

WYSTĘPOWANIE WIRUSA CZARNEJ PIERŚCIENIOWEJ PLAMISTOŚCI POMIDORA (*TOMATO BLACK RING VIRUS*) W POLSCE

NATASZA BORODYNKO, BEATA HASIÓW-JAROSZEWSKA,
NATALIA RYMELSKA, HENRYK POSPIESZNY

Instytut Ochrony Roślin – Państwowy Instytut Badawczy
Władysława Węgorka 20, 60-318 Poznań
N.Borodynko@iorpib.poznan.pl

I. WSTĘP

Wirus czarnej pierścieniowej plamistości pomidora (*Tomato black ring virus*, TBRV) jest jednym z przedstawicieli rodzaju *Nepovirus*, który wraz z rodzajami *Comovirus* i *Fabavirus* należy do rodziny Secoviridae, podrodziny Comoviridae. Wirusy z tej rodziny charakteryzuje podobna organizacja genomu, taki sam kształt cząsteczek oraz wspólne wektory, jakimi są nicienie (Harrison i Murrant 1977; Brunt i wsp. 1996; Wellink i wsp. 2000). Genom nepowirusów złożony jest z dwóch jednoniciowych cząsteczek RNA o polaryzacji dodatniej (RNA1 i RNA2). Genomowe RNA nepowirusów są „upakowane” do osobnych kapsydów, przy czym towarzyszące nepowirusom dodatkowe cząsteczki RNA satelitarnego są przeważnie upakowane razem z RNA2 (Fritsch i wsp. 1993; Brunt i wsp. 1996).

Wiriony nepowirusów są sferyczne i mają około 28 nm średnicy. Podczas wirowania w gradiencie gęstości sacharozy, nepowirusy sedimentują w postaci trzech stref opalizujących w świetle przechodzącym: górna – o najniższej masie cząsteczkowej zawiera głównie puste kapsydy; średnia – zawiera cząsteczki RNA2; najniższa – obejmuje wiriony zawierające RNA1 lub dwie cząsteczki RNA2.

Nepowirusy przenoszone są za pośrednictwem nicieni należących do rodzaju *Xiphinema* i *Longidorus* (Harrison i Murrant 1977; Brown i wsp. 1996; Brunt i wsp. 1996). Poszczególne gatunki nicieni przenoszą konkretny gatunek lub serotyp wirusa. Mechanizm odpowiedzialny za przenoszenie wirusa jest bardzo specyficzny i opiera się prawdopodobnie na interakcji pomiędzy receptorem nicienia a białkiem płaszcza wirusa (Brown i wsp. 1996). Wirus może przebywać w nicieniu aż do kolejnej wylinki, jednak nie ma możliwości replikować w organizmie wektora.

TBRV może być przenoszony także za pośrednictwem nasion, w trakcie szczepienia drzewek oraz poprzez mechaniczną inokulację (Brunt i wsp. 1996).

W warunkach naturalnych wirusy z rodzaju *Nepovirus* porażają przede wszystkim drzewa i krzewy owocowe oraz małe byliny, jak np. truskawka. Częstymi gospodarzami dla tego rodzaju są także rośliny z rodziny Solanaceae (Brunt i wsp. 1996).

Wirus poraża szeroki zakres roślin gospodarzy, początkowo powodując wyraźne objawy chorobowe, które później zanikają w wyniku pozornego ozdrowienia, co jest charakterystyczne dla nepowirusów; jest to tzw. pozorne ozdrowienie. Jednak wzrost i wydajność plonu takich pozornie ozdrowiałych roślin są zawsze obniżone w porównaniu z roślinami zdrowymi (Wingard 1928; Giersch 1986).

TBRV po raz pierwszy został opisany w Anglii na uprawie pomidora (Smith 1946). Na roślinie tej, w Wielkiej Brytanii, wirus występował sporadycznie, a później jego pojedyncze izolaty stwierdzono między innymi także w Indiach (Sastry 1966) i w Polsce (Twardowicz-Jakusz 1969; Pospieszny i Borodynko 1999). Zdecydowanie częściej wykrywano obecność TBRV na innych gatunkach roślin. Z roślin warzywnych stwierdzono go na: selerze (Hollings 1965), fasoli (Follmann i Bercks 1959), pomidorze (Twardowicz-Jakusz 1969), cebuli i porze (Calvert i Harrisom 1963), sałacie (Smith i Short 1959) i ogórku (Gehring i Bercks 1958; Pospieszny i Borodynko 1999; Pospieszny i wsp. 2003), ziemniaku (Köhler 1950, 1952; Chrzanowska i Śniegowski 1965; Kaiser i wsp. 1978), marchwi (Twardowicz-Jakusz i wsp. 1976) oraz chrzanie (Shukla i Schmelzer 1972; Twardowicz-Jakusz i wsp. 1977); z ozdobnych na: narcyzie (Broadbent i wsp. 1962) i floksie (Ryden 1965; Kamińska i Waś 1978). Poza tym TBRV znaleziono na: koniczynie (Gibbs i wsp. 1966), truskawce (Lister 1960a, b), winorośli (Bercks i Stellmach 1966), brzoskwini i migdale (Mischke i Bercks 1963/64 i 1965) oraz forsycji (Kamińska 1983; Kamińska i Sobilo 1983), robinii akacjowej (Schmelzer 1962/63; Schelzmer i Milinko 1963; Pospieszny i Borodynko 1999) i ligustrze pospolitym (Błaszczak i Pospieszny 1987).

Do roku 1999 izolaty TBRV należały do dwóch serotypów (TBRV-ED i TBRV-S). W roku 2000 serotyp TBRV-S został podniesiony do rangi nowego gatunku i nazwany wirusem pierścieniowej plamistości buraka (*Beet ringspot virus*, BRSV) (Wellink i wsp. 2000).

Celem pracy była identyfikacja i wstępna charakterystyka wirusa czarnej pierścieniowej plamistości pomidora występującego w Polsce.

II. MATERIAŁ I METODY

W Zakładzie Wirusologii i Bakteriologii Instytutu Ochrony Roślin – Państwowego Instytutu Badawczego (IOR – PIB) w Poznaniu, w ostatnich kilkunastu latach pozyskano szereg zróżnicowanych pomiędzy sobą izolatów wirusa TBRV (ED i S), pochodzących zarówno z roślin uprawnych, jak i dziko rosnących. Wszystkie izolaty testowano na zestawie roślin wskaźnikowych w celu ustalenia różnic pomiędzy poszczególnymi izolatami w teście biologicznym. Izolaty do dalszych badań utrzymywane były na kosmosie ryżowej i oczyszczane. Młode części roślin homogenizowano w buforze cytrynianowym, przesączano i dodawano 0,5 objętości chloroformu. Uzyskany homogenat klarowano, zbierano supernatant i inkubowano dodając w kolejności: Triton X-100, NaCl i PEG6000. Następnie roztwór wirowano stosując naprzemiennie nisko i wysokoobrotowe wirowania oraz gradient gęstości sacharozy (10–40%). Ilość wirusa w oczyszczonym preparacie oznaczano na spektrofotometrze.

Mikroskopia elektronowa

Wszystkie testowane izolaty były przeglądane w mikroskopie elektronowym. Preparaty wykonywano zarówno z wirusów oczyszczonych, jak i z roślin testowych.

Test podwójnej dyfuzji w żelu agarowym

Techniką serologiczną pozwalającą na szybką identyfikację wirusa oraz stwierdzenie różnic serologicznych pomiędzy badanymi izolatami jest test podwójnej dyfuzji w żelu, polegający na dyfundowaniu przeciwciał i antygeny, a następnie zajściu reakcji serologicznej, w miejscu ich spotkania (Slogteren 1955).

W badaniach stosowano 0,9% żel agarowy przygotowany w buforze Tris-HCl.

Po identyfikacji wirusa w teście immunoenzymatycznym (ELISA), w celu porównania poszczególnych jego izolatów wykonywano test podwójnej dyfuzji w żelu agarowym, w którym do centralnie położonej studzienki наносzono surowicę zawierającą przeciwciała reagujące z danym gatunkiem wirusa (TBRV), a dookoła tej studzienki наносzono różne izolaty tego samego wirusa. Tak przygotowane płytki przechowywano przez noc w temperaturze pokojowej.

ELISA

Test ELISA wykonywano według procedury przedstawionej przez Clarka i Adamsa (1977). Próby roślin zebrane w terenie oraz rośliny wskaźnikowe testowano wykorzystując test DAS-ELISA z zastosowaniem zestawu własnych przeciwciał i konjugatu przeciwko TBRV.

DBIA (Dot blot immunoassay)

Równoległe z testem ELISA, przeprowadzano test serologiczny DBIA pozwalający na identyfikację TBRV. DBIA wykonywano zgodnie z metodyką przedstawioną przez Borodynko i wsp. (2003).

Izolacja RNA z preparatów oczyszczonych

Oczyszczone izolaty wirusowe trawiono proteinazą K. Po trawieniu dodawano po 500 µl mieszaniny fenol/chloroform/alkohol izoamylowy (w stosunku 24:24:1) i trzykrotnie ekstrahowano RNA, wytrząsając próbę przez 3 min i następnie wirowano. Fazę wodną zbierano i usuwano resztki fenolu poprzez dwukrotną ekstrakcję mieszaniną chloroform/alkohol izoamylowy, wytrząsając próby 1 min i wirując. RNA wytrącano przez 30 min w temp. -70°C w obecności 96% etanolu i octanu sodu i osadzano przez 20-minutowe wirowanie. Etanol usuwano, a osad suszono i rozpuszczano w około 30 µl sterylnej wody. 2 µl RNA rozpuszczano w 4 µl formazolu i rozdzielano na 1% żelu.

Izolacja kwasów nukleinowych z roślin

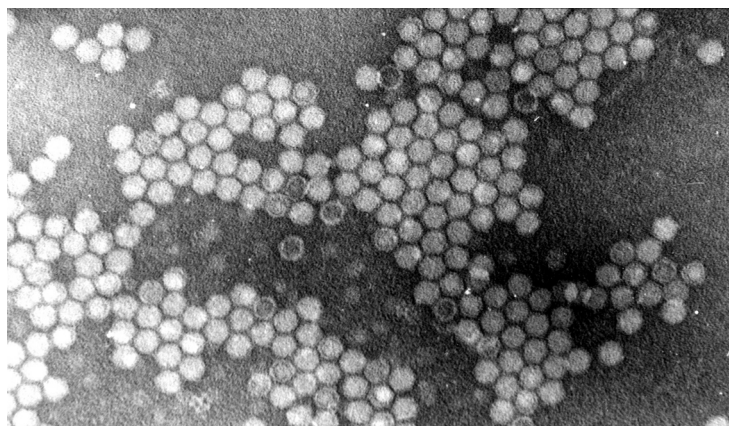
Całkowity RNA z roślin wykazujących objawy chorobowe izolowano metodą fenol/chloroform (Chomczyński i Sacchi 1987).

RT-PCR

Syntezę cDNA TBRV prowadzono z użyciem startera 3ter: 5' (T)20CTGCTTT TTGCAGAAAACATTTTATCATATACAA 3' oraz odwrotnej transkryptazy (Fermetas). Następnie uzyskane cDNA amplifikowano ze starterami: 3ter: i 1MP4: 5' TGCAAAAATATGACCCAGCA 3' (Jończyk 2004). Amplifikację prowadzono w 30 cyklach: 1 min w 94°C, 1 min w 50°C i 2 min w 72°C. Reakcję zakończono cyklem dziesięciominutowym w 72°C. Produkty reakcji rozdzielano w 1% żelu agarozowym, oczyszczano i ligowano do wektora TOPO TA Cloning® Kit (Invitrogen). Plazmidowy DNA sekwencjonowano w Zakładzie Wirusologii i Bakteriologii IOR – PIB z wykorzystaniem starterów M13 F i R.

III. WYNIKI I DYSKUSJA

W mikroskopie elektronowym, zarówno w preparatach wykonanych bezpośrednio z zainfekowanych roślin, jak i z oczyszczonych preparatów wirusowych, obserwowano liczne wirusowe cząsteczki sferyczne wielkości około 28 nm, charakterystyczne dla TBRV (rys. 1), a opisane wcześniej przez innych badaczy (Harrisom i Murant 1977; Brunt i wsp. 1996; Wellink i wsp. 2000).



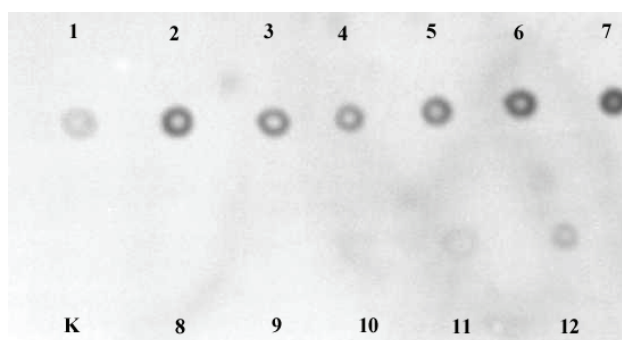
Rys. 1. Cząstki wirusa w mikroskopie elektronowym
Fig. 1. Virus particles in electron microscopy

W teście podwójnej dyfuzji w żelu agarowym wszystkie izolaty TBRV i BRSV reagowały pozytywnie z surowicą zawierającą przeciwciała skierowane przeciwko TBRV (surowica wyprodukowana wcześniej w Zakładzie Wirusologii i Bakteriologii), przy czym pomiędzy poszczególnymi izolatami obserwowano wyraźne, czasami bardzo duże ostrogi, świadczące o bardzo dużym zróżnicowaniu serologicznym pomiędzy izolatami TBRV i BRSV. Zidentyfikowanie i porównanie samych izolatów TBRV, pozwoliło stwierdzić, że część z nich na tym poziomie badań wydaje się być serologicznie iden-

tyczna; są jednak także takie izolaty, które różnią się od pozostałych, na co wskazują tworzące się nieduże ostrogi w miejscu przecięcia się łuków precypitacyjnych.

Stosując test ELISA identyfikowano nowe izolaty TBRV oraz potwierdzano obecność wirusa w roślinach testowych, na których nie stwierdzano objawów chorobowych. Stosując surowice własne wyodrębniono 15 izolatów BRSV oraz 7 TBRV, pochodzących z robinii akacjowej. Ponadto, zidentyfikowano izolaty TBRV pochodzące z roślin gospodarczo ważnych, takich jak: pomidor, ogórek, cukinia, dynia. W teście ELISA surowica skierowana przeciwko TBRV pozwalała na wykrycie izolatów TBRV i nie wykrywała izolatów BRSV.

Wyniki uzyskane w teście ELISA potwierdzone zostały w teście DBIA. Jednak ze względu na pokrewieństwo serologiczne pomiędzy TBRV i BRSV, surowica TBRV w słabym stopniu wykrywała również izolaty BRSV (rys. 2). Ponadto, wskazuje to na fakt, że DBIA jest testem bardziej czułym niż ELISA, a dzięki temu możliwe jest wykrywanie wirusa nawet w bardzo niskich koncentracjach w roślinach.



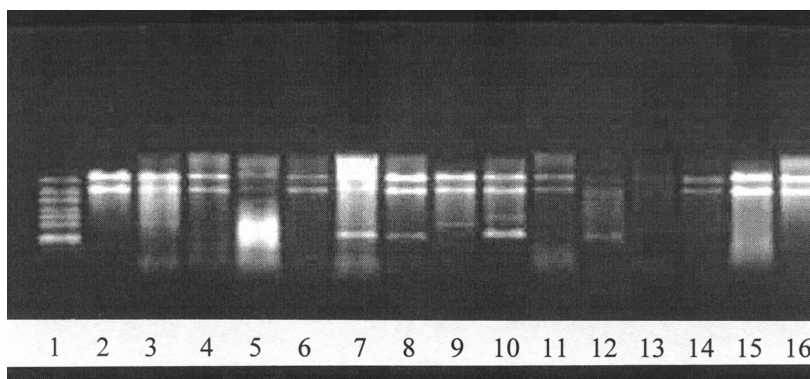
Rys. 2. Wynik wykrywanie TBRV testem DBIA

Fig. 2. Results of detection of TBRV by DBIA

K – kontrola negatywna – negative control, 1–7 – izolaty TBRV – isolates of TBRV, 8–12 – izolaty BRSV – isolates of BRSV

Po rozdziale RNA w żelu agarozowym, dla wszystkich izolatów TBRV obserwowano dwa prążki genomowego RNA, o wcześniej opisanych wielkościach około: RNA1 – 7500nt i RNA2 – 4500nt (Fritsch i wsp. 1993; Brunt i wsp. 1996).

W przypadku kilku izolatów TBRV oprócz genomowego RNA obserwowano również obecność dodatkowych krótkich cząstek RNA (rys. 3). Defektywne RNA (D-RNA) oraz defektywne interferujące (DI-RNA) są to cząsteczki RNA wywodzące się z genomu wirusa pomocniczego, zwykle wpływające na jego akumulację w roślinie oraz wywołujące symptomy chorobowe (Graves i wsp. 1996; Qiu i Scholthof 2001). Defektywne RNA powstają na skutek pojedynczej lub serii delecji w genomie wirusa macierzystego i zwykle zawierają regiony regulatorowe replikacji (często również translacji) oraz fragment kodujący część białka/białek wirusowych (Graves i wsp. 1996; Qiu i Scholthof 2001).



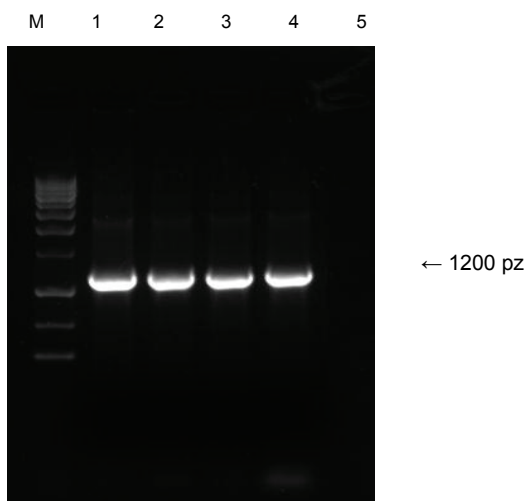
Rys. 3. Obraz elektroforetyczny RNA wirusa TBRV

Fig. 3. Electrophoresis RNA pattern of different isolates of TBRV

1 – Marker, 2 – TBRV-bez, 3 – TBRV-Db6, 4 – BRSV-DI4, 5 – BRSV-Kal, 6 – BRSV-KW6, 7 – TBRV-Ł10, 8 – TBRV-MJ12, 9 – TBRV-N1, 10 – TBRV-og, 11 – BRSV-Ostr1, 12 – TBRV-pom, 13 – BRSV-Wierzb8, 14 – BRSV-W29, 15 – BRSV-W40, 16 – TBRV-ziem

Powstały one w wyniku pasażowań danego izolatu w jednym gospodarzu (np. w komosie ryżowej). Wynik ten może sugerować różnice genetyczne pomiędzy badanymi izolatami TBRV.

W reakcji RT-PCR, dla wszystkich badanych izolatów TBRV uzyskano produkty o oczekiwanej wielkości, około 1200 pz (rys. 4). Sekwencjonowanie i wstępne analizy wykazały znaczne różnice na poziomie genetycznym, pomiędzy badanymi izolatami.



Rys. 4. Elektroforeza produktów RT-PCR

Fig. 4. Electrophoretic separation of RT-PCR products

M – marker HyperLadder IV (Bioline), 1–4 – izolaty TBRV – tested samples, 5 – kontrola negatywna – negative control

Identyfikacja co roku nowych izolatów TBRV zarówno z roślin użytkowych, jak i dziko rosnących uzasadnia celowość badań nad tym wirusem, również ze względu na fakt, iż jest to obiekt kwarantanny. Wyłączenie BRSV z gatunku TBRV wymaga również wprowadzenia stosownego uzupełnienia do spisu patogenów będących pod szczególną kontrolą i wymagających stałego monitoringu.

Dalszych badań wymagają również różnice stwierdzone pomiędzy izolatami TBRV pochodzącymi z roślin dziko rosnących, a tymi z roślin użytkowych, które pozwolą ocenić, czy izolaty z robinii akacjowej i bzu czarnego brały udział w tworzeniu populacji patogenów na roślinach użytkowych.

IV. WNIOSKI

1. W Polsce, od kilku lat, na roślinach dyniowatych obserwuje się coraz częstsze występowanie wirusa TBRV, będącego obiektem kwarantannowym.
2. Stosując test ELISA z zastosowaniem surowic własnych zidentyfikowano i rozróżniono izolaty dwóch spokrewnionych gatunków wirusów: TBRV i BRSV, pochodzących z różnych gospodarzy.
3. W niektórych polskich izolatach TBRV stwierdzono obecność defektywnych RNA, wyidukowanych podczas wielokrotnego pasażowania w jednym gospodarzu.
4. W reakcji RT-PCR, dla wszystkich badanych izolatów TBRV uzyskano produkty o oczekiwanej wielkości, około 1200 pz.
5. Sekwencjonowanie wykazało znaczne różnice na poziomie genetycznym, pomiędzy badanymi izolatami.

Praca naukowa finansowana ze środków na naukę w latach 2010–2013 jako projekt badawczy N 310 305339.

V. LITERATURA

- Bercks R., Stellmach G. 1966. Nachweis verschiedener Viren in reisigkrauken Reben. *Phytopath. Z.* 56: 288–296.
- Błaszczak W., Pospieszny H. 1987. Liguster (*Ligustrum vulgare* L.) naturalnym gospodarzem wirusa czarnej pierścieniowej plamistości pomidora (*Tomato black ring virus*). *Prace Nauk. Inst. Ochr. Roślin* 29 (1): 127–136.
- Borodynko N., Pospieszny H., Jończyk M. 2003. Wykorzystanie testu serologicznego Dot-blot immunoassay do wykrywania wirusów roślinnych. *Prog. Plant Protection/Post. Ochr. Roślin* 43 (2): 539–541.
- Broadbent L., Green D.E., Walkre P. 1962. Narcissus virus disease. *Daffodil Tulip Yb.* 28: 154–160.
- Brown D.J.F., Trudgill D.L., Robertson W.M. 1996. Nepoviruses: transmission by nematodes. p. 187–209. In: „The Plant Viruses, Volume 5: Polyhedral Virions and Bipartite RNA Genomes” (B.D. Harrison, A.F. Murant, eds.). Plenum Press, New York, 362 pp.
- Brunt A.A., Crabtree K., Dallwitz M.J., Gibbs A.J., Watson L. 1996. *Viruses of Plants*. CAB International Wallingford, UK, 1484 pp.

- Calvert E.L., Harrison B.D. 1963. Outbreaks of tomato black ring virus in onion and leek crops in Northern Ireland. *Host. Res.* 2: 115–120.
- Clark M.F., Adams A.N. 1977. Characteristics of the microplate method of enzyme-linked immunosorbent assay for the detection of plant viruses. *J. Gen. Virol.* 34: 475–483.
- Chomczyński P., Sacchi N. 1987. Single-step method of RNA isolation by acid guanidinium thiocyanate-phenol-chloroform extraction. *Anal. Biochem.* 162: 156–159.
- Chrzanowska M., Śniegowski C. 1965. Wirus pstrej plamistości lodygi, bukietowatości i mozaiki lucerny na ziemniakach oraz sposoby ich rozprzestrzeniania. *Biul. Inst. Hod. Aklim. Roślin* 5–6: 77–85.
- Follmann G., Bercks R. 1959. Verwandtschaftsbeziehungen Zwischen Ringflecken – viren von Kulturkirschen und Krautigen Pflanzen. *Naturwissenschaften* 46, p. 403.
- Fritch C., Mayo M., Hemmer O. 1993. RNA of nepoviruses. *Biochemie* 75: 561–567.
- Giersch T. 1986. Studies on the concentration and distribution of virus in TBRV infected tobacco plants (*N. tabacum* cv. Xanthi-nc). *Mededelingen van de Faculteit Landbouwwetenschappen Rijksuniversiteit Gent.* 51: 855–863.
- Gehring F., Bercks R. 1958. Untersuchungen an mehrjährigen Nachbau von Künstlich und natürlich mit Bukket-Virus infizieren Kartoffeln. *Phytopathologische Z.* 31: 289–299.
- Gibbs A.J., Varma A., Woods R.D. 1966. Viruses occurring in white clover (*Trifolium repens* L.) from permanent pastures in Britain. *Ann. Appl. Biol.* 58: 231–240.
- Graves M.V., Pogany J., Romero J. 1996. Defective interfering RNAs and defective viruses associated with multipartite RNA viruses of plants. *Seminars in Virology* 7: 399–408.
- Harrison B.D., Murant A.F. 1977. Nematode transmissibility of pseudo-recombinant isolates of tomato black ring viruses. *Ann. Appl. Biol.* 86: 209–212.
- Hollings M. 1965. Some properties of celery yellow vein a virus serologically related to tomato black ring virus. *Ann. Appl. Biol.* 55: 459–470.
- Jończyk M. 2004. Molekularna charakterystyka i diagnostyka polskich izolatów wirusa czarnej pierścieniowej plamistości pomidora (*Tomato black ring virus*). Rozprawa doktorska, Biblioteka Inst. Ochr. Roślin, Poznań, 133 ss.
- Kamińska M. 1983. Virus diseases of *Forsythia* sp. *Zesz. Probl. Post. Nauk Rol.* 291: 137–147.
- Kamińska M., Sobiło J. 1983. Choroby wirusowe forsycji (*Forsythia* sp). Część I. Występowanie wirusów na forsycji. *Rośliny Ozdobne* 1: 221–228.
- Kamińska M., Waś M. 1978. Niektóre właściwości kilku izolatów wirusa czarnej pierścieniowej plamistości pomidora. *Zesz. Probl. Post. Nauk Rol.* 214: 109–117.
- Kaiser W.J., Bock K.R., Guthrie E.J., Meredith G. 1978. Occurrence of *tomato black ring virus* in potato cultivar in Kenya. *Plant Dis. Rep.* 62: 1088–1092.
- Köhler E. 1950. Über das Vorkommen des Tabak-Ringflecken – virus bei Kartoffeln. *Nachrbl. Dtsch. Pfl. Schutzdienst, Braunsch.* 2: 146–147.
- Köhler E. 1952. Die Bukettkrankheit eine Viruskrantheit der Kartoffel. *Phytopathologische Z.* 19: 284–294.
- Lister R.M. 1960a. Occurrence of soil-borne virus diseases of strawberry in Britain. *Plant Pathol.* 9: 102–105.
- Lister R.M. 1960b. Strawberries and soil-borne virus disease. *Agriculture, London* 67: 25–29.
- Mischke W., Bercks R. 1963/64. Weitere Untersuchungen über den Erreger einer virösen Triebstauchung des Pfirsichs und seine Identifizierung als Stamm des Tomatenschwarzringflecken-Virus (*Tomato black ring virus*). *Phytopathologische Z.* 49 (2): 147–155.
- Mischke W., Bercks R. 1965. Kurze Mitteilung über ein Vorkommen des Tomatenschwarzringflecken-Virus (*Tomato black ring virus*) in Mandelbäumen (*Prunus amygdalus* Batsch). *Nachrbl. Dtsch. Pfl. Ch. Dienst. Study* 17: 186–187.
- Qiu W., Scholthof K.B.G. 2001. Defective interfering RNAs of a satellite virus. *J. Virol.* 75: 5429–5432.

- Pospieszny H., Borodynko N. 1999. Wirus czarnej pierścieniowej plamistości pomidora (*Tomato black ring nepovirus*) – metody wykrywania i identyfikacji. Prog. Plant Protection/Post. Ochr. Roślin 39 (1): 327–331.
- Pospieszny H., Jończyk M., Borodynko N. 2003. First record of *Tomato black ring virus* (TBRV) in the natural infection of *Cucumis dativus* in Poland. J. Plant Protection Res. 43 (1): 11–18.
- Ryden K. 1965. Phlox – ringfläck – ensvaär virussjukdom orsahad av tomat – svarttringvirus. Växtskyddsnotiser 29: 77–81.
- Sastry K.S.M. 1966. Occurrence of *Tomato black ring virus* in India. Indian J. Microbiol. 6: 23–26.
- Schmelzer K. 1962/63. Untersuchungen an Viren der Zier- und Wildgehölze. 3. Mitt. Virosen an Robinia, Caryopteris, Ptelea und anderen Gattungen. Phytopathologische Z. 46: 235–268.
- Schmelzer K., Milinko J. 1963. Beiträge zur Kenntnis der Mosaikkrankheit der Robinia (*Robinia pseudoacacia* L.). Arch. Forstwesen 1–2: 1139–1151.
- Shukla D.D., Schmelzer K. 1972. Studies on virus and virus disease of crucifere plants. V. Viruses in horseradish. Acta Phytopath. Acad. Sci. Hung. 4: 305–313.
- Slogteren D.H.M. 1955. Serological analysis of some plant viruses with the gel-diffusion method. p. 45–50. Proc. 2nd Conf. Potato Virus Diseases, Lisse-Wageningen 1954.
- Smith K.M. 1946. *Tomato black-ring*: a new virus disease. Parasitology 37: 126–130.
- Smith K.M., Short M.E. 1959. Lettuce ringspot: a soil-borne virus disease. Plant Pathol. 8: 54–60.
- Twardowicz-Jakusz A. 1969. Badania diagnostyczne nad czarną pierścieniową plamistością pomidora. Biul. Inst. Ochr. Roślin 44: 123–136.
- Twardowicz-Jakusz A., Kaniewski W., Dunajska L. 1976. Z badań nad wiruzami pietruszki i marchwi. I. Wirus czarnej pierścieniowej plamistości pomidora (*Tomato black ring virus*) na marchwi. Zesz. Probl. Nauk Rol. 174: 175–193.
- Twardowicz-Jakusz A., Kaniewski W., Dunajska-Zielińska L. 1977. Badania diagnostyczne nad wirusami chrzanu. Zesz. Probl. Nauk Rol. 195: 173–193.
- Wellink J., Le Gall O., Sanfacon H., Ikegami M., Jones A.T. 2000. Family Comoviridae. p. 691–700. In: „The Seventh Report of the International Committee on Taxonomy of Viruses” (C.M. Fauquet, ed.). Academic Press, San Diego, CA, 1167 pp.
- Wingard A. 1928. Hosts and symptoms of ring spot, a virus disease of plants. J. Agricul. Res. 37: 127–153.

NATASZA BORODYNKO, BEATA HASIÓW-JAROSZEWSKA,
NATALIA RYMELSKA, HENRYK POSPIESZNY

OCCURRENCE OF TOMATO BLACK RING VIRUS IN POLAND

SUMMARY

Tomato black ring virus (TBRV) is a serious pathogen of many plants worldwide. TBRV has single stranded RNA genomes divided into two genomic RNAs. In Institute of Plant Protection – National Research Institute we collected different isolates of TBRV from zucchini, cucumber, tomato, potato, *Robinia pseudoacacia* L. and *Sambucus nigra*.

Using ELISA test and Dot blot immunoassay we were able to distinguish two serologically related viruses (TBRV and *Beet ringspot virus*).

Results from serological tests were confirmed by RT-PCR. The expected product about 1200 bp was amplified for all isolates tested.

Key words: *Tomato black ring virus*, ELISA, DBIA, RT-PCR