

SPRAWOZDANIE MERYTORYCZNE**z realizacji zadania na rzecz postępu biologicznego w produkcji roślinnej w 2018 roku****A. INFORMACJE OGÓLNE**

Tytuł zadania: Występowanie dotychczas nie monitorowanych wirusów (HpLV, ArMV) i wiroidów (HpSVd, AFCVd, CBCVd) na plantacjach produkcyjnych chmielu w Polsce.
Numer zadania: <i>(w załączniku nr 8 do rozporządzenia Ministra Rolnictwa i Rozwoju Wsi z dnia 29 lipca 2015 r. w sprawie stawek dotacji przedmiotowych dla różnych podmiotów wykonujących zadania na rzecz rolnictwa (Dz. U. poz. 1170 z późn. zm.))</i> 107
Planowany okres realizacji zadania: 2018 r.
Planowane nakłady w zł: 298 800

B. DANE WNIOSKODAWCY

Imię i nazwisko osoby reprezentującej jednostkę badawczą, (tytuł lub stopień naukowy, stanowisko, nazwa i adres jednostki badawczej, telefon, fax)
Wiesław Aleksander Oleszek, prof. dr hab. czł. koresp. PAN Dyrektor Instytut Uprawy Nawożenia i Gleboznawstwa – Państwowy Instytut Badawczy ul. Czartoryskich 8 24-100 Puławy tel. 81 4786 700 fax: 81 4786 900

C. INFORMACJA O WYKONAWCACH

1. Zespół badawczy

kierownik zadania		
imię i nazwisko	stopień i tytuł naukowy	miejsce zatrudnienia
Marcin Przybyś	dr	IUNG-PIB
wykonawcy zadania		
imię i nazwisko	stopień i tytuł naukowy	miejsce zatrudnienia
Urszula Skomra	dr	IUNG-PIB
Grażyna Korbecka-Glinka	dr	IUNG-PIB
Teresa Doroszewska	prof. dr hab.	IUNG-PIB

2. Kierownik zadania

Marcin Przybyś, dr
Instytut Uprawy Nawożenia i Gleboznawstwa – Państwowy Instytut Badawczy
Zakład Hodowli i Biotechnologii Roślin
ul. Czartoryskich 8
24-100 Puławy
tel. 81 4786 934
tel. sekretariat: 81 4786 931
e-mail: mprzybys@iung.pulawy.pl

Kontakt w przypadku nieobecności kierownika zadania
Urszula Skomra, dr
Instytut Uprawy Nawożenia i Gleboznawstwa – Państwowy Instytut Badawczy
Zakład Hodowli i Biotechnologii Roślin
ul. Czartoryskich 8
24-100 Puławy
tel. 81 4786 943

D. OPIS ZADANIA

1. Cele zadania

Lp.	Cel	Czy cel został zrealizowany (tak/nie ¹ /częściowo ¹)
	Ocena szkodliwości chorób wirusowych dla polskich plantacji chmielu, poprzez określenie występowania w Polsce wirusów (HpLV i ArMV) oraz wiroidów (CBCVd, HpSVd, AFCVd).	tak
	Opracowanie molekularnych metod niezależnego wykrywania wszystkich wymienionych patogenów	tak

¹ Jeśli dotyczy – proszę opisać pod tabelą, w jakim stopniu cel został osiągnięty i podać przyczyny

2. Harmonogram realizacji zadania

Lp.	Nazwa tematu badawczego	Termin rozpoczęcia – zakończenia realizacji tematu badawczego w miesiącach od rozpoczęcia realizacji zadania	Przewidywane koszty realizacji tematu badawczego
1	Gromadzenie próbek chmielu z plantacji produkcyjnych i banku genów	IV - IX	29 800
2	Opracowanie metody wykrywania poszczególnych badanych wirusów i wiroidów	I - VIII	57 000
3	Wykrywanie patogenów chmielowych w 900 próbkach zgromadzonych w trakcie sezonu wegetacyjnego	IV - XII	212 000
Razem			298 800

3. Opis tematów badawczych

3. 1. Temat badawczy 1

Cel tematu badawczego 1: Gromadzenie próbek chmielu z plantacji produkcyjnych i banku genów

Plantacje chmielu w Polsce mogą być zagrożone przez nowe patogeny. Pojawianiu się nowych patogenów na plantacjach sprzyja import materiału roślinnego, w tym sadzonek chmielu. Celem tego tematu badawczego jest gromadzenie próbek chmielu z różnych rejonów uprawy chmielu oraz w różnych fazach rozwojowych. Próbki posłużą jako materiał badawczy do wykrywania wirusów i wiroidów chmielu.

Cel tematu badawczego 1 został osiągnięty.

Materiały i metody

Próbki roślin chmielu pobierano z plantacji produkcyjnych zlokalizowanych we wszystkich rejonach uprawy chmielu w Polsce: lubelskim, wielkopolskim, dolnośląskim (Fot. 1). Próbki pobierano zarówno z odmian typu gorzkiego jak i aromatycznego. Dodatkowo gromadzono próbki z kolekcji odmian chmielu utrzymywanej w IUNG-PIB w Puławach. Próbki chmielu gromadzono 3-krotnie w trakcie sezonu wegetacyjnego, co wynikało z faktu, iż niektóre patogeny są możliwe do wykrycia tylko w określonych stadiach rozwojowych rośliny. Pierwszy termin obejmował okres naprowadzania roślin chmielu na przewodniki, drugi obejmował fazę kwitnienia, a trzeci fazę dojrzałości. Próbki w postaci liści z różnych pięter rośliny pobierano do sterylnych probówek typu Falcon i jeszcze na plantacji schładzano do 4°C, a następnie transportowano do laboratorium. W laboratorium ze schłodzonych próbek przygotowywano podpróbki poprzez odbieranie po 50 mg materiału z kilku liści i umieszczenie go w probówkach typu Eppendorf wypełnionych 6 kulkami ceramicznymi o średnicy 2,8 mm. Tak przygotowane podpróbki i próbki zamrażano w -86°C i w takiej temperaturze były one przechowywane do czasu wykonania analiz molekularnych.

Wyniki

Ogółem w roku 2018 zgromadzono 905 próbek chmielu (Tab. 1). Próbki gromadzono zarówno z roślin z objawami chorobowymi jak i z roślin bezobjawowych (Fot. 3).

Tab. 1. Próbki chmielu zgromadzone w ramach realizacji tematu badawczego 1:

Rejon uprawy	Odmiany i linie hodowlane chmielu				Ogółem
	aromatyczne		goryczkowe		
Lubelski	Lomik	36	Marynka	150	540
	Lubelski	96	Magnum	201	
	Perle	33			
	Sybilla	24			
Wielkopolski	Lubelski	15	Marynka	30	201
	Perle	15	Magnum	126	
	Hallertau Tradition	15			
Dolnośląski	Lubelski	30	Marynka	36	159
	Hallertau Tradition	36	Magnum	57	
Kol. IUNG-PIB	Sybilla	1	Oktawia	2	
	10/50	1			
	10/52	1			
	Razem	303		602	

W roku 2018, próbki pobrano z 32 plantacji produkcyjnych i kolekcji odmian IUNG-PIB, o łącznym areale 54 ha.



Rys. 1. Pobieranie próbek z plantacji produkcyjnej chmielu.



Rys. 2. Oznaczenie roślin etykietą.



Fot. 3. Liść chmielu odm. Magnum z objawami HSVd

Dyskusja

Różne patogeny są wykrywalne w zakażonych roślinach chmielu w różnych stadiach rozwojowych rośliny. HpLV jest wirusem trudnym do diagnostyki. Możliwość jego wykrycia jest zależna od stadium rozwojowego zakażonej rośliny. HpLV najłatwiej wykryć pobierając próbki w postaci dojrzałych liści z dolnej jej części w drugiej połowie okresu wegetacyjnego (Ziegler i in., 2014, Tsai i in., 2012). W przypadku detekcji ArMV, próbki liści najlepiej pobierać w okresie wiosennym, bo tylko wtedy możliwe jest stwierdzenie porażenia tym wirusem (Wetzel i in., 2002). Na temat optymalnego czasu dla pobierania pozostałych badanych patogenów brak jest danych literaturowych dlatego przyjęto strategię pobierania próbek do badań w 3 terminach sezonu wegetacyjnego. W tym celu każdą roślinę, z której pobierano próbkę do badań oznaczano etykietą, aby możliwe było pobranie 2 dodatkowych próbek w późniejszym terminie (Fot. 2).

Wnioski

- Z uwagi na nierównomierne rozmieszczenie badanych patogenów w tkankach gospodarza oraz ze względu na ograniczenia możliwości detekcji tych patogenów uzależnione od terminu gromadzenia próbek, należy pobierać próbki w kilku terminach z kilku miejsc na roślinie (pęd główny i boczne, różne piętra rośliny)

Mierniki dla tematu badawczego 1:

Lp.	miernik ²	wartość miernika podana w opisie zadania	wartość miernika zrealizowana
1.1	Liczba próbek pobranych z plantacji produkcyjnych i kolekcji odmian	900	905

² Podać miernik – np. ilość testów, prób, badanych genotypów etc.

3.2 Temat badawczy 2

Cel tematu badawczego 2

Celem tematu badawczego było opracowanie metody molekularnej opartej o reakcję amplifikacji DNA do niezależnego wykrywania badanych patogenów: wirusów (HpLV i ArMV) oraz wiroidów (CBCVd, HpSVd, AFCVd).

Cel tematu badawczego 2 został osiągnięty.

Materialy i metody

Zgromadzone w IUNG-PIB kontrole pozytywne badanych patogenów posłużyły do opracowania metody wykrywania poszczególnych patogenów.

Odwrotna transkrypcja

W celu uzyskania cDNA, RNA wirusów i wiroidów poddano reakcji odwrotnej transkrypcji. Reakcję prowadzono w następujący sposób. Do 9 μ l wody sterylnej pozbawionej RN-az dodawano 1 μ l oligo d(T)₁₅ (50 μ M) – ArMV i HpLV lub 1 μ l specyficznego startera w odwróconej orientacji (2 μ M) – HSVd, CBCVd, AFCVd (Tab.1), 2 μ l RNA (1 μ g/ μ l) oraz 1 μ l mieszaniny dNTP 10 mM (Invitrogen, USA). Całość mieszaniny inkubowano w temperaturze 65°C przez 5 minut, a następnie szybko schładzano na lodzie przez 1 minutę. Do schłodzonej mieszaniny dodawano 4 μ l buforu 5x First-Strand (Invitrogen), 1 μ l 0,1M DTT (Invitrogen), 1 μ l RNasin (40 u/ μ l) – inhibitora RN-az (ThermoFisher Scientific) oraz 1 μ l odwrotnej transkryptazy M-MLV Superscript III (200 u/ μ l) (Invitrogen). Końcowa objętość mieszaniny reakcyjnej wynosiła 20 μ l. Reakcję odwrotnej transkrypcji prowadzono w temperaturze 50°C przez 60 min, po czym ogrzewano do 70°C przez 15 minut, w celu zatrzymania reakcji i denaturacji odwrotnej transkryptazy.

Tab. 1 Startery reakcji PCR użyte do wykrywania wirusów i wiroidów chmielu:

Patogen	Starter	Sekwencja (5'-3')	Produkt (nt)	Literatura
ArMV	ArMV-F	ACCAGTGCCTACAAGAGTGTGTCC	213	Komínek i in. 2003
	ArMV-R	TTGATTCCAGTTGTTAGTGACCCC		
HpLV	HpLV 5'Mlu	CGCACGCGTGGATAAACAACATACAA	1116	Ziegler i in. 2014
	HpLV 3'-1100	GCTTAGCAATTGCGGATTGCAC		
HSVd	HpSVd3-160	GACGATCGATGGTGTTCGAAG	297	Ziegler i in. 2014
	HpSVd5-160	ATCGATCGTCCCTTCTTCTTTAC		
AFCVd	AF-F	TTGTTCGACGAAGGGTCCTCA	382	Sano i in. 2004
	AF-R	TTGTTCGACGACGAGTCACCA		
CBCVd	CVd-IV-F1	GGGGAAATCTCTTCAGAC	284	Bernad i Duran-Vila, 2006
	CVd-IV-R1	GGGGATCCCTCTTCAGGT		

Amplifikacja DNA

Amplifikację DNA prowadzono przy użyciu 2 μ l cDNA uzyskanego w odwrotnej transkrypcji, 25 μ l Platinum Green Hot Start PCR 2x Master Mix (Invitrogen), po 0,2 μ M specyficznych starterów reakcji PCR (Tab. 1). Mieszaninę reakcyjną uzupełniano wodą wolną od nukleaz do objętości końcowej 50 μ l.

W zależności od wykrywanego patogena stosowano różne programy temperaturowe dla PCR, w których optymalizowano warunki amplifikacji DNA poprzez dobór odpowiedniej temperatury przyłączenia starterów.

Amplikony uzyskane w reakcji PCR analizowano na 2% żelu agarozowym wybarwionym bromkiem etydy i wizualizowano w świetle UV.

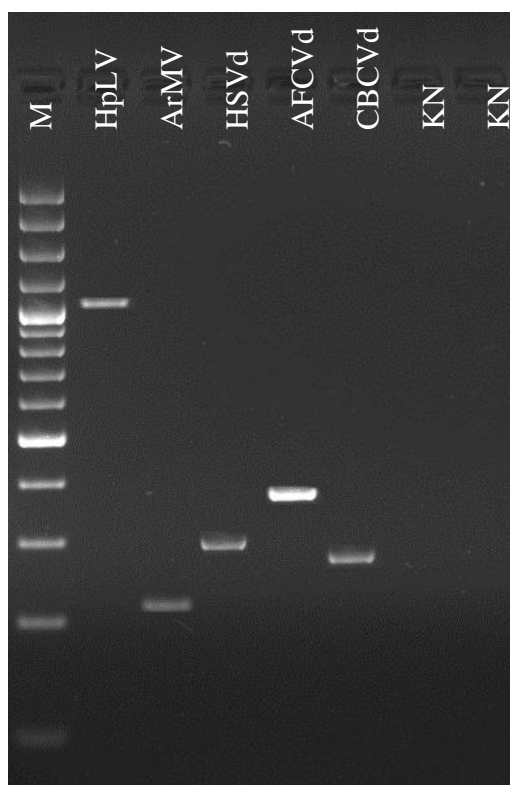
Wyniki

W wyniku prowadzonych badań zoptymalizowano dla każdego z patogenów profile temperaturowe PCR (Tab. 2.). W efekcie uzyskano amplikony wszystkich badanych patogenów. Na fot. 4 przedstawiono zdjęcie żelu agarozowego z jednocześnie widocznymi amplikonami wszystkich oznaczanych wirusów i wiroidów.

Wynikiem końcowym przeprowadzonych badań są opracowane gotowe do użycia, kompletne protokoły detekcji patogenów chmielu.

Tab. 2. Programy temperaturowe stosowane do amplifikacji DNA w zależności od badanego patogena.

Patogen	Program temperaturowy			
ArMV	35 cykli	Denaturacja wstępna	94°C	2 min.
		Denaturacja	94°C	30 sek.
		Przyłączanie starterów	60°C	30 sek.
		Elongacja	72°C	30 sek.
		Końcowe wydłużanie	72°C	5 min.
HpLV	35 cykli	Denaturacja wstępna	94°C	2 min.
		Denaturacja	94°C	30 sek.
		Przyłączanie starterów	56°C	30 sek.
		Elongacja	72°C	90 sek.
		Końcowe wydłużanie	72°C	5 min.
HSVd	35 cykli	Denaturacja wstępna	94°C	2 min.
		Denaturacja	94°C	30 sek.
		Przyłączanie starterów	54°C	30 sek.
		Elongacja	72°C	30 sek.
		Końcowe wydłużanie	72°C	5 min.
AFCVd	30 cykli	Denaturacja wstępna	94°C	2 min.
		Denaturacja	94°C	30 sek.
		Przyłączanie starterów	55°C	30 sek.
		Elongacja	72°C	30 sek.
		Końcowe wydłużanie	72°C	5 min.
CBCVd	35 cykli	Denaturacja wstępna	94°C	2 min.
		Denaturacja	94°C	30 sek.
		Przyłączanie starterów	60°C	30 sek.
		Elongacja	72°C	30 sek.
		Końcowe wydłużanie	72°C	5 min.



Fot. 4. Wizualizacja produktów RT-PCR. M – marker długości DNA, HpLV – 1116 nt, ArMV – 213 nt, HSVd – 297 nt, AFCVd – 382 nt, CBCVd – 284 nt, KN – kontrola negatywna.

Dyskusja

W celu detekcji HpLV zdecydowano się na użycie starterów HpLV 5'Mlu i HpLV 3'-1100, które amplifikują 5'-koniec genomu wirusa. Projektowanie tych starterów oparto o gen kodujący metylotransferazę, który jest silnie konserwowany ewolucyjnie (Schuman, 2002). Do wykrywania HpLV stosowane są również zdegenerowane startery reakcji, jednakże poza HpLV wykrywają one także wirusa M ziemniaka (PVM) oraz wirusa oparzeliny borówki wysokiej (BIscV) (Hataya, 2000).

W celu wykrycia ArMV amplifikowano wysoce konserwatywny region kodujący białko płaszczka (CP) przy użyciu starterów ArMV-F i ArMV-R. Do detekcji ArMV, mogą być stosowane również inne fragmenty genu kodującego białko płaszczka (Ipach i in., 1992, Grieco i in., 2000). Sun i in., do detekcji ArMV zaproponowali wykorzystanie multiplex Real-Time PCR z zastosowaniem sond typu TaqMan zlokalizowanych w rejonie genu MP – movement protein.

W ramach realizacji zadania do detekcji wszystkich wiroidów: HSVd, CBCVd, AFCVd wykorzystano startery, które amplifikowały pełne genomy patogenów (Ziegler i in., 2014, Bernad i Duran-Vila, 2006, Sano i in., 2004). W efekcie uzyskano amplikony o długościach odpowiednio: 297 nt, 284 nt i 382 nt. Również Matoušek i in. (2003) oraz Luigi i Faggioli (2013) w celu wykrycia infekcji winorośli przez wiroidy amplifikowali pełną długość genomu wiroidów. Sun i in. (2014) w swojej pracy przedstawiają alternatywne podejście z wykorzystaniem RT-qPCR i sond molekularnych TaqMan. Możliwe jest również wykrywanie HSVd bezpośrednio po izolacji RNA z liści bez etapu RT-PCR poprzez poddanie surowego ekstraktu elektroforezie na żelu poliakrylamidowym z wybarwianiem za pomocą srebra (Sano i in., 2004).

Wnioski

- Zastosowanie zoptymalizowanych protokołów zamieszczonych w sprawozdaniu umożliwia detekcję wszystkich badanych patogenów

Mierniki dla tematu badawczego 2:

Lp.	miernik ³	wartość miernika podana w opisie zadania	wartość miernika zrealizowana
2.1	Opracowanie metody wykrywania poszczególnych badanych wirusów i wiroidów	5 protokołów	5 protokołów

3.3 Temat badawczy 3

Cel tematu badawczego 3

Celem tematu badawczego była ocena występowania wirusów (HpLV i ArMV) oraz wiroidów (CBCVd, HpSVd, AFCVd) na plantacjach chmielu w Polsce.

Cel tematu badawczego 3 został osiągnięty.

Materialy i metody

Próbki polowe zgromadzone w temacie badawczym nr 1 do momentu analiz molekularnych przechowywano w -86°C , a następnie schładzano w ciekłym azocie i rozdrabniano w homogenizatorze Tissue Lyser (Qiagen, Niemcy) przy częstotliwości wytrząsania 30 Hz przez 3 minuty. Zhomogenizowany materiał poddawano izolacji całkowitego RNA z wykorzystaniem zestawów do izolacji RNA – RNeasy PowerPlant Kit (Qiagen), zgodnie z procedurą zalecaną przez producenta. Ponieważ liście chmielu zawierają znaczne ilości związków fenolowych, dlatego zredukowano objętość buforu lizującego MBL/ β -ME z 600 μl do 550 μl i dodano 50 μl Phenolic Separation Solution aby zapobiec tworzeniu się kompleksów kwasów nukleinowych z utlenionymi związkami fenolowymi, co powodowałyby zmniejszenie ilości izolowanego RNA.

Wyizolowane RNA doczyszczano z pozostałości DNA za pomocą zestawu DNase Max (Qiagen), zgodnie z procedurą zalecaną przez producenta. Następnie oczyszczone RNA było używane do uzyskania cDNA w reakcji odwrotnej transkrypcji zgodnie z procedurą opracowaną w temacie badawczym nr 2. Uzyskane cDNA było wykorzystywane do amplifikacji DNA, w celu wykrycia badanych patogenów w polowych próbkach chmielu. Warunki prowadzenia reakcji PCR były zgodne z opracowanymi w temacie badawczym nr 2.

Wyniki

Na podstawie przeprowadzonych badań stwierdzono występowanie na terenie Polski przypadków porażenia roślin chmielu przez utajony wirus chmielu (*Hop latent virus*, HpLV) oraz wiroid karłowatości chmielu (*Hop stunt viroid*, HSVd). Występowanie wirusa HpLV stwierdzono we wszystkich rejonach uprawy chmielu w Polsce (Tab. 3). Na terenie lubelskiego i wielkopolskiego rejonu uprawy chmielu występowanie HpLV stwierdzono na plantacjach produkcyjnych gdzie uprawiana była odmiana Marynka, a w rejonie dolnośląskim na 2 plantacjach, na których były uprawiane odmiany Hallertau Tradition i Magnum. HpLV wykryto w próbkach gromadzonych w drugim i trzecim terminie.

³ Podać miernik – np. ilość testów, prób, badanych genotypów etc.

Występowanie HSVd wykryto tylko w wielkopolskim rejonie uprawy chmielu na jednej plantacji produkcyjnej na odmianie Magnum. Podobnie jak w przypadku HpLV, HSVd wykryto w próbkach gromadzonych w drugim i trzecim terminie. Ogółem HpLV wykryto w 6 próbkach pochodzących z 4 plantacji produkcyjnych, natomiast HSVd w 2 próbkach pochodzących z jednej plantacji produkcyjnej.

Tab. 3. Występowanie wirusów i wiroidów w chmielu w Polsce.

Rejon uprawy	Patogen					
	HpLV			HSVd		
	Odmiana	WNP*	l. próbek	Odmiana	WNP*	l. próbek
Lubelski	Marynka	1	2		0	0
Wielkopolski	Marynka	1	2	Magnum	1	2
Dolnośląski	Hallertau Tradition	1	1		0	0
	Magnum	1	1			
Kol. IUNG-PIB		0	0		0	0
	Razem	4	6		1	2

* WNP – liczba plantacji na jakiej stwierdzono występowania patogena,

W żadnej z badanych próbek nie stwierdzono obecności wirusa mozaiki gęsiówki (*Arabid mosaic virus*, ArMV), wiroida wyboistości jabłek (*Apple fruit crinkle viroid*, AFCVd) oraz wiroida pęknięcia kory cytrusowych (*Citrus bark cracking viroid*, CBCVd).

Dyskusja

Monitoring występowania chorób wirusowych u roślin jest bardzo istotnym działaniem mającym wspierać wczesne wykrywanie zagrożeń i zapobieganie późniejszemu rozprzestrzenianiu się chorób. Należy podkreślić, że uzyskane wyniki wskazują, że największym zagrożeniem upraw chmielu w Polsce są HpLV i HSVd. Pomimo nie stwierdzenia obecności CBCVd, AFCVd i ArMV nie można wykluczyć, że ten problem nie istnieje szczególnie, że zakażenia tymi patogenami są znane w Europie (Pethybridge, 2008, Radisek, 2012).

Hop latent virus (HpLV) należy do rodzaju *Carlavirus*. Wirus ten pierwszy raz w historii został opisany już w latach sześćdziesiątych XX wieku (Schmidt, 1966). Obecnie znane są przypadki jego występowania we Francji (Eppler, 1989), Nowej Zelandii (Hay i in., 1992), Australii (Pethybridge, 2000), Chinach (You i Liu, 1987), Południowej Afryce (Von Weschmar i in., 1989) i Japonii (Kanno i in., 1993). Zakażenie chmielu tym wirusem jest niebezpieczne ponieważ nie wywołuje żadnych widocznych objawów przez co może rozprzestrzeniać się na plantacji w sposób niekontrolowany. (Ziegler, i in. 2014). Jedynie na odmianie Hersbrucker Spät stwierdzono sporadycznie występujące plamki na liściach (Eppler, 1989). Wirus przenoszony jest przez mszyce w sposób nierwały. Głównym wektorem jest mszyca śliwowo-chmielowa (*Phorodon humuli*) (Adams i Barbara, 1982). Inne wektory, to mszyca brzoskwiniowo-ziemniaczana (*Myzus persicae*) i mszyca ziemniaczana (*Macrosiphum euphorbiae*) (Crowle i in., 2006). HpLV nie ma innych poza chmiel naturalnych gospodarzy.

Hop stunt viroid (HSVd) należy do rodzaju *Hostuviroid*. HSVd po raz pierwszy został odkryty w Japonii już w latach siedemdziesiątych XX wieku, kolejne doniesienia mówiły o jego występowaniu w Korei Południowej i USA (Yamamoto i in., 1973, Sano, 1989, Lee i in., 1990, Pethybridge, 2008). W roku 2012 po raz pierwszy stwierdzono jego występowanie w Europie (Radisek i in., 2012). HSVd powoduje zahamowanie wzrostu porażonych roślin, co w efekcie prowadzi do spadku plonów i obniżenia zawartości alfa-kwasów (Sano, 2003). Typowym objawem zakażenia jest zwijanie i żółknięcie liści oraz wytwarzanie małych szyszek. Zahamowanie wzrostu roślin obserwuje się po 3-5 lat od zakażenia (Eastwell i Nelson, 2007). Podobnie jak inne wiroidy przenoszony jest w sposób mechaniczny. Posiada wielu gospodarzy: śliwy, brzoskwinie, cytrusy i winorośl (Sano i in., 1989, Diener i in., 1988, Matoušek i in., 2003), które mogą być rezerwuarem patogena. Ponieważ nieznanne są genetyczne źródła odporności na HpLV i HSVd, dlatego tak ważne jest utrzymywanie wysokiej zdrowotności plantacji poprzez stosowanie wysokiej jakości

materiału sadzonkowego i przestrzeganie zaleceń fitosanitarnych, co będzie zabezpieczało plantacje przed zakażeniem, a potem rozprzestrzenianiem się infekcji.

Wnioski

- Na plantacjach chmielu w Polsce w roku 2018 nie stwierdzono występowania ArMV, AFCVd i CBCVd
- Występowanie HpLV na plantacjach produkcyjnych stwierdzono we wszystkich rejonach uprawy chmielu w Polsce
- HSVd wykryto na jednej plantacji produkcyjnej w rejonie wielkopolskim
- Z uwagi na pojawiające się w ostatnich latach doniesienia dotyczące pojawiania się nowych nieobecnych dotąd w Europie patogenów jak HSVd, czy CBCVd należy prowadzić stały monitoring zdrowotności roślin chmielu na plantacjach produkcyjnych.
- W przypadku stwierdzenia obecności zakażonych roślin na plantacji należy rośliny zainfekowane i te z najbliższego sąsiedztwa usuwać z plantacji
- Do zakładania nowych plantacji lub wymiany nasadzeń na istniejących plantacjach należy stosować odwirusowany materiał sadzonkowy wysokiej jakości

Mierniki dla tematu badawczego 3:

Lp.	miernik ⁴	wartość miernika podana w opisie zadania	wartość miernika zrealizowana
3.1	Liczba przeprowadzonych testów wykrywania badanych patogenów	4500 testów	4525 testów

3.4 Literatura

- Adams, A.N., Barbara D.J. 1982. Host range, purification and some properties of two carlaviruses from hop (*Humulus lupulus*): hop latent and American hop latent. *Annual Applied Biology*, 101(3):483-494.
- Bernad, L., Duran-Vila, N. 2006. A novel RT-PCR approach for detection and characterization of citrus viroids. *Molecular Cellular Probes*, 20(2):105-113
- Crowle, D.R., Pethybridge S.J., Wilson, C.R. 2006. Transmission of hop latent and hop mosaic carlaviruses by *Macrosiphum euphorbiae* and *Myzus persicae*. *Journal of Phytopathology*, 154:745-747.
- Diener, T.O., Smith, D.R., Hammond, R.H., Albanese, G., Larosa, R., Davino, M. 1988: Citrus-B viroid identified as a strain of hop stunt viroid. *Plant Disease* 72:691-693.
- Eastwell, K.C., Nelson, M.E. 2007. Occurrence of viroids in commercial hop (*Humulus lupulus* L.) production areas of Washington State. Online. *Plant Health Progress*, DOI: 10.109/PHP2007-1127-01-RS.
- Eppler, A. 1989. Presence of viruses in the hop growing region of Alsace (France). Page 209 in: *Proc. Int. Workshop Hop Virus Dis. Giessen*.
- Grieco, F., Alkowni, R., Saponari, M., Savino, V, Martelli, G.P. 2000. Molecular detection of olive viruses. *Eppo Bulletin*, 30:469-473.
- Hataya, T., Uchino, K., Arimoto, R., Suda, N., Sano, T., Shikata, E., Uyeda, I. 2000. Molecular characterization of Hop latent virus and phylogenetic relationships among viruses closely related to carlaviruses. *Archives Virology*, 145(12):2503-2524.
- Hay, F. S., Close, R. C., Fletcher, J. D., Ashby, J. W. 1992. Incidence and spread of viruses in hop (*Humulus lupulus* L.) in New Zealand. *N.Z. J. Crop Hortic. Sci.* 20:319-327.
- Ipach, U., Altmayer, B., Eichhorn, K.W. 1992. Detection of arabib mosaic virus using the polymerase chain reaction (PCR).

⁴ Podać miernik – np. ilość testów, prób, badanych genotypów etc.

- Kanno, Y., Yoshikawa, N., Takahashi, T. 1993. Some properties of hop latent and apple mosaic viruses isolated from hop plants and their distributions in Japan. *Ann. Phytopathol. Soc. Jpn.* 59:651-658.
- Komínek, P., Svoboda, P., Abou Ghanem-Sabanadzovic, N. 2003. Improved detection of Arabis mosaic virus in grapevine and hop plants. *Acta Virologica*, 47:199-200.
- Matoušek, J., Orctová, L., Patzak, J., Svoboda, P., Ludvíková, I. 2003. Molecular sampling of hop stunt viroid (HSVd) from grapevines in hop production areas in the Czech Republic and hop protection. *Plant Soil Environmental* 49:168-75.
- Lee, J. Y., Lee, S. H., Sānger, H. L. 1990. Viroid diseases occurring on Korean hop plants. *Korean Journal of Plant Pathology*, 6:256-260.
- Luigi, M., Faggioli, F. 2013. Development of a quantitative real-time RT-PCR (qRT-PCR) for the detection of hop stunt viroid. *European Journal of Plant Pathology*, 137:231-235.
- Matoušek, J., Orctová, L., Patzak, J., Svoboda, P., Ludvíková, I. 2003. Molecular sampling of hop stunt viroid (HSVd) from grapevines in hop production areas in the Czech Republic and hop protection. *Plant, Soil and Environment*, 49(4):168-175.
- Pethybridge, S.J., Hay, F.S., Barbara, D.J., Eastwell, K.C., Wilson, C.R. 2008. Viruses and Viroids Infecting Hop: Significance, Epidemiology, and Management, *Plant Disease*, 92(3):324-338.
- Pethybridge, S. J., Wilson, C. R., Sherriff, L. J., Leggett, G. W., Munro, D. 2000. Virus incidence in Australian hop (*Humulus lupulus* L.) gardens and cultivar differences in susceptibility to infection. *Aust. J. Agric. Res.* 51:685-689.
- Probasco, E. G., Skotland, C. B. 1978. Host range, general properties, purification and electron microscopy of hop latent virus. *Phytopathology* 68:277-281.
- Radisek, S., Majer, A., Jakse, J., Javornik, B., Matoušek, J. 2012. First Report of Hop stunt viroid Infecting Hop in Slovenia, *Disease Notes*, 96(4):592.
- Sano, T., Yoshida, H., Goshono, M., Monma, T., Kawasaki, H., Ishizaki, K. 2004. Characterization of a new viroid strain from hops: evidence for viroid speciation by isolation in different host species. *Journal of General Plant Pathology* 70(3):181-187.
- Sano, T., 2003. Hop stunt viroid. W: Hadidi, A, Flores, R., Randles, J.W., Semancik, J.S. (eds.): *Viroids*. Collingwood, Australia, CSIRO Press, pp 207-212.
- Sano, T., Hataya, T., Terai, Y., Shikata, E. 1989. Hop stunt viroid strains from dapple fruit disease of plum and peach in Japan. *Journal of General Virology*, 70:1311-1319.
- Schmidt, H.E. 1966. Mechanical transmission of a rod-shaped Hop virus to herbaceous test plants. *Zentralblatt für Bakteriologie, Parasitenkunde, Infektionskrankheiten und Hygiene* 120, 461-466.
- Shuman, S. 2002. What messenger RNA capping tells us about eukaryotic evolution. *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* 3:619-625.
- Sun, N., Deng, C., Zhao, X., Zhou, Q., Ge, G., Liu, Y., Yan, W., Xia, Q. 2014. Extraction of total nucleic acid based on silica-coated magnetic particles for RT-qPCR detection of plant RNA virus/viroid. *Journal of Virological Methods*, 196:204-211.
- Tsai, C.W., Daugherty, M.P., Almeida, R.P.P. 2012. Seasonal dynamics and virus translocation of grapevine leafroll-associated virus 3 in grapevine cultivars. *Plant Pathology* 61:977-985.
- Von Weschmar, W. B., Brits, G., Cole-man, T. 1989. Viruses in hops and aspects of virus epidemiology and hop production in South Africa at 34° southern latitude. *Strony: 33-42 w: Proc. Int. Workshop Hop Virus Dis. Giessen.*
- Wetzel, T., Jardak, R., Meuniera, L., Ghorbel, A., Reustle, G.M., Krczal, G. 2002. Simultaneous RT/PCR detection and differentiation of arabis mosaic and grapevine fanleaf nepoviruses in grapevines with a single pair of primers. *Journal of Virological Methods*, 101(1-2):63-69.
- Yamamoto, H., Kagami, Y., Kurokawa, M., Nishimura, S., Ukawa, S., Kubo, S. 1973. Studies on hop stunt disease in Japan. *Rep. Res. Lab. Kirin Brewery Co., Ltd.* 16:49-62.
- Yu, J., Liu, Y. 1987. The occurrence of three viruses in hop (*Humulus lupulus* L.) in China. *Plant Pathol.* 36:38-44.

Ziegler, A., Kawka, M., Przybys, M., Doroszewska, T., Skomra, U., Kastirr, U., Matoušek, J., Schubert, J. 2014. Detection and molecular analysis of Hop latent virus and Hop latent viroid in hop samples from Poland, Journal fur Kulturpflanzen, 66 (7). S. 248–254.

4. Planowana prezentacja wyników badań

Prezentacja wyników na konferencjach				
lp.	konferencja	prezentacja ⁵	Liczba prezentacji podana w opisie zadania	Liczba prezentacji zrealizowana
1	VI Konferencja Nowe Patogeny i Choroby Roślin, 04.2018 r. Instytut Ogrodnictwa w Skierniewicach	poster	1	0
2	Konferencja naukowa Innowacje w chmielarstwie, 03.2018 r. IUNG-PIB w Puławach	doniesienie konferencyjne	1	1

Planowana prezentacja posteru nie doszła do skutku ponieważ VI Konferencja Nowe Patogeny i Choroby Roślin nie odbyła się.

Załączniki⁶:

1. Prezentacja wygłoszona w dn. 9 marca 2018r. na konferencji naukowej Innowacyjne rozwiązania wspierające produkcję chmielu zgodnie z zasadami integrowanej ochrony roślin. Puławy IUNG-PIB.

5. Adres, pod którym wyniki badań są dostępne na stronie internetowej wnioskodawcy:

<http://chmiel.iung.pulawy.pl/wyniki.html>

6. Miernik zadania - stopień realizacji

Lp.	miernik	Wartość miernika podana w opisie zadania	Wartość miernika zrealizowana	Stopień realizacji miernika
1	2	3	4	5
temat badawczy 1				
1.1	Liczba próbek pobranych z plantacji produkcyjnych i kolekcji odmian	900	905	101%
temat badawczy 2				
2.1	Opracowanie metody wykrywania poszczególnych badanych wirusów i wiroidów	5 protokołów	5 protokołów	100%
temat badawczy 3				
3.1	Liczba przeprowadzonych testów wykrywania badanych patogenów	4500 testów	4525 testów	101%
			Średnia	101%
			% realizacji zadania	101%

⁵ Podać, czy chodzi o wykład plenarny, doniesienie konferencyjne czy poster.

⁶ Podać listę oraz dołączyć do sprawozdania kopie posterów/wyciągi z materiałów konferencyjnych/publikacje etc. W nawiasie podać, na której stronie sprawozdania znajdują się prezentowane wyniki.

Sporządzono:

Pieczęć jednostki

Osoba reprezentująca jednostkę

Kierownik zadania

7.12.2018 r.

data

prof. dr hab. Wiesław Aleksander Oleszek

podpis i pieczęć

dr Marcin Przybyś

podpis