**Streszczenie zadania 58 za 2020 r. w Programie Badań Podstawowych w Produkcji Roślinnej.**

*Numer zadania****: 4-3-00-7-01***

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

*Kierownik:* ***dr hab. Krzysztof Treder***

**Cel zadania:**

Celem głównym projektu było opracowanie czułych metod wykrywania najważniejszych patogenów wirusowych (PVY, PVM, PLRV) w bulwach, kiełkach i liściach ziemniaka, dedykowanych do realizacji różnych celów badawczych. Cel główny realizowano w ramach szczegółowych tematów badawczych, którymi w 2020 roku były: (I) porównanie czułości wykrywania wirusów za pomocą magnetycznego testu ELISA z testem filtracyjnym, opartym o wiązania cząstek wirusowych na jonowymiennej membranie Q, (II) zbadanie, czy odporność odmian wpływa na wykrywalność wirusów bezpośrednio w bulwach, (III) ocena przydatności kiełków do wykrywania wirusów, (IV) wdrożenie triplex RT-qPCR do wykrywania wirusów Y, M i L w genotypach ziemniaka przechowywanych w banku genów; (V) adaptacja komercyjnego zestawu do kolorymetrycznego testu LAMP do wykrywania wirusów M i L bezpośrednio w soku z liści za pomocą kolorymetrycznego RT-LAMP.. Osiągnięto wszystkie założone cele projektu.

**Wyniki i wnioski:**

**Temat badawczy 1**. Wirusy PVY, PVM i PLRV z największą czułością wykrywano za pomocą magnetycznego testu ELISA. PVY i PLRV za pomocą tego testu wykryto we wszystkich badanych rozcieńczeniach. Ostatnim rozcieńczeniem w którym test wyszedł pozytywnie dla PVM był sok 1000-krtotnie rozcieńczony. Test filtracyjny wykrywał PLRV we wszystkich badanych rozcieńczeniach, jednak wartości ELISA były istotnie niższe w porównaniu z uzyskanymi w teście magnetycznym dla tego wirusa. Dla PVY test filtracyjny był nieznacznie bardziej czuły niż test DAS ELISA, końcowe rozcieńczenie w teście filtracyjnym było stukrotne, podczas gdy DAS-ELISA wykrywał PVY do rozcieńczenia pięćdziesięciokrotnego. W przypadku PVM test filtracyjny nie wykrył wirusa w żadnym z badanych rozcieńczeń.

**Temat badawczy 2**. W roku 2020 porażenie badanych odmian wirusem PVM było bardzo niskie (od zera do maksymalnie 20%, zależnie od odmiany). Porażenie PLRV było istotnie wyższe niż w latach ubiegłych. W przypadku podatnej odmiany Quincy 60% roślin było porażonych tym wirusem. Porażenie PVY było bardzo wysokie. Dla odmian kształtowało się następująco: Quincy 100 % (odporność 3,5), Krasa 100 % (odp. 4), Fresco 100 % odp. 5), - Irys 90 % (odp. 5,5), - Karatop 83,3 % (odp. 6), - Andromeda 26,7 % (odp. 6,5), Gwiazda 26,7 % (odp. 7), - Zeus 66,7 % (odp. 7,5), Finezja 33,3 % (odp. 9). Porażenie odmiany Finezja wymaga potwierdzenia, jeżeli nie jest to wynik fałszywy, oznacza pojawienie się mutanta PVY przełamującego skrajną odporność.

**Temat badawczy 3**. W 2020 roku niezależni wykonawcy wykryli zróżnicowane porażenie PVY w próbie oczkowej. Wszyscy wykonawcy wykryli więcej porażeń PVY w próbie oczkowej niż w bulwach. Wirus wolno namnaża się w bulwach w stanie spoczynku, które mają spowolniony metabolizm. Ponadto większość objętości bulwy zajmuje skrobia, liczba komórek, w których wirus może replikować jest niska. W efekcie koncentracja wirusa w bulwach jest niska i wzrasta dopiero w liściach roślin potomnych. W przypadku wirusa PVM wykonawca I wykrył więcej infekcji w bulwach niż w próbie oczkowej, a u wykonawcy III tendencja była odwrotna. Większa niż w próbie oczkowej liczba wykryć w bulwach, to prawdopodobnie próby fałszywie pozytywne. Wszyscy wykonawcy wykryli nieznacznie mniej porażeń PVY w kiełkach niż za pomocą próby oczkowej. Stwierdzono porównywalne porażenie PVM jak w roku 2019. Dość wysokie porażenie PVM odnotowali wykonawcy I i III (odpowiednio 51,9 i 61,1%) oraz niższe u wykonawcy II-5,0 %. PLRV nie wystąpił u żadnego z wykonawców. W 2020 r. wykonano badanie przydatności RT-qPCR oraz RT-LAMP do wykrywania wirusów bezpośrednio w bulwach i kiełkach. Jako model wybrano wirus Y ziemniaka oraz po 60 bulw trzech odmian ziemniaka umiarkowanie podatnych (Quincy, Fresco i Zeus). Uzyskane wyniki wskazują, że najbardziej skuteczną metodą wykrywania PVY jest RT-qPCR zarówno w bulwach, kiełkach jak i liściach, tak samo jak w latach poprzednich. 87,5% skuteczność wykrywania infekcji odnotowano w bulwach, liściach 89,9% i najwięcej w kiełkach 96,6% za pomocą testu RT-qPCR.

**Temat badawczy 4**. Przebadane zostały po dwa genotypy ziemniaka z wirusami PVY, PLRV i PVM z kolekcji wirusów oraz 266 genotypów zdrowych z kolekcji podstawowej Banku Genów utrzymywanego w Pracowni Zasobów Genowych i Kultur in Vitro w Oddziale IHAR w Boninie (łącznie 272 genotypy ziemniaka). Wszystkie preparaty RNA izolowane z badanych roślin były funkcjonalne i dobrej jakości, co potwierdziła specyficzna amplifikacja mRNA genu COX. Prawidłowo wykryte zostały rośliny z wirusem PVY, PLRV oraz z PVM. Preparaty RNA izolowanego z roślin in vitro były wolne od wirusów PVY, PLRV, PVM. Wynik negatywny potwierdził status roślin wolnych od wirusów dla badanych zdrowych genotypów.

**Temat badawczy 5**. W badaniach modelowych wykorzystano wirus Y ziemniaka. Do detekcji stosowano zestaw WarmStart Colometric LAMP firmy NEB. Z roślin zainfekowanych oraz z roślin zdrowych na prasie wyciśnięto sok, który rozcieńczono stukrotnie w: wodzie, buforze do prób, buforze Tris-Cl o pH 8,8 (10, 50, 100 mM) i rozworze NaOH (10, 25, 100, 200 i 300 mM). Nie otrzymano specyficznej zmiany koloru. Na barwę miał wpływ rodzaj użytego roztworu a nie obecność lub brak PVY. Podjęto próbę podgrzania soku z roślin zdrowych jak i porażonych przez 30 sekund w 90°C. W żadnym badanym wariancie nie nastąpiła specyficzna dla wirusa zmiana koloru. Podjęto próby uzyskania zmiany koloru z błękitem hydroksynaftalowym (HNB). Zastosowano zestaw LAMP firmy Optigen dedykowany do wykrywania produktu reakcji przez obserwację zmętnienia. Stukrotnie rozcieńczony sok roślin chorych i zdrowych podgrzewano przez 0,5; 1; 2 i 3 min w 90°C. Wszystkie próby zmieniły kolor z fioletowego na niebieski wskazując na brak specyficznej detekcji wirusa. Optymalizowane było także rozcieńczenie soku (100, 200, 300, 400, 500 i 1000-krotne). W żadnym z zastosowanych rozcieńczeń nie obserwowano zmiany koloru specyficznej dla wirusa. Wykonano doświadczenia z preparatami RNA izolowanymi z roślin z wirusem i z roślin zdrowych. Nastąpiła zmiana barwy w próbach z SYTO 82 plus HNB z fioletowej na różową, w próbach z HNB z niebieskiej na różową. Te zmiany barwy zaszły jedynie dla prób pozytywnych. Świadczy to o tym, że zestaw do amplifikacji z detekcją turbidymetryczną był aktywny a obserwowana zmiana koloru pozwalała na specyficzne wykrycie wirusa. W ramach optymalizacji został zbadany również wariant testu, w którym do mieszaniny reakcyjnej dodano kalceinę. Nie udało się uzyskać wyniku rozróżniającego kontrole pozytywne i negatywne z soku. Optymalizowane było rozcieńczenie soku (100, 200, 300, 400, 500 i 1000-krotne). Również w tym przypadku nie obserwowano specyficznej dla wirusa zmiany koloru lub fluorescencji. Podjęto próbę optymalizacji testu dodając do reakcji wyizolowane RNA. W tym wariancie badane były stężenia manganu w reakcji (0,05; 0,1; 0,2; 0,3; 0,4; 0,5; 1; 2; 3 i 4 mM) oraz stężenia kalceiny (5, 10, 15, 20, 25 µM). Zmiana koloru kalceiny była monitorowana za pomocą pomiaru fluorescencji w trakcie reakcji i wizualnie po zakończeniu reakcji. Obserwowano zieloną fluorescencję prób pozytywnych podświetlonych światłem niebieskim po zakończeniu reakcji. Różnice w kolorze fluorescencji były wyraźnie widoczne przy obserwacji okiem nieuzbrojonym. Dodatek MnCl w zakresie od 0,5 do 4 mM nie wzmocnił tego efektu. Specyficzna, wizualna detekcja wirusa przez obserwację zmiany koloru następowała gdy do mieszaniny reakcyjnej RT-LAMP dodawano RNA izolowane z roślin porażonych wirusem. Obserwowano zmianę barwy dla RNA izolowanego z roślin zawirusowanych, jednak nie zmieniała się ona dla prób do których dodano RNA ze zdrowych roślin lub wodę. Taką specyficzną dla wirusa zmianę koloru reakcji LAMP obserwowano zarówno dla reakcji z dodatkiem HNB, jak również w tych z kalceiną.

**Wnioski**

1. Największą czułość wykrywania wirusów posiada test magnetyczny.
2. Test filtracyjny nadaje się do badania właściwości biochemicznych wirusów, nie jest jednak przydatny do ich wykrywania.
3. Porażenie badanych odmian wirusem PVY było bardzo wysokie, podobnie jak w latach ubiegłych. W przeciwieństwie do lat ubiegłych, PLRV infekował odmiany dosyć efektywnie (10-60%). Jednocześnie porażenie wirusem PVM było bardzo niskie (0-20%).
4. Kiełki stanowią dobrą alternatywę dla pełnej próby oczkowej w certyfikacji bulw ziemniaka.
5. Wiarygone wykrywanie wirusów w bulwach umożliwia zoptymalizowany test RT-qPCR
6. RT-qPCR jest bardziej skuteczny w ocenie porażenia liści, kiełków i bulw niż RT-LAMP i DAS-ELISA.
7. Opracowana metoda umożliwia rutynowe badanie odmian wprowadzanych do banku genów ziemniaka na obecność wirusów.
8. Kolekcja bazowa Banku Genów Ziemniaka zlokalizowana w Oddziale IHAR-PIB w Boninie jest wolna od badanych wirusów.
9. Nie można specyficznie wykrwać wirusów za pomocą kolorymetrycznego testu RT LAMP bezposrenio w soku ziemniaka.
10. Po izolacji RNA z badanych roślin i dodaniu do mieszaniny reakcyjnej RT-LAMP z barwnikiem zmiana barwy jest specyficzna dla badanego wirusa.
11. Opracowany w ubiegłych latach w ramach niniejszego tematu badawczego RT- LAMP z detekcją fluorescencyjną w soku ziemniaka umożliwia detekcję wszystkich badanych wirusów zarówno w rozcieńczonym soku jak i w oczyszczonych preparatach RNA z wysoką czułością w ciągu kilku minut i można go wykonać w warunkach polowych.