Lp. w zał. do Rozporządzenia MRiRW: 58.

Tytuł zadania: **Opracowanie czułych metod wykrywania najważniejszych wirusów ziemniaka**.

Kierownik zadania: dr hab. K. Treder, IHAR-PIB, Zakład Nasiennictwa i Ochrony Ziemniaka w Boninie

Wykonawcy: mgr inż. Anna Pawłowska, mgr inż. Mateusz Mielczarek, dr Agata Kaczmarek, mgr inż. Izabela Jadach-Żebrowska, st. technik Maria Fedczak

Celem projektu w 2019 r. było: (I) zoptymalizowanie metody zagęszczania wirusów z większych objętości poprzez wiązanie cząstek wirusa na membranach jonowymiennych, (II) zbadanie, czy odporność odmian wpływa na wykrywalność wirusów bezpośrednio w bulwach, (III) ocena przydatności kiełków do wykrywania wirusów, (IV) opracowanie starterów na PVM kompatybilnych z multipleksowym RT-PCR w czasie rzeczywistym do wykrywania wirusów Y, M i L, (V) sprawdzenie, czy ekstrakcja chloroformem umożliwia wykrywanie wirusów M i L bezpośrednio w soku z liści za pomocą kolorymetrycznego RT-LAMP.

Główny cel zadania realizowano w postaci pięciu tematów badawczych:

1. Opracowanie i optymalizacja nowych metod wykrywania wirusów.

2. Ocenę wpływu odporności odmian ziemniaka na skuteczność wykrywania wirusów w bulwach.

3. Badania nad wykrywaniem wirusów w bulwach i kiełkach ziemniaka za pomocą koktajl i DAS‑ELISA.

4. Adaptację i optymalizację metod molekularnych do wykrywania wirusów w roślinach in vitro.

5. Opracowanie testów diagnostycznych do szybkiego wykrywania wirusów.

**Temat badawczy 1**

*Materiały i metody.* Badanie wpływu pH. Soki rozcieńczono buforem o pH w zakresie od 4,5 do 8,5. Do mikropłytek filtracyjnych z membraną Q nakładano sok z wirusem Y, L i M oraz zdrowy. Mikropłytki płukano i wirusy eluowano 1M NaCl. Wirusy onitorowano testem ELISA *Badanie czułości.* Wykonano serie rozcieńczeń w buforze o pH 5,5 w zakresie 50-2000 razy. Próby zagęszczone na membranie Q oraz odebrane wcześniej próby nie zagęszczane badano testem DAS-ELISA.

*Wyniki i dyskusja.*Optymalne wiązanie wirusów PVY, PLRV i PVM do membrany Q zachodzi w pH 5,5. Zagęszczanie badanych wirusów na membranie Q zwiększa około dwukrotnie czułość ich wykrywania za pomocą testu ELISA w porównaniu do tych samych prób niezagęszczanch.

**Temat badawczy 2**

*Materiały i metody.* Założono doświadczenie polowe mające na celu porównanie wykrywalności wirusów PVY, PLRV i PVM w bulwach 9 odmian różniących się odpornością na te wirusy. Na początku września zebrano bulwy spod każdej rośliny. Po czterech tygodniach przechowywania część stolonową bulw badano za pomocą DAS-ELISA. Z tych samych bulw wycięto oczka do próby oczkowej oraz do badania kiełków. Uzyskane kiełki i potomne rośliny badano za pomocą DAS-ELISA.

*Wyniki i dyskusja*. W doświadczeniu polowym wykonanym w Boninie porażenie PVY było wysokie, a porażenie PVM niskie. PLRV odnotowano 7 na 265 roślin, pomimo stosowania jak co roku roślin infektorów oraz po raz drugi – wysadzania na rośliny w polu mszyc, które żerowały uprzednio na infektorach w szklarni. Temperatury w sezonie wegetacyjnym były wysokie i stąd wysokie porażenie PVY. W przypadku odmian posiadających wysoką odporność na PVY stwierdzono słabą wykrywalność w bulwach. Znacznie lepiej jest wykrywany w próbie oczkowej i kiełkach.

**Temat badawczy 3**

*Materiały i metody.* Trzech wykonawców wysadzało na polu zdrowe sadzeniaki w obecności infektorów wirusów. Zbierano bulwy, które badano za pomocą testu ELISA. Z bulw otrzymywano kiełki i rośliny potomne, które badano testem ELISA. Ponadto z bulwy, kiełki i liście trzech odmian ziemniaka badano testami ELISA, RT-LAMP i RT‑qPCR.

*Wyniki i dyskusja*. Potwierdzono dobrą zgodność wykrywania wirusów w kiełkach z próbą oczkową. Wyższą skutecznością wykazał się test koktajl ELISA niż DAS-ELISA dla kiełków. Stwierdzono wyższą skuteczność wykrywania PVM bezpośrednio w bulwach niż w liściach próby oczkowej. Test RT-qPCR jest bardziej skuteczny w ocenie porażenia liści, kiełków i bulw niż RT-LAMP i DAS-ELISA. Najwyższą skuteczność wykazał ten test dla bulw.

**Temat badawczy 4**

*Materiały i metody.* Stosowano komercyjne zestawy do real-time do których dodano RNA lub cDNA i 3 pary starterów plus sondy fluorescencyjne o różnych fluoroforach na każdy wirus. Optymalizowane było stężenie starterów oraz profil termiczny. Postęp amplifikacji i temperatury topnienia były monitorowane i analizowane za pomocą oprogramowania termocyklera czasu rzeczywistego.

*Wyniki i dyskusja*. Do analiz wykorzystano literaturowe oraz projektowane własne pary starterów i sondy. W reakcjach pojedynczych, wszystkie badane startery specyficznie wykrywały badany wirus. Natomiast multipleksowy test RT-PCR w czasie rzeczywistym wymaga wykonania dalszej optymalizacji, aby ujednolicić efektywność reakcji.

**Temat badawczy 5**

*Materiały i metody*. Z roślin zainfekowanych wirusami PLRV, PVM oraz z roślin zdrowych wyciśnięto sok, który potraktowano odczynnikami organicznymi w celu eliminacji substancji zmieniających barwę HNB w sposób niespecyficzny dla obecności wirusa. W doświadczeniu stosowano ekstrakcję chloroformem, Roti®-Aqua-Phenol (Roth), Roti®-Aqua-P/C/I (Roth) oraz mieszaniną Chloroform:Fenol:alkohol izoamylowy (24:24:1). 1 µl prób po ekstrakcji dodawano do mieszaniny reakcyjnej do RT‑LAMP z HNB. Po amplifikacji (65°C, 30 min) wizualnie ocenono zmianę barwy dla prób z wirusem, prób z roślin zdrowych (kontrola negatywna) oraz dla prób, w których zamiast soku dodana została woda (próba ślepa). Mieszanina reakcyjna w teście z HNB zawierała Isothermal Mastermix pozbawiony pirofosfatazy. Reakcja została przeprowadzona na starterach Almasi PLRV oraz M2. Sok z prób ekstrahowanych 200 razy w buforze do prób (PBS; 0,05% Tween; 2% PVP; pH 7,2) z dodatkiem alfa-kazeiny. Dosawano 1 µl do mieszaniny reakcyjnej do RT‑LAMP z HNB i wynik testu oceniano wizualnie.

*Wyniki i dyskusja*. Potwierdzono, że wirus PVY można wykryć wizualnie bezpośrednio w soku za pomocą barwnika HNB po uprzedniej ekstrakcji czynnika niespecyficznie zmieniającego kolor HNB odczynnikiem organicznym. Ekstrakcja organiczna nie usuwa czynników niespecyficznie zmieniających kolor reakcji w trakcie wykrywania PLRV i PVM. Zastosowanie komercyjnego zestawu do kolorymetrycznego testu LAMP (WarmStart® Colorimetric LAMP, NEB) umożliwia wizualną detekcję PVM i PLRV, jednak czułość jest bardzo niska. W związku z tym procedura wykonywania komercyjny testu kolorymetrycznego oraz warunki reakji LAMP wymagają optymalizacji