

## **Diagnostyka** **Diagnostic**

### ***Cucumber vein yellowing virus (Ipomovirus)***

#### **Zakres**

Standard opisuje protokół diagnostyczny dla *Cucumber vein yellowing virus (Ipomovirus)*.

#### **Zatwierdzenie i nowelizacja**

Zatwierdzony we wrześniu 2007.

#### **Wprowadzenie**

*Cucumber vein yellowing virus (Ipomovirus) (CVYV)* powoduje poważne szkody w uprawach ogórka i innych dyniowatych. Wirus przenoszony jest mechanicznie oraz przez mączlika *Bemisia tabaci*, w sposób półtrwały (Mansour & Al-Musa, 1993). Jego występowanie zostało odnotowane w Iranie, Sudanie oraz w wielu krajach Basenu Morza Śródziemnego, takich jak: Cypr, Izrael, Jordania, Portugalia, Hiszpania i Turcja (Cohen & Nitzany, 1960; Harpaz & Cohen, 1965; Al-Musa i wsp., 1985; Yilmaz i wsp., 1989; Andalucia Department of Agriculture and Fisheries, 2001; Cuadrado i wsp., 2001; Louro i wsp., 2004; Papayiannis i wsp., 2005; OEPP/EPPO, 2005; Bananej i wsp., 2006).

CVYV naturalnie infekuje uprawne rośliny dyniowate, takie jak ogórek (*Cucumis sativus*) (Cohen & Nitzany, 1960), melon (*Cucumis melo*) (Yilmaz i wsp., 1989), arbuz (*Citrullus lanatus*) (Janssen & Cuadrado, 2001) i cukinia (*Cucurbita pepo*) (Rubio i wsp., 2003). Dzikie dyniowate są również przedstawiane jako rośliny żywicielskie w Jordanii (Mansour & Al-Musa, 1993) i w Hiszpanii (Janssen i wsp., 2002). Naturalne infekcje gatunków chwastów należących do rodzin innych niż *Cucurbitaceae* opisano w Hiszpanii (Janssen i wsp., 2002). Prowadzono badania z zastosowaniem mechanicznej inokulacji oraz inokulacji poprzez *B. tabaci* na eksperymentalnych żywicielach należących do dyniowatych, takich jak: *Cucurbita moschata*, *Cucurbita foetidissima*, *Citrullus colocynthis* (Cohen & Nitzany, 1960; Al-Musa i wsp., 1985; Yilmaz i wsp., 1989; Mansour & Al-Musa, 1993). Wirus może infekować zarówno uprawy na otwartych przestrzeniach jak i pod foliowymi tunelami. Skutki ekonomiczne powodowane przez wirusa są poważniejsze w uprawach prowadzonych pod osłonami, ponieważ w takiej sytuacji trudniej jest kontrolować wektora.

Dodatkowe informacje można odnaleźć w arkuszu informacyjnym EPPO dotyczącym *Cucumber vein yellowing virus (Ipomovirus)* (OEPP/EPPO, 2005).

### **Tożsamość**

**Nazwa:** *Cucumber vein yellowing virus (Ipomovirus)*

**Synonimy (w tym nazwy byłe):** Bottle gourd mosaic virus (Cohen & Nitzany, 1960; Harpaz & Cohen, 1965)

**Akronim:** CVYV

**Stanowisko taksonomiczne:** wirusy: *Potyviridae: Ipomovirus*.

**Kategoria fitosanitarna:** EPPO – lista A2, nr 316.

### **Wykrywanie**

#### **Objawy**

Rośliny ogórka porażone CVYV wykazują przejaśnienia nerwów na najmłodszych liściach (Cohen & Nitzany, 1960) (Ryc. 1). Czasami obserwuje się, żółtą/zieloną mozaikę na owocach (Cuadrado i wsp., 2001). Objawy na melonie zostały opisane jako żółknięcie nerwów, przejaśnienie nerwów oraz zahamowanie wzrostu (Yilmaz i wsp., 1989) (Ryc. 2). Zjawisko nagłej śmierci obserwowano na roślinach melona w Hiszpanii (Janssen & Cuadrado, 2001). Na roślinach arbuza czasami obserwuje się delikatną chlorozę liści (Ryc. 3), ale zdecydowanie częściej objawy są niepozorne lub w ogóle nie ulegają ekspresji (Andalucia Department of Agriculture and Fisheries, 2001; Louro i wsp., 2004). Sporadycznie obserwowano pękanie owoców (Janssen & Cuadrado, 2001; Louro i wsp., 2004). Na cukiniach objawy są zróżnicowane, od chlorotycznej plamistości (Ryc. 4) do żółknięcia nerwów, bądź są nieobecne (Andalucia Department of Agriculture and Fisheries, 2001).

#### **Obserwacje ultramikroskopowe**

Obserwacje ultramikroskopowe prowadzone na komórkach z zainfekowanych roślin ujawniły obecność cytoplazmatycznych inkluzji o gwieżdzistym kształcie, charakterystycznych dla infekcji wywołanej przez członków *Potyviridae* (Lecoq i wsp., 2000).



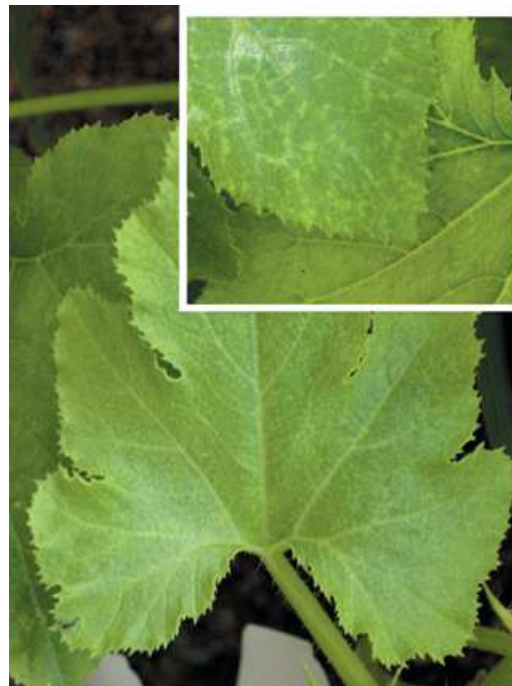
**Ryc. 1** Objawy CVYV na młodych liściach ogórka.



**Ryc. 2** Objawy CVYV na liściach melona.



**Ryc. 3** Objawy CVYV na młodych liściach arbuza.



**Ryc. 4** Objawy CVYV na liściach cukinii.

## Pobieranie próbek

Wstępne badania western blot z użyciem przeciwciał, wykazały obecność wirusowego płaszcza białkowego we wszystkich organach i tkankach zainokulowanych roślin ogórka, włączając w to korzenie, łodygi, liście, szypułki, wąsy, kwiaty, oraz owoce (Martínez-García i wsp., 2004). Jednak w warunkach polowych wirus ten wykazywał nieregularną dystrybucję w obrębie roślin ogórka, melona i cukinii, co zbadano wykonując hybrydyzację tissue print z nieradioaktywnymi sondami cDNA (Rubio i wsp., 2003). W konsekwencji, w celu wiarygodnej diagnozy CVYV, próbki do badań powinny pochodzić z różnych części rośliny.

## Przenoszenie wirusa na rośliny testowe – w sposób mechaniczny oraz za pośrednictwem mączlików

CVYV przenoszony jest w łatwy sposób poprzez inokulację na rośliny, ale nie powoduje objawów (ani miejscowych, ani systemicznych) na *Chenopodium quinoa*. Rekomendowaną rośliną testową zarówno dla celów mechanicznej transmisji jak i pośredniej transmisji przez mączlika jest *Cucumis sativus* (przejaśnienia nerwów i następujące po nich żółknięcie nerwów w systemicznie zainfekowanych liściach). Inokulacja zestawu zróżnicowanych żywicieli wirusów infekujących dyniowate, np. CMV, WMV oraz *Papaya ringspot virus* (PRSV), może w dalszej kolejności umożliwić identyfikację i odróżnienie CVYV od innych, przenoszonych mechanicznie wirusów roślinnych. W szczególności, brak objawów na *C. quinoa* lub *C. amaranticolor* może rozróżnić CVYV od 10 innych przenoszonych z sokiem wirusów infekujących dyniowate, włączając CMV, PRSV i WMV. Infekcja CVYV roślin gatunków dyniowatych bardzo często diagnozowana była również w połączeniu z innymi wirusami przenoszonymi przez *Bemisia tabaci*, takimi jak *Cucurbit yellow stunting disorder virus* (Janssen i wsp., 2003; Louro i wsp., 2004). Dodatkowo nie należy wykluczać koinfekcji z przenoszonym przez *Trialeurodes vaporariorum* *Beet pseudo-yellows virus*, jakkolwiek do tej pory brak doniesień odnośnie takiej kombinacji. Z tych trzech wirusów (CVYV, *Cucurbit yellow stunting disorder virus*, oraz *Beet pseudo-yellows virus*), tylko CVYV przenoszony jest mechanicznie na rośliny testowe ogórka, powodując wyraźne objawy żółknięcia nerwów, bez miejscowych zmian patologicznych.

Skuteczność inokulacji sokiem zależna jest od buforu, który obniża niestabilność wirusa w soku roślinnym, oraz od metody inokulacji i inkubacji roślin testowych, co jest adekwatne do rozwoju objawów. Ta metoda detekcji jest prosta i czuła, jednakże stosowana w pojedynkę prezentuje ograniczoną wartość diagnostyczną. Przynajmniej dwie rośliny z gatunku powinny zostać zainokulowane. Inokulacja roślin testowych użyteczna jest nie tylko ze względu na możliwość wykrycia wirusa, ale również ze względu na możliwość izolacji oraz namnażania wirusa w tkankach roślinnych, co z kolei może znaleźć zastosowanie w kolejnych metodach identyfikacji, takich jak hybrydyzacja tissue print i RT-PCR. Dodatkowo testy biologiczne są elementem zasadniczym w badaniach nad zakresem żywicieli wirusów, a zakażone w testach rośliny używane są w celu utrzymania referencyjnych izolatów wirusa. Szczegóły odnośnie mechanicznego przenoszenia podane są w Załączniku 1.

Alternatywą w stosunku do mechanicznej transmisji jest inokulacja siewek ogórka poprzez zastosowanie przenoszących wirusy dorosłych osobników *Bemisia tabaci*. Szczegóły odnośnie przenoszenia CVYV przez *B. tabaci* podane zostały w Załączniku 1.

## Identyfikacja

Identyfikacja CVYV jest możliwa dzięki łańcuchowej reakcji polimerazy z zastosowaniem odwrotnej transkryptazy (RT-PCR) i hybrydyzacji kwasów nukleinowych.

### Łańcuchowa reakcja polimerazy z zastosowaniem odwrotnej transkryptazy (RT-PCR)

Metoda ta umożliwia wykrycie izolatów CVYV pochodzących z Izraela, Hiszpanii, Portugalii i Cypru. Wraz z próbkami testowymi w analizie muszą być uwzględnione negatywne i pozytywne próbki kontrolne. Szczegółowy protokół umieszczony jest w Załączniku 2 i ponieważ został on gruntownie przetestowany, jest zalecany.

### Hybrydyzacja kwasów nukleinowych

Hybrydyzacja kwasów nukleinowych jest najbardziej odpowiednią metodą, gdy mamy do przebadania dużą ilość roślin. Sposób wykonania hybrydyzacji kwasów nukleinowych z wykorzystaniem całkowitego RNA lub tissue prints przedstawiony jest w Załączniku 3.

Należy postępować zgodnie z procedurami wykrywania i identyfikacji opisanymi w tym protokole oraz przedstawionymi w diagramie przepływowym na Ryc. 5. Jest wysoce prawdopodobnym, że mamy do czynienia z CVYV, jeśli objawy żółknięcia nerwów i/lub mozaiki widoczne są na roślinach dyniowatych w połączeniu z obecnością *Bemisia tabaci* (lub uogólniając, mączlików) i choroba bez trudu przenoszona jest poprzez mechaniczną inokulację jedynie na dyniowate, ale **nie** powoduje objawów (ani miejscowych, ani systemicznych) na *Chenopodium quinoa*. Sposób postępowania nie zmienia się w przypadku braku objawów i oznak obecności mączlików.

Pozytywna identyfikacja wymaga spełnienia przynajmniej **jednego** z poniższych:

- Amplifikacji fragmentu o długości 450-bp w reakcji RT-PCR z użyciem specyficznych starterów
- Hybrydyzacji kwasów nukleinowych wyekstrahowanego całkowitego RNA lub tissue-printing.

W przypadkach wątpliwych zaleca się potwierdzenie poprzez inokulację na *C. sativus* lub posłużenie się metodą molekularną inną aniżeli zastosowana w pierwotnym badaniu.

### Materiały odniesienia

Wszystkie roślinne materiały odniesienia, tj. izolaty CVYV oraz izolaty najważniejszych wirusów infekujących rośliny dyniowate dostępne są w Plant Virus Division of the German Collection of Microorganisms and Cell Cultures, Braunschweig, Germany. Można tam pozyskać również plazmidy niosące wklonowane CVYV, preparaty całkowitych kwasów nukleinowych z ogórków zainfekowanych CVYV, liofilizowany materiał roślinny i poddane procesowi kontroli jakości, wyznakowane digoksygeniną, sondy RNA lub cDNA ([www.dsmz.de](http://www.dsmz.de)). Kod dostępu w bazie GenBank to AF233429 oraz AJ301640.

## **Raport i dokumentacja z badań**

Wytyczne odnośnie raportów i dokumentacji z badań zawarte są w Standardzie EPPO PM7/77 *Documentation and reporting on a diagnosis*.

### **Podziękowania**

Woryginalne protokół ten został napisany przez:

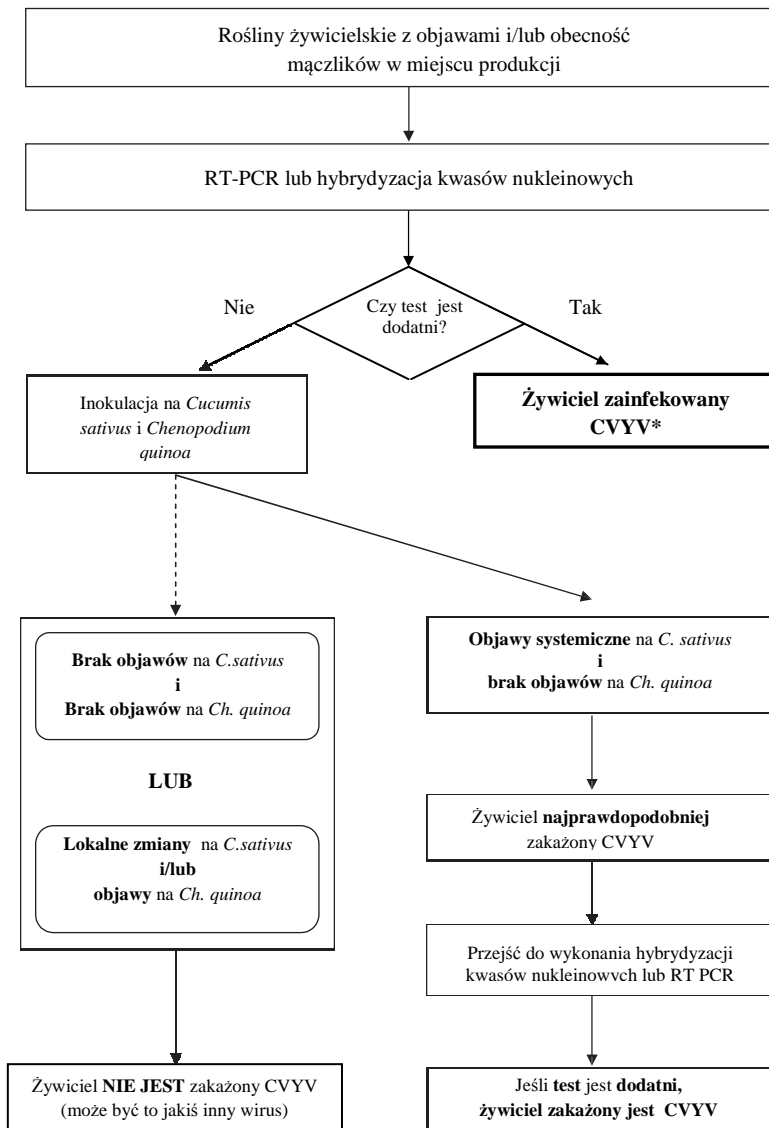
P. Caciagli, Istituto di Virologia Vegetale, CNR, Strada delle Cacce 73, 10135 Torino, Italy.

D. Janssen, Centro de Investigación y Formación Agraria, IFAPA, Autovía del Mediterraneo km 420, E-04745 La Mojonera, Almeria, Spain.

D. Louro, Estação Agronómica Nacional, INIAP, Quinta do Marquês, 2784-505 Oeiras, Portugal.

A. M. Vaira, Istituto di Virologia Vegetale, CNR, Strada delle Cacce 73, 10135 Torino, Italy.

S. Winter, Plant Virus Division, DSMZ, C/o BBA, 11/12 Messeweg, D-38104 Braunschweig, Germany.



\*w przypadkach rozstrzygających, zalecane jest potwierdzenie poprzez inokulację na *C. sativus* lub zastosowanie metody molekularnej innej aniżeli zastosowana w pierwszym badaniu.

Ryc. 5 Schemat przepływowi wykrywania i identyfikacji CVYV.

## Materiały źródłowe<sup>1</sup>

Al-Musa AM, Qusus SJ & Mansour AN (1985) Cucumber vein yellowing virus on cucumber in Jordan. *Plant Disease* **69**, 361.

Andalucia Department of Agriculture and Fisheries (2001) Virus de las venas amarillas del pepino. *Avisos e Informaciones Fitosanitarias*, no. 54, Diciembre 2001.

<sup>1</sup> Została zachowana oryginalna pisownia (przyp. tłum.)



Departamento de Sanidad Vegetal, Junta de Andalucía. Consejería de Agricultura y Pesca (ES).

Bananej K, Desbiez C, Girard M, Wipf-Scheibel C, Vahdat I, Kheyr-Pour A *et al.* (2006) First Report of Cucumber vein yellowing virus on Cucumber, Melon, and Watermelon in Iran. *Plant Disease* **90**, 1113.

Cohen S, Nitzany FE (1960) A whitefly transmitted virus of cucurbits in Israel. *Phytopathologia Mediterranea* **1**, 44–46.

Cuadrado IM, Janssen D, Velasco L, Ruiz L & Segundo E (2001) First report of Cucumber vein yellowing virus in Spain. *Plant Disease* **85**, 336.

Harpaz I & Cohen S (1965) Semipersistent relationship between cucumber vein yellowing virus (CVYV) and its vector, the tobacco whitefly (*Bemisia tabaci*). *Journal of Phytopathology* **54**, 240–248.

Janssen D & Cuadrado IM (2001) Whitefly problems escalate within Spanish cucurbit crops. *ESWN Newsletter* **11**, 1–2.

Janssen D, Ruiz L, Velasco L, Segundo E & Cuadrado IM (2002) Non-cucurbitaceous weed species shown to be natural hosts of Cucumber vein yellowing virus in south-eastern Spain. *Plant Pathology* **51**, 797–797.

Janssen D, Ruiz L, Cano M, Belmonte A, Martín G, Segundo E *et al.* (2003) Physical and genetic control of *Bemisia tabaci*-transmitted *Cucurbit yellow stunting disorder virus* and *Cucumber vein yellowing virus* in cucumber. *IOBC WPRS Bulletin* **26**(10), 101–106.

Lecoq H, Desbiez C, Delécolle B, Cohn S & Mansour A (2000) Cytological and molecular evidence that the whitefly-transmitted *Cucumber vein yellowing virus* is a tentative member of the family *Potyviridae*. *Journal of General Virology* **81**, 2289–2293.

Louro D, Quinot A, Neto E, Fernandes JE, Marian D, Vecchiati M *et al.* (2004) Occurrence of *Cucumber vein yellowing virus* in cucurbitaceous species in southern Portugal. *Plant Pathology* **53**, 241–241.

Mansour A & Al-Musa A (1993) Cucumber vein yellowing virus; host range and virus vector relationships. *Journal of Phytopathology* **137**, 73–78.

Martínez-García B, Marco CF, Goytia E, López-Abella D, Serra MT, Aranda MA *et al.* (2004) Development and use of detection methods specific for *Cucumber vein yellowing virus* (CVYV). *European Journal of Plant Pathology* **110**, 811–821.

OEPP/EPPO (2005) Data sheets on quarantine pests. *Cucumber vein yellowing ipomovirus*. *Bulletin OEPP/EPPO Bulletin* **35**, 419–421.

Papayiannis LC, Ioannou N, Boubourakas IN, Dovas CI, Katis NI & Falk BW (2005) Incidence of viruses infecting cucurbits in Cyprus. *Journal of Phytopathology* **153**, 530–535.

Rubio L, Janssen D, Cuadrado IM, Moreno P & Guerri J (2003) Rapid detection of cucumber vein yellowing virus by tissue-print hybridisation with digoxigenin-labelled cDNA probes. *Journal of Virological Methods* **114**, 105–107.

Yilmaz MA, Ozaslan M & Ozaslan D (1989) Cucumber vein yellowing virus in cucurbitaceae in Turkey. *Plant Disease* **73**, 610.

## **Załącznik 1**

### **Przenoszenie mechaniczne**

Siewki dyniowatych roślin testowych preferencyjnie powinny zostać zainokulowane w

stadium liścieni tj. kiedy liścienie są w pełni wykształcone, ale jeszcze przed wykształceniem pierwszych liści właściwych. Inokulacja pierwszych liści właściwych również jest zadowalająco czuła.

Inokulum przygotowywane jest poprzez zmiżdżenie zainfekowanego materiału, najlepiej tkanek pochodzących z młodych liści z objawami, w 0,05 M Na/K buforze fosforanowym, pH 7,0, zawierającym 1 mM Na<sub>2</sub>EDTA, 5 mM sodium diethyl dithiocarbamate (DIECA), 5 mM kwas tioglikolowy (thioglycolic acid), przy użyciu schłodzonego mózdzierza i tłuczka. Do homogenatu dodawana jest szpatułka aktywnego węgla drzewnego, który schłodzony, przechowywany jest na lodzie, aż do zakończenia inokulacji. Inokulacja wykonywana jest poprzez delikatne wcieranie inokulum na powierzchni liścieni, poprzednio posypanych sproszkowanym karborundem. Po inokulacji, rośliny powinny zostać splukane wodą i prowadzone w szklarni lub komorach fitotronowych w 22–26°C.

Objawy na testowych roślinach ogórka, prowadzonych w średniej temperaturze 25°C, pojawiają się po upływie 8–12 dni i zazwyczaj są widoczne na drugich liściach właściwych. W niższych temperaturach rozwój objawów jest powolny i są one łagodniejsze lub nawet nieobecne w przypadku niektórych zainfekowanych roślin.

### **Przenoszenie na rośliny testowe za pośrednictwem mączlików**

Jeśli istnieje taka możliwość, należy umożliwić dorosłym osobnikom *B. tabaci* pochodzącym z kolonii wolnej od CVYV żerowanie na podejrzanych o porażenie próbkach polowych, przez 8 do 32-godzinny żer nabycia (ang. acquisition access period) (AAP), w plastikowej klatce. Na koniec AAP, przenieść owady na rośliny testowe, umieszczając owady (około 15 na roślinę) w małych klateczkach przytwierdzanych (patrz, dla przykładu, Muniz & Nombela, 2001) do pierwszego lub drugiego liścia właściwego roślin testowych. Usunąć klatki z mączlikami po co najmniej 12-godzinnym żerze inokulacyjnym (ang. inoculation access period) (IAP), oznaczając liście poddane inokulacji permanentnym markerem. Rośliny testowe prowadzić w temperaturze 24–26°C. W celu uniknięcia rozwoju dorosłych mączlików, po około 10 dniach od zakończenia IAP usunąć z każdej z roślin liść poddany inokulacji. Jeśli nie jest dostępna wolna od CVYV kolonia *B. tabaci*, owady można pozyskać z roślin lub liści wykazujących objawy porażenia i przenieść na 24-godzinny okres IAP, jak opisano powyżej. W takim przypadku, należy zastosować większą ilość owadów przypadających na roślinę, o ile to możliwe, w różnych klateczkach przytwierdzonych do rośliny.

Objawy pojawiają się zazwyczaj w ciągu 15 dni od zakończenia IAP.

### **Załącznik 2**

#### **Łańcuchowa reakcja polimerazy z odwrotną transkrypcją (Reverse transcriptase - polymerase chain reaction) (RT-PCR)**

##### *Ekstrakcja RNA*

Próbki liści (około 200 mg) miażdżone są w zmrożonym mózdzierzu, w ciekłym azocie. Dodawany jest jeden ml odczynnika do izolacji całkowitych kwasów nukleinowych (TRI Reagent, Ambion, USA). Przygotowana w ten sposób tkanka rozmrażana jest w temperaturze pokojowej i przenoszona do 1,5 ml probówki reakcyjnej. W kolejnych krokach postępuje się zgodnie z instrukcjami producenta (Ambion).

Osad jest osuszony i zawieszony w 15 µl wody traktowanej DEPC. 1 µl zawieszonego RNA jest użyte i rozcieńczone 1:70 do reakcji RT-PCR. Ekstrakt całkowitego RNA może być przechowywany w  $-80^{\circ}\text{C}$ .

TRIzol Reagent (Invitrogen, USA) lub inne, podobne, jednofazowe roztwory kwaśny fenol-chloroform również mogą być użyte w miejsce TRI Reagent.

Alternatywnie, inne kity do ekstrakcji RNA są dostępne komercyjnie i są odpowiednie do wykrywania CVYV (np. skutecznym okazał się być stosowany RNeasy, Qiagen, Niemcy).

### *RT-PCR*

One-step RT-PCR system (Invitrogen) używany jest zgodnie z zaleceniami producenta i z zastosowaniem starterów opisanych przez Cuadrado i wsp. (2001).

Użycie pary starterów 5'-AGCTAGCGCGTATGGGGTGAC-3'[CVYV(+)] i 5'-GCGCCGCAAGTGCAAATAAAT-3' [CVYV(-)] prowadzi do uzyskania fragmentu 450-bp genu białka płaszczka CVYV.

Rozcieńczone RNA jest denaturowane w  $65^{\circ}\text{C}$  przez 5 min i szybko schłodzone na lodzie. W celu przygotowania 25 µl reakcji, do schłodzonych probówek PCR (0,2 ml) rozporcjowane jest 5 µl zdenaturowanego RNA i 20 µl mieszaniny reakcyjnej zawierającej 0,25 µM każdego ze starterów i 0,5 µl mieszaniny RT-Taq.

Probówki przenoszone są do wcześniej nagrzanego termocyklera ( $50^{\circ}\text{C}$ ) w celu przeprowadzenia natychmiastowej odwrotnej transkrypcji, po której ma miejsce etap denaturacji i amplifikacji PCR (35 cykli). Warunki dla RT-PCR to:  $50^{\circ}\text{C}$  przez 30 min,  $94^{\circ}\text{C}$  przez 2 min, 35 cykli ( $94^{\circ}\text{C}$  przez 30 s,  $55^{\circ}\text{C}$  przez 30 s,  $72^{\circ}\text{C}$  przez 1 min.) i  $72^{\circ}\text{C}$  przez 5 min.

Pięćomikrolitrowe porcje każdego z produktów reakcji powinny być analizowane w 2% żelu agarozowym, w buforze TBE.

Obecność CVYV w podejrzonej próbce roślinnej jest potwierdzona, jeśli w reakcji RT-PCR znaleziono fragmenty wielkości 450 bp.

## **Załącznik 3**

### **Hybrydyzacja kwasów nukleinowych**

#### *Przygotowanie próbki*

Najlepsze rezultaty osiąga się z wyizolowanego całkowitego RNA pozyskanego albo z zastosowaniem komercyjnie dostępnego kitu do izolacji RNA lub roztworu (np.: RNeasy,

Qiagen, Niemcy; TRI Reagent, Ambion, USA; TRIzol Reagent, Invitrogen, USA) postępując według zaleceń producenta lub używając ustanowione protokoły. Jako przykład, poniższa procedura zaczerpnięta została od Celix i wsp. (1996).

Całkowite RNA ekstrahowane jest z 0,2 g tkanki liścia roztartej w ciekłym azocie z dodatkiem 2 objętości 2% dodecylosiarczanu sodu (SDS), 100 mM Tris-HCl (pH 8,0) i 10 mM EDTA. Po wymieszaniu na wortexie, próbki ekstrahowane są 1 objętością mieszaniny fenol-chloroform, a faza wodna przenoszona jest do 2 M LiCl. Po całonocnej inkubacji w 4°C, próbki wirowane są w 12 000 g przez 15 min, a osady zawieszane w 100 µl sterylnej H<sub>2</sub>O.

Przeprowadzenie badania w formacie tissue print możliwe jest również poprzez zdecydowane dociśnięcie skrawków poprzecznych świeżo pociętych szypulek na membranie nylonowej (Rubio i wsp., 2003). Skrawki poprzeczne z kilku ogonków pochodzących z tej samej rośliny stanowiącej próbkę należy osuszyć na membranie. Po wysuszeniu powietrzem, membrana naświetlana jest światłem UV (50 mJ) w crosslinkerze. Chociaż tissue printing jest metodą prostą i szybką, w przypadku, gdy istnieje konieczność przebadania dużej ilości próbek, interpretacja wyników jest w zasadzie łatwiejsza, jeśli na membrany naniesiemy ekstrakty całkowitego kwasu nukleinowego z roślin. Taki sposób postępowania zapewnia wyraźniejszy pozytywny sygnał i zalecany jest w przypadku złożonych, następujących po sobie analiz metodą hybrydyzacji prowadzonych w celu wykrycia obecności kilku wirusów.

### *Sondy molekularne*

Ogólnie, w celu wykrycia CVYV zaleca się używanie sond RNA, aczkolwiek sondy dsDNA działają dobrze (Rubio i wsp. 2003).

### *Sondy RNA*

Za pomocą sond RNA znakowanych digoksygeniną-11-UTP, syntetyzowanych poprzez transkrypcję *in vitro* z plazmidów niosących odpowiednie sekwencje wirusowe, osiągnięte zostały wysoka czułość i specyficzność w detekcji wirusa. Sondy do wykrywania najbardziej znaczących wirusów atakujących rośliny dyniowate, włączając CVYV, dostępne są w DSMZ Plant Virus Division, Braunschweig, Niemcy, <http://www.dsmz.de> i mogą być pozyskane zarówno jako plazmidowe klony lub jako sondy RNA znakowane DIG.

Hybrydyzacja z sondami RNA powinna przebiegać według wytycznych rozpowszechnionych w obszarze diagnostyki, które dostarczają informacji wystarczających do przeprowadzenia hybrydyzacji, w tym temperatury oraz czasu trwania poszczególnych etapów. Sondy RNA, raz użyte w buforze hybrydyzacyjnym zawierającym formamid, mogą być kilkakrotnie ponownie używane bez utraty sygnału.

### *Sondy dsDNA*

Poniższa procedura zaczerpnięta jest od Rubio i wsp. (2003).  
W celu zsyntetyzowania sondy specyficznej względem CVYV w reakcji RT-PCR, zaprojektowano następujące startery:

VVA1: (5'- GGGTCATGATGTTGTCCCCAGCTTCATTT- GAATC-3'), który odpowiada pozycjom 559–580 CVYV RNA (sekwencja GenBank AF233429) i zawiera miejsce restrykcyjne dla *Rca* I (podkreślone nukleotydy), oraz VVA2 (5'- CCCCGCTTAGCAAATACAGTAATTACTAAGAACG-3'), który jest komplementarny do pozycji 1701–1723 tej samej sekwencji i zawiera miejsce restrykcyjne dla *Cel* II (podkreślone nukleotydy). Całkowite RNA z roślin zainfekowanych CVYV ekstrahowane było z użyciem TRIzol Reagent (Invitrogen) postępując według zaleceń producenta. Porcja tego ekstraktu odpowiadająca 2 mg świeżej tkanki denaturowana jest w 95°C przez 5 min, chłodzona na lodzie i natychmiast odwrotnie transkrybowana poprzez inkubację w 42°C przez 1 h w 20 µl mieszaniny reakcyjnej zawierającej: first strand buffer, 1 mM DTT, 1 mM każdego z dCTP, dATP, dGTP i dTTP, 0,4 µM startera VVA2, 4U RNASEOUT inhibitor rybonukleazy (Invitrogen) i 20U Superscript II RNAzy H-(Invitrogen).

Znakowanie digoksygeniną odbywa się w następujący sposób: porcja (1/10) przygotowanej w powyższy sposób mieszaniny amplifikowana jest w reakcji PCR, w 20 µl mieszaniny reakcyjnej zawierającej PCR buffer, 1,5 mM MgCl<sub>2</sub>, 1 mM każdego z czterech dNTPs, 70 µM DIG-UTP (Roche), 0,5 U *Taq* DNA polimerazy (Invitrogen) i 0,2 µM każdego ze starterów VVA1 i VVA2, w następujących warunkach: 94°C przez 2 min, 35 cykli (94°C przez 30 s, 50°C przez 30 s, 72°C przez 1 min), 72°C przez 5 min.

Pięciomikrolitrowe porcje każdego z produktów reakcji analizowane są w 2% żelu agarozowym, w 0,5X buforze TBE, szacowana jest ilość powstałej sondy.

Prehybrydyzować przez 2 h w ULTRAhyb hybridization buffer (Ambion) w 55°C, następnie dodać około 25 ng wyznaczonej digoksygeniną sondy i inkubować przez noc w 55°C.

Membrana jest następnie dwukrotnie płukana (každorazowo 5 min) w 2× SSC i 1% SDS w temperaturze pokojowej i dwukrotnie (každorazowo 15 min) w 0,1× SSC i 0,1% SDS w 65°C.

Hybrydyzacja prowadzona jest z użyciem zestawu DIG Luminescent Detection kit (Roche) postępując zgodnie z zaleceniami producenta.

W teście należy ująć badanie zdrowych roślin, by umożliwić rozróżnienie pomiędzy reakcjami pozytywną i negatywną.

<b>Tłumaczenie z jęz. angielskiego:</b>	<b>Zatwierdził:</b>
Justyna Pięcińska (GIORiN CL)	Janina Butrymowicz (GIORiN CL)
30.10.2014	