

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

Celem projektu w 2016 r. było (I) porównanie czułości magnetycznego testu ELISA z DAS-ELISA, (II) zbadanie, czy odporność odmian wpływa na wykrywalność wirusów bezpośrednio w bulwach, (III) ocena przydatności kiełków do wykrywania wirusów, (IV) opracowanie multipleksowego RT-PCR dla wirusów PVY, PLRV i PVM (V) opracowanie testu RT-LAMP do wizualnego wykrywania PVY w warunkach polowych.

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. Sok z roślin zainfekowanych PVY rozcieńczono 20x rozc. sokiem zdrowym 20, 50, 100, 250, 500, 1000, 2000x. Za pomocą DAS-ELISA badano po 200 µl prób z rozcieńczeń. W magnetycznej wersji testu do 0,8 ml rozcieńczeń dodano mikrosfery magnetyczne z przeciwciałami anty-PVY. Próby mieszano przez 30 min. Mikrosfery zebrano na magnesie, myto buforem PBS i zawieszono w 200 µl buforu plus koniugat przeciwciał PVY z alkaliczną fosfatazą. Próby mieszano. Po odpłukaniu niezwiązanych kompleksów cząstki zawieszono w 300 µl buforu i przeniesiono do mikroplątki. Mikroplątkę umieszczono na statywie magnetycznym, odebrano bufor i do studzienek dodano po 200 µl substratu. Po 10 minutach inkubacji zmierzono gęstość optyczną w długości fali 405 nm na czytniku mikroplątek.

Wyniki i dyskusja. Za pomocą magnetycznej wersji testu ELISA, PVY wykryto we wszystkich badanych rozcieńczeniach w każdym z trzech powtórzeń biologicznych, podczas gdy klasyczny test ELISA pozwolił na wykrycie PVY w sokach rozcieńczonych do 250-razy. Uzyskany wynik świadczy o tym, że magnetyczna wersja testu jest co najmniej ośmiokrotnie bardziej czuła od testu DAS-ELISA.

Temat badawczy 2.

Materiały i metody. Założono doświadczenie polowe mające na celu porównanie wykrywalności wirusów PVY, PLRV i PVM w bulwach 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 Boninie w 2016 r. porażenie wirusem Y było wysokie. Pomimo obecności infektorów, porażenie PLRV był bardzo niskie, a porażenie PVM bliskie zera. Analizując wyniki stwierdzono, że dla wirusa Y, wzrost odporności odmian miała negatywny wpływ na wykrywalność PVY w bulwach. Na podstawie wyników własnych oraz zleconych do wykonania trzem niezależnym laboratoriom oceniających porażenie sadzeniaków wirusami można przypuszczać, że odporność odmian nie ma istotnego wpływu na wykrywalność PVM i PLRV w bulwach.

Temat badawczy 3

Materiały i metody. Wykonano badanie porównujące test DAS-ELISA na kiełkach z testem koktajl-ELISA na bulwach i z próbą oczkową. Zdrowe sadzeniaki wysadzono na polu w obecności infektorów wirusów i zbierano bulwy, które badano za pomocą testu ELISA. Z bulw otrzymywano kiełki i rośliny potomne (próba oczkowa), które badano testem ELISA. Wykonano również doświadczenie testujące, czy metody RT-LAMP i RT-PCR w czasie rzeczywistym można adaptować do wykrywania wirusa Y ziemniaka bezpośrednio w bulwach. Z bulw trzech odmian ziemniaka izolowano RNA i wykonano testy RT-LAMP i RT-qPCR. Te same bulwy badano za pomocą próby oczkowej, ELISA na kiełkach oraz ELISA na ekstraktach z bulw.

Wyniki i dyskusja. W 2016 PLRV wykryto tylko w jednej lokalizacji. Porażenie PVM było umiarkowane a PVY wysokie. W badaniu kielków uzyskano identyczny lub wyższy poziom porażenia wirusem M w porównaniu z próbą oczkową. Potwierdzono dobrą skuteczność wykrywania PVM bezpośrednio w bulwach i w kielkach testem koktajlowym. Skuteczność wykrywania PVY bezpośrednio w bulwach była niższa niż w próbach oczkowych. Testowanie kielków testem ELISA na PVY pozwalało na uzyskanie dużej zgodności wyników z próbą oczkową. W 2016 r. wykonano również badanie przydatności RT-qPCR oraz RT-LAMP do wykrywania wirusów bezpośrednio w bulwach i kielkach. Najbardziej skuteczną metodą wykrywania wirusa Y w roślinach z próby oczkowej był test RT-LAMP, za pomocą którego wykryto nieznacznie większą liczbę porażonych roślin niż testem ELISA. Wyniki testu RT-qPCR uzyskane dla ekstraktów z bulw znacząco zaniżały poziom porażenia wirusem badanych roślin. Wykrywanie wirusa Y w kielkach i bulwach było najbardziej efektywne za pomocą testu ELISA. Ponieważ w badaniach laboratoryjnych testy RT-LAMP i RT-qPCR mają dużo wyższą czułość niż test ELISA, uzyskany wynik jest najprawdopodobniej efektem problemów z izolacją dobrej jakości RNA z bulw ziemniaka. Konieczne są prace nad optymalizacją warunków izolacji RNA z bulw ziemniaka, by możliwe było wykorzystanie czułości testów molekularnych do badania obecności wirusów w bulwach.

Temat badawczy 4

Materiały i metody. Z roślin zakażonych PVY izolowano RNA, które rozcieńczone do 10 fg/1µl. Rozcieńczenia badano testem uni i multiplex RT-PCR na wirusy Y, M i L. Produkty reakcji rozdzielano za pomocą elektroforezy w obecności barwnika GelGreen. Żele fotografowano po wzbudzeniu fluorescencji.

Wyniki i dyskusja. W celu opracowania multipleksowego RT-PCR do jednoczesnego wykrywania wirusów PVY, PLRV i PVM wybrano startery w taki sposób, aby wielkość przewidywanego produktu PCR nie pokrywała się ze sobą. Wykorzystane w reakcji multipleksowej RT-PCR startery pozwalały na jednoczesne wykrywanie RNA trzech badanych wirusów z czułością do 100 pg całkowitego RNA na reakcję. Czułość wykrywania wirusów L i Y w reakcji uniplex-PCR była taka sama jak multiplex-PCR, natomiast czułość wykrywania wirusa M była mniejsza niż multiplex-PCR. Przebadane startery były specyficzne.

Temat badawczy 5

Materiały i metody. Celem tematu badawczego był dobór warunków wykonania kolorymetrycznej wersji testu RT-LAMP. Badano możliwość dodania do reakcji barwników wiążących DNA (zieleń, malachitowa, fiolet krystaliczny) lub kompleksujących magnez (błękit hydroksynaftolowy). Po ustaleniu optymalnych warunków określono czułość testu. Izolowano RNA z roślin porażonych PVY i rozcieńczone do 10 fg/1µl. Rozcieńczenia badano testem RT-LAMP. Aby można było ocenić postęp reakcji gołym okiem do mieszaniny dodawano barwniki interkalujące DNA i/lub kompleksujące magnez.

Wyniki i dyskusja. W celu opracowania kolorymetrycznego testu RT-LAMP przebadano zieleń malachitowa, fiolet krystaliczny, berberyna oraz błękit hydroksynaftolowy (HNB). Optymalizowano koncentrację barwników w reakcji LAMP. Spośród badanych barwników, jedynie HNB pozwalał na wiarygodną i specyficzną detekcję wirusa przez obserwację zmiany barwy w reakcji pozytywnej i braku zmiany barwy w reakcji kontrolnej zawierającej RNA ze zdrowych roślin lub wodę zamiast RNA. Czułość kolorymetrycznego testu RT-LAMP z HNB wynosiła 10 fg/µl RNA.