

OPRACOWANIE NOWYCH STARTERÓW DO WYKRYWANIA WIRUSA M ZIEMNIAKA (POTATO VIRUS M, PVM) ZA POMOCĄ TESTU RT-PCR

DEVELOPMENT OF NEW PRIMERS FOR DETECTION OF POTATO VIRUS M BY RT-PCR

dr Krzysztof Treder, mgr inż. Bogumiła Zacharzewska
IHAR-PIB Oddział w Boninie, e-mail: k.treder@ihar.edu.pl

Streszczenie

Wirus M ziemniaka (PVM) jest zaliczany do wirusów lekkich z uwagi na to, że straty plonu, jakie powoduje, są stosunkowo niskie. Podlega on jednak obowiązkowym badaniom weryfikacyjnym w certyfikacji sadzeń. Również rośliny wprowadzane do Banku Genów Ziemniaka muszą być wolne od patogenów. W badaniach prowadzonych w Pracowni Diagnostyki Molekularnej i Biochemii stwierdzono, że opracowane własne startery wykrywają PVM w reakcji RT-PCR z większą czułością niż startery opisywane w literaturze.

Słowa kluczowe: RT-PCR, wirus M ziemniaka

Abstract

Potato virus M (PVM), is classified as a light virus due to relatively low losses in the yield of the infected crop. However, in Poland seed potatoes are obligatorily tested for six viruses including PVM. Also, plants introduced into the Potato Gene Bank must be free from pathogens. In studies conducted at the Laboratory of Molecular Diagnostics and Biochemistry, it was found that developed primers detected PVM by RT-PCR reaction with greater sensitivity than primers described in the literature.

Keywords: detection, potato virus M, RT-PCR

Wirus M ziemniaka (PVM) jest przedstawicielem rodziny *Betaflexiviridae* należącej do rodzaju *Carlavirus*. Występuje na całym świecie, lecz znaczenie ekonomiczne ma jedynie w Europie Wschodniej i Południowo-Wschodniej. PVM jest wirusem nietrwałym, przenoszonym na kłujce mszyc, a także mechanicznie. Objawy chorobowe wywoływane przez PVM są zaliczane do słabych, a ich nasilenie zależy głównie od szczepu wirusa i genotypu (odmiany) ziemniaka (Chrzanowska i in. 2002; Zagórska, Chrzanowska 2007; Chrzanowska i in. 2011; Tatarowska i in. 2016). Mogą one przybierać postać od przejaśnienia nerwów, mozaiki czy zwijania się liści do silnego marszczenia liści, nekroz i karłowacenia całych roślin (Zagórska, Chrzanowska 2007; Erlichowski, Osowski 2016). Wirus powoduje straty plonu do 30%, jednak w skrajnych

przypadkach mogą one sięgać nawet 75% (za Chrzanowska i in. 2002).

PVM jest jednym z sześciu wirusów podlegających obowiązkowej ocenie w urzędowych badaniach weryfikacyjnych sadzeń w Polsce. Obowiązkowo na obecność wirusów są testowane także odmiany i rody wprowadzane do Banku Genów Ziemniaka (w oddziale IHAR-PIB w Boninie). Standardowo PVM jest wykrywany w próbie oczkowej i za pomocą immunologicznego testu ELISA (Zacharzewska, Treder 2014; Treder 2015), ale znacznie bardziej czuła jest molekularna technika RT-PCR (Treder 2015). Jest ona bardziej kosztowna niż test ELISA, może jednak znaleźć zastosowanie w diagnostyce roślin wprowadzanych do Banku Genów Ziemniaka oraz w bezpośrednim testowaniu bulw. Literatura dotycząca stosowania techniki RT-PCR do wykrywania PVM jest stosunkowo uboga (Xu i in. 2010;

Crosslin, Hammlin 2011), dlatego też celem pracy była optymalizacja testu RT-PCR do wykrywania wirusa M poprzez opracowanie nowych starterów.

Materiały i metody

Konserwatywne regiony genomu wirusa identyfikowano poprzez dopasowanie sekwencji dostępnych w banku genów za pomocą programu Genieous (Biomatters). Dla tych regionów zaprojektowano pary starterów, których skuteczność badano testem RT-PCR. Do badań wykorzystano izolaty PVM z kolekcji własnej. Z liści roślin zainfekowanych PVM RNA izolowano wg Zacharzewskiej i innych (2014). Uzyskane RNA doprowadzono do koncentracji 100 ng/1µl i seryjnie rozcieńczono do 10 fg/1µl. Syntezę cDNA wykonano za pomocą Reverse Verte Kit z przypadkowymi heksamerami wg zaleceń producenta (Novazym). Do łańcuchowej reakcji polimerazy (PCR) wykorzystano 2,5 µl cDNA.

Mieszanina PCR poza cDNA w końcowej objętości 10 µl zawierała: 2 mM MgCl₂, trójfosforany nukleotydów (dATP, dCTP, dGTP i dUTP) w stężeniu 0,2 mM każdy, 0,5 N-glikozydazy urydynowej (Bioline), 0,4 µM startery, 1 x bufor polimerazy i 1,25 U polimerazy GoTaq® Hot Start (Promega).

Reakcję wykonywano wg następującego profilu termicznego: wstępna denaturacja – 3 min w 95°C, 35 cykli złożonych z denaturacji przez 1 min w 94°C; przyłączanie starterów w 55°C przez 1 min, wydłużanie starterów w 72°C przez 1 min. Końcowe wydłu-

żanie prowadzono przez 5 min w 72°C. Produkty reakcji rozdzielano za pomocą elektroforezy w 1,5-proc. agarozie (140V przez 40 min). Żele barwiono za pomocą barwnika GelGreen (Biotium) i produkt reakcji wizualizowano poprzez wzbudzenie fluorescencji kompleksu barwnika z DNA przy 470 nm za pomocą transiluminatora Blue Box (Invitrogen). Żele dokumentowano za pomocą aparatu Nikon D90 z zastosowaniem pomarańczowego filtra. Opracowane startery porównano z opisanymi przez Crosslin i Hamlin (2011).

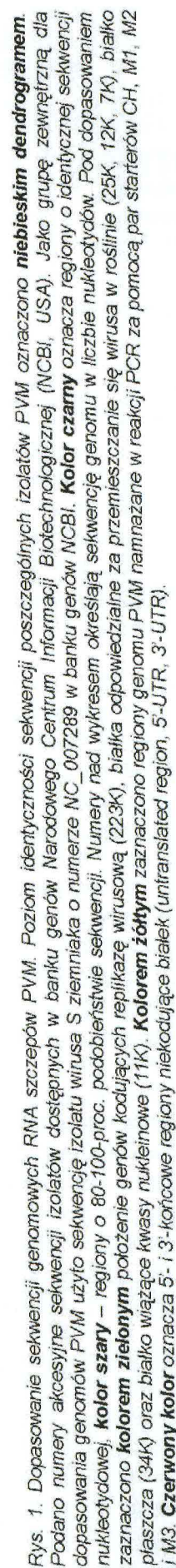
Wyniki i dyskusja

Stwierdzono, że najbardziej konserwatywną częścią genomu jest 3'-końcowy region obejmujący gen białka płaszcz, białko 13K i 3'-końcowy region niekodujący. Dla regionu kodującego białko płaszcz (rys. 1) zaprojektowano dwie pary starterów – M1 i M2. Trzecią parę M3 zaprojektowano dla regionu leżącego w obrębie genomu PVM kodującego wirusową replikazę (rys. 1, tab. 1). Badane startery porównywano ze starterami CH opublikowanymi przez Crosslin i Hamlin (2011). Pary M1, M2 oraz CH promowały amplifikację produktu PCR o długości zgodnej z przewidywaną. Natomiast u pary M3 nie obserwowano powstawania produktu reakcji PCR. Starter M3R jest zdegenerowany w 3. pozycji, licząc od końca 3'. Mogło to negatywnie wpłynąć na efektywność amplifikacji przez parę M3, dlatego wykluczono ją z dalszych prac.

Tabela 1

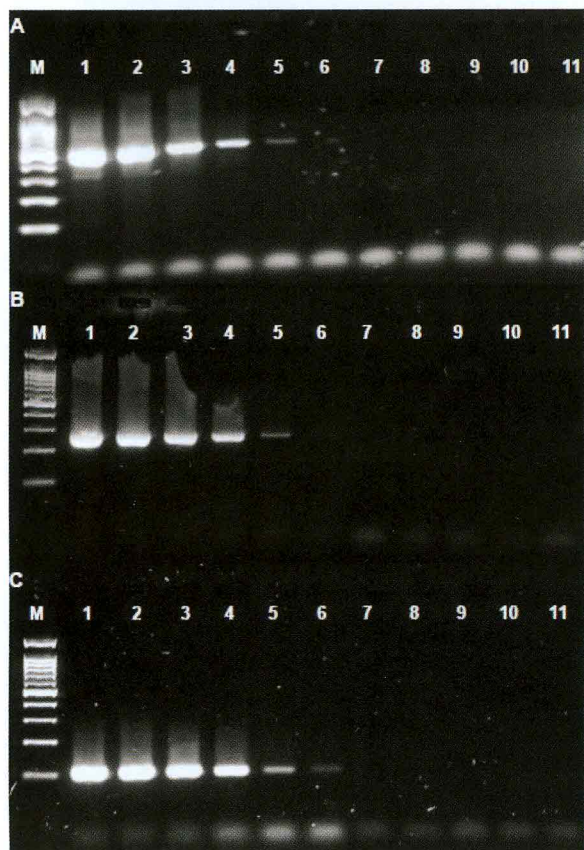
Sekwencje i pozycja w genomie PVM własnych par starterów M1-M3 oraz starterów CH zaprojektowanych przez Crosslin i Hamlin (2011). Dla każdej pary podano wielkość spodziewanego produktu PCR w liczbie par zasad (pz)

Nazwa	Sekwencja (5'-3')	Pozycja	Produkt (pz)
M1F	CTCCGTATTCTGGATCCGC	7701-7720	282
M1R	GGTCGCCTGATCAATCCCTC	7982-7963	
M2F	GAGGGATTGATCAGGCGACC	7963-7982	121
M2R	CAGTGACCTCGGCATTGAGA	8083-8064	
M3F	CCAAACAACCTGGGTGCGAAG	4746-4765	288
M3R	GCAGCACTTTTGCTCAGYTT	5034-5015	
CH-MF	GCCACATCYGAGGACATGAT	7585-7604	523
CH-MR	GTGAGCTCSGGACCATTTCAT	8108-8089	



Rys. 1. Dopasowanie sekwencji genomowych RNA szczepów PVM. Poziom identyczności sekwencji poszczególnych izolatów PVM oznaczono **niebieskim dendrogramem**. Podano numery akcesyjne sekwencji izolatów dostępnych w banku genów Narodowego Centrum Informacji Biotechnologicznej (NCBI, USA). Jako grupę zewnętrzną dla dopasowania genomów PVM użyto sekwencji izolatów wirusa S ziemniaka o numerze NC_007289 w banku genów NCBI. **Kolor czarny** oznacza regiony o identycznej sekwencji nukleotydowej, **kolor szary** – regiony o 80-100-proc. podobieństwie sekwencji. Numery nad wykresem określają sekwencję genomu w loczbie nukleotydów. Pod dopasowaniem zaznaczono **kolorem zielonym** położenie genów kodujących replikazę wirusową (223K), białka odpowiedzialne za przemieszczanie się wirusa w roślinie (25K, 12K, 7K), białko płaszczowe (34K) oraz białko wiążące kwasy nukleinowe (11K). **Kolorem żółtym** zaznaczono regiony genomu PVM namnażane w reakcji PCR za pomocą par starterów CH, M1, M2 i M3. **Czerwony kolor** oznacza 5'- i 3'-końcowe regiony niekodujące białek (untranslated region, 5'-UTR, 3'-UTR).

Czułość zaprojektowanych starterów M1 i M2 porównywano z czułością starterów CH (rys. 2). U pary starterów CH produkt amplifikacji obserwowano do 10 pg/reakcję (rys. 2A, ścieżka 5). Oba startery M1 i M2 promowały amplifikację produktu PCR do 1 pg RNA/reakcję (rys. 2BC, ścieżka 6), przy czym wydajność amplifikacji uzyskana za pomocą pary M2 była większa (rys. 2C, ścieżka 6).



Rys. 2. Wpływ starterów CH (A), M1 (B) i M2 (C) na czułość wykrywania PVM metodą RT-PCR. Ścieżki 1-8 – 10-krotne seryjne rozcieńczenia od 100 ng do 10 pg RNA dodanego do odwrotnej transkrypcji (RT) w reakcji; ścieżka 9 – do reakcji RT dodana woda, a nie RNA (ślepa RT); ścieżka 10 – reakcja PCR uzupełniona wodą zamiast cDNA (ślepa PCR); ścieżka 11 – reakcja uzupełniona o RNA wyizolowane ze zdrowych roślin, poddane odwrotnej transkrypcji i amplifikowane przez PCR (kontrola negatywna); M – marker Nova 100 bp DNA (Novazym), między 100-1000 pz co 100 pz, powyżej 1000 pz – jeden prążek o wielkości 1500 pz

Żadna z badanych par starterów nie amplifikowała produktów niespecyficznych w obecności 100 ng RNA izolowanego ze

zdrowych roślin (rys. 2A-C, ścieżka 11). Również w reakcjach, do których nie dodano RNA na etapie odwrotnej transkrypcji (rys. 2A-C, ścieżka 9) lub cDNA na etapie PCR (rys. 2A-C, ścieżka 10), nie powstały produkty niespecyficzne. Świadczy to o tym, że wszystkie badane startery są specyficzne i nie tworzą dimerów starterów.

Na podstawie wykonanych badań stwierdzono, że optymalną parą starterów do wykrywania PVM jest para M2. W Pracowni Diagnostyki Molekularnej i Biochemii prowadzone są dalsze badania, których celem jest wykorzystanie starterów M2 jako elementu testu multiplex RT-PCR, który pozwoli na jednoczesne wykrywanie wszystkich sześciu wirusów podlegających obowiązkowej ocenie weryfikacyjnej.

Literatura

1. Chrzanowska M., Michalak K., Zagórska H., Szajko K. 2011. Reakcja na wirusy odmian ziemniaka znajdujących się w Krajowym Rejestrze w 2010 roku. – Biul. IHAR 260/261: 309-323;
2. Chrzanowska M., Sieczka M. T., Zagórska H. 2002. Resistance to PVM in potato parental lines bred in Młochów Research Center, IHAR. – Plant Breed. Seed Sci. 46: 57-65;
3. Crosslin J. M., Hamlin L. L. 2011. Standardized RT-PCR conditions for detection and identification of eleven viruses of potato and potato spindle tuber viroid. – Am. J. Potato Res. 88: 333-338;
4. Erlichowski T., Osowski J. 2016. Choroby wirusowe ziemniaka – objawy, zagrożenie i wpływ na degenerację uprawianych odmian. – Ziemn. Pol. 3: 16-22;
5. Tatarowska B., Milczarek D., Plich J., Flis B. 2016. Reakcja na wirus M ziemniaka (PVM) tetraploidalnych rodów ziemniaka. – Biul. IHAR 280: 23-33;
6. Treder K. 2015. Metody wykrywania obecności wirusów ziemniaka. – Ziemn. Pol. 4: 18-23;
7. Xu H., D'Aubin J., Nie J. 2010. Genetic variability in potato virus M and the development of RT-PCR and RFLP procedures for the detection of this virus in seed potatoes. – Virol. J.: 7-25;
8. Zacharzewska B., Przewodowska A., Treder K. 2014. The adaptation of silica capture RT-PCR for the detection of potato virus Y. – Am. J. Potato Res. 91: 525-531.
9. Zacharzewska B., Treder K. 2014. Test ELISA i jego modyfikacje. – Ziemn. Pol. 1: 14-16;
10. Zagórska H., Chrzanowska M. 2007. Analiza wyników badań z lat 1973-2005 nad reakcją odmian ziemniaka na wirus M ziemniaka. – Biul. IHAR 243: 227-234