Lp. w zał. do Rozporządzenia MRiRW: 58.

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

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

Wykonawcy: mgr inż. Mateusz Mielczarek, mgr inż. Anna Pawłowska, st. technik Maria Fedczak.

Celem projektu w 2018 r. było: (I) opracowanie 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 multipleksowego RT-PCR w czasie rzeczywistym do wykrywania wirusów Y, M i L; (V) opracowanie metody przygotowania soków do RT-LAMP, eliminującej z soku czynniki wywołujący zmianę barwy błękitu hydroksynaftolowego.

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.* Na kolumienkach ze złożami S i Q wirowano soki z wirusami Y, L i M oraz sok z roślin kontrolnych. Kolumienki płukano roztworami o wzrastającym stężeniu NaCl. Próby eluowane 1 M NaCl łączono i zagęszczano na filtrach wirowniczych o punkcie odcięcia 10 kDa. Obecność wirusów Y, L i M w próbach monitorowano testem ELISA. Na mikropłytki ze złożem S i Q nakładano soki z ww. wirusami rozcieńczone 20, 50, 100, 250, 500, 1000, 2000 krotnie. Przepływ przez złoże wymuszano stosująć podciśnienie. Płytki płukano i cząstki wirusów eluowano 1 M NaCl. Obecność wirusów badano testem ELISA. Te same próby badano przed koncentracją za pomoca klasycznego testu DAS-ELISA.

*Wyniki i dyskusja*. W zastosowanych warunkach PVM i PLRV miały jednorodny ładunek. Siła wiązania PVM ze złożem Q była duża. PLRV wiązał się słabo z tym złożem. Oba wirusy nie wiązały się ze złożem S. PVY składał się z populacji cząstek o słabym i silnym ładunku ujemnym (wiążących się do złoża Q) oraz dwóch frakcji o słabym i silnym ładunku dodatnim (wiążących się do złoża S). Największy był udział frakcji o słabym wiązaniu do membrany Q. Zagęszczanie cząstek wirusów na mebranie Q miało wyraźny, pozytywny wpływ na wykrywanie PVY. W przypadku PVM zabieg ten zwiększał dwukrotnie czułośc wykrywania wirusa, jednak miał negatywny wpływ na wysokość absorbancji w teście ELISA. Zatężanie cząstek wirusa nie powiodło się w przypadku PLRV, prawdopodobnie z uwagi na słabe oddziaływanie tego wirusa ze złożem Q w zastosowanych warunkach.

**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 w porównaniu z ubiegłymi sezonami wegetacyjnymi, a porażenie PVM i PLRV bardzo niskie, podobnie jak w ubiegłych sezonach. Temperatury w sezonie wegetacyjnym były wysokie i stąd duże porażenie PVY. Dla PVY potwierdzono wpływ wzrostu odporności odmian na spadek wykrywalności wirusa w bulwach.

**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 był bardziej skuteczny w ocenie porażenia liści, kiełków i bulw niż RT-LAMP i DAS-ELISA. Najwyższą skuteczność wykazał ten test dla liści.

**Temat badawczy 4**

*Materiały i metody*. Stosowano komercyjne zestawy do real time PCR z barwnikiem EvaGreen, do których dodano cDNA i 3 pary starterów (po jednej parze na każdy wirus). Optymalizowane było stężenie starterów. Wyjściowo stosowano profil termiczny proponowany przez producenta zestawu do real-time PCR, jednak jego parametry zostały zmienione pod kątem testu multipleksowego. Postęp amplifikacji i temperatury topnienia były monitorowane i analizowane za pomocą oprogramowania termocyklera czasu rzeczywistego.

*Wyniki i dyskusja*. Pojedynczy RT-PCR w czasie rzeczywistym pozwalał na wykrycie wszystkich badanych wirusów. Natomiast multipleksowy test RT-PCR w czasie rzeczywistym wymaga wykonania dalszych badań. W literaturze nie opisywano dotąd procedury multipleksowego testu RT-PCR w czasie rzeczywistym, który obok innych wirusów, wykrywa również PVM. Możliwe, że przyczyną tego stanu rzeczy są obserwowane przez nas problemy z wykrywaniem wirusów w reakcji multipleksowej z udziałem starterów na PVM. Opracowane przez nas startery do wykrywania PVM bardzo dobrze działają w pojedyńczym RT-PCR, nie sprawdzają się natomiast w reakcji multipleksowej. W celu opracowania skutecznego testu multipleksowego należy zaprojektować startery na wirus PVM kompatybilne z tym rodzajem testu.

**Temat badawczy 5**

*Materiały i metody*. Sok z roślin zdrowych i z PVY traktowano odczynnikami organicznymi w stosunku 1:1. Stosowano chloroform, aceton oraz octan etylu. Do mieszaniny reakcyjnej do RT LAMP z HNB dodawano 1 µl prób bez ekstrakcji lub prób po ekstrakcji rozpuszczalnikami organicznymi. Po amplifikacji ocenono zmianę barwy dla prób z wirusem, prób z roślin zdrowych oraz dla prób z wodą zamiast soku. Sok z prób ekstrahowanych chloroformem oraz sok z prób bez ekstrakcji rozcieńczono 20 i 200 razy w buforze do prób oraz w wariantach tego buforu: z dodatkiem siarczynu sodu, albuminy wołowej, alfa-kazeiny. Do mieszaniny reakcyjnej RT LAMP z HNB dodawano 1 µl prób. Wynik testu oceniano jw. Czułość optymalnej procedury oceniono wykonując rozcieńczenia (20 do 1 000 000 razy) w buforze do prób oraz buforze do prób z dodatkiem alfa-kazeiny i wykonano test RT-LAMP z HNB. Dla tych samych prób wykonano fluorescencyjny test RT-LAMP.

*Wyniki i dyskusja*. Stwierdzono, że specyficzna dla PVY zmiana barwy HNB zachodzi jedynie po ekstrakcji soku chloroformem. Wykazano, że stosując chloroform do usunięcia czynników powodujących niespecyficzną zmianę barwy mieszaniny reakcyjnej można wizualnie wykrywać PVY za pomocą kolorymetrycznego testu RT-LAMP z barwnikiem HNB bez izolacji RNA z badanych prób. Dodanie do prób alfa-kazeiny istotnie skracało czas wykrycia w próbach o niskiej koncentracji PVY. Czułość wizualnej detekcji z HNB była taka sama jak czułość wykrywania PVY za pomocą fluorescencyjnego testu RT-LAMP.