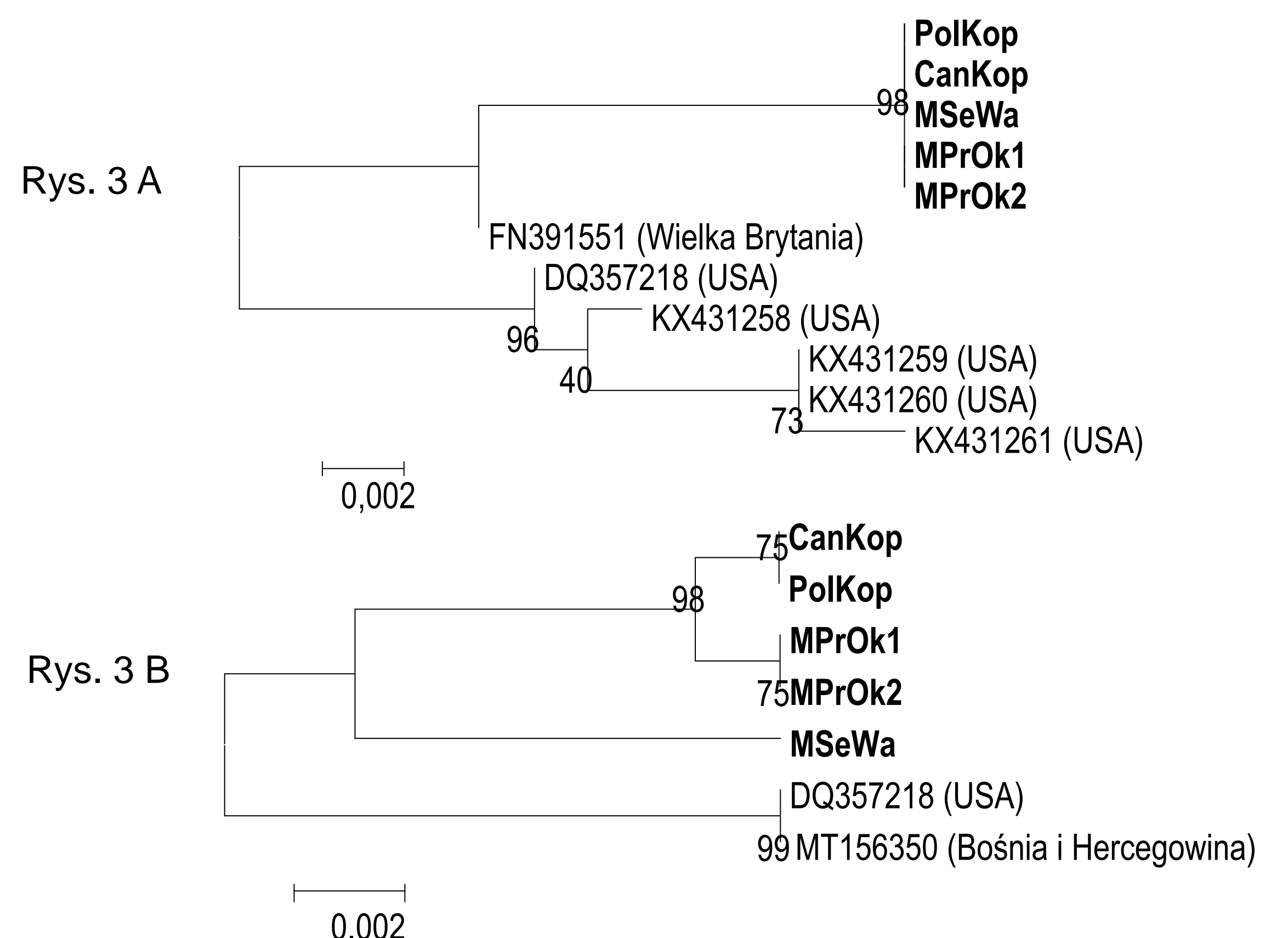


WYNIKI RLMV

RLMV wykryto w próbach liści pięciu roślin maliny odmian: Malling Promise (MPrOk1 i MPrOk2), Canby (CanKop), Polka (PolKop) i Malling Seedling (MSeWa).

Sekwencja 386 nukleotydów (nt) homologu białka płaszczka była identyczna dla wszystkich badanych izolatów. Podobieństwo sekwencji nukleotydów tych izolatów oraz szczepów 'HCRL Glen Clova' (DQ357518) z USA i 'SCRI stock' (FN391551) z Wielkiej Brytanii wynosiło odpowiednio 97,7% i 99%. Na drzewie filogenetycznym polskie izolaty oraz szczep 'SCRI stock' lokowały się w tym samym kładzie, w odróżnieniu od szczepów wirusa z USA (Rys. 3 A).

Analiza sekwencji nukleotydów genu helikazy (660 nt) wykazała 98,5-100% podobieństwo badanych izolatów oraz ich 98% podobieństwo do sekwencji szczepów 'HCRL Glen Clova' i 'RMG' (MT156350) z Bośni i Hercegowiny. Polskie izolaty tworzyły na drzewie filogenetycznym odrębną gałąź, niż szczepy referencyjne (Rys. 3 B).



Drzewa filogenetyczne przedstawiające podobieństwo sekwencji nukleotydów badanych izolatów wirusa żółtaczkowego nerwów liści maliny (Rys. 2) i wirusa pstrzości liści maliny (Rys. 3 A, B) (pogrubione) oraz analogicznych sekwencji RYNV i RLMV zdeponowanych w bazie GenBank. Dendrogram skonstruowano metodą największej wiarygodności (MEGA 5.2)

PODSUMOWANIE

Po raz pierwszy w Polsce wykryto wirusa żółtaczkowego nerwów maliny (RYNV) i wirusa pstrzości liści maliny (RLMV). Wykazano zróżnicowanie genetyczne badanych izolatów oraz szczepów RYNV i RLMV 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
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