

WYKRYWANIE WIRUSA Y W BULWACH I KIEŁKACH ZIEMNIAKA

dr Krzysztof Treder, mgr inż. Joanna Chołuj

mgr. inż. Anna Pawłowska, mgr inż. Marta Dybner

IHAR-PIB, Pracownia Diagnostyki Molekularnej i Biochemii w Boninie

e-mail: k.treder@ihar.edu.pl

Wirus Y (PVY) jest obecnie najważniejszym wirusem infekującym rośliny ziemniaka (Wróbel, Wąsik 2013). Szczególne znaczenie ma w produkcji nasiennej. Zdrowotność sadzeniaków jest oceniana w tzw. próby oczkowej. Polega ona na wycięciu fragmentów bulw z pojedynczymi oczkami, chemicznym przerwaniu ich spoczynku, podkiełkowaniu w 21°C w ciemności, a następnie wysadzeniu w szklarni i wykonaniu testu DAS-ELISA (ang. double-antibody sandwich enzyme-linked immunosorbent assay) z użyciem soku z próbek liści pobranych z 4-6-tygodniowych roślin. Opisana procedura jest dobrze opracowana, czuła, wiarygodna i skuteczna. Jest jednak kosztowna oraz czasochłonna. Wynik uzyskuje się po upływie kilku tygodni do kilku miesięcy od przesłania bulw do analizy. Koszty oceny są wysokie, ponieważ zdrowotność bulw ocenia się w sezonie jesienno-zimowym, po zbiorze ziemniaków. W efekcie pochodzące z oczek rośliny do badań uprawia się w szklarniach, które muszą być ogrzewane do odpowiedniej temperatury oraz odpowiednio doświetlane. Dlatego też od ponad 30 lat trwają próby opracowania metody pozwalającej na wykrywanie wirusów bezpośrednio w ekstraktach z bulw. Pomimo początkowych sukcesów, wszystkie badane metody wykrywania wirusów bezpośrednio w bulwach są mniej skuteczne niż próba oczkowa. Alternatywą dla niej może być wykrywanie wirusów bezpośrednio w kiełkach. Dlatego podjęto badania mające na celu ocenę przydatności kiełków do wykrywania wirusów, stosując PVY jako model.

Założono doświadczenie polowe celem porównania wykrywalności PVY w bulwach i kiełkach odmian różniących się odpornością na niego w zakresie od 3 (bardzo podatne) do 9 (skrajnie odporne) w 9-stopniowej skali odporności. Do badań wybrano odmiany Quincy (3-4), Krasa (4), Fresco (5), Irys (5-6), Zeus (7-8) i Finezja (9). Wiosną wysadzono na polu zdrowe sadzeniaki tych odmian. Między rzędami, na których je uprawiano, wysadzono rośliny wtórnie zainfekowane PVY (infektory). Na początku września zebrano i ponumerowano po 3 bulwy spod każdej rośliny. Po 4 tygodniach przechowywania bulwy umyto i pobrano część tkanki przystolonowej, z której przygotowano 5-proc. homogenat w buforze do prób. Homogenaty badano za pomocą DAS-ELISA. Z tych samych bulw wycięto po trzy oczka do próby oczkowej oraz po trzy oczka do badania kiełków. Kiełki uzyskane po dwóch tygodniach inkubacji oczek w podkiełkowni badano za pomocą DAS-ELISA. Rośliny potomne z serii oczek przeznaczonych do prób oczkowych uzyskano po 2 tygodniach podkiełkowania i 5 tygodniach uprawiania w szklarni. Liście tych roślin badano za pomocą DAS-ELISA. Dodatkowo wykonano doświadczenie testujące, czy test RT-PCR w czasie rzeczywistym (RT-qPCR) można adaptować do wykrywania wirusa Y ziemniaka bezpośrednio w bulwach i kiełkach. Z bulw i kiełków trzech umiarkowanie podatnych odmian ziemniaka, uprawianych jw. izolowano RNA i wykonano test RT-qPCR. Te same bulwy badano za pomocą próby oczkowej, DAS-ELISA na kiełkach oraz DAS-ELISA na ekstraktach z bulw.

Za pomocą prób oczkowych wykazano, że zainfekowane zostały wszystkie rośliny podatnej odmiany Quincy oraz większość roślin średnio podatnych odmian Fresco, Krasa i Irys. Najmniej porażen wirusem wykryto w roślinach odpornej odmiany Zeus. Wirusa nie wykryto jedynie w roślinach skrajnie odpornej odmiany Finezja. Wyniki badania ekstraktu z kiełków były zbliżone do próby oczkowej. Pełną zgodność z próbą oczkową uzyskano dla odmian

Quincy, Fresco i Finezja. W odmianach Krasa i Zeus wykryto o jedną roślinę porażoną mniej, a w odmianie Irys o trzy rośliny mniej niż w próbie oczkowej. Badając ekstrakty bulw, porażenie wirusem Y wykryto w istotnie mniejszej liczbie roślin niż za pomocą próby oczkowej. Poziom porażenia, stwierdzony za pomocą próby oczkowej i badania kielków, malał wraz ze wzrostem odporności odmian na PVY.

Test RT-qPCR od ponad dekady uważany jest za najbardziej czułą metodę wykrywania wirusów w materiale roślinnym. Dlatego porównano skuteczność wykrywania PVY za pomocą próby oczkowej, DAS-ELISA na kielkach oraz DAS-ELISA i RT-qPCR bezpośrednio w bulwach ziemniaka. Najskuteczniejsza w ocenie porażenia PVY okazała się próba oczkowa. Badając ekstrakty z kielków testem ELISA, uzyskano wynik nieróżniący się istotnie od wyniku próby oczkowej. Wyniki testu ELISA uzyskane dla ekstraktów z bulw ponad dwukrotnie zaniżały poziom porażenia badanych roślin wirusem. Wbrew oczekiwaniom, najmniej skuteczną metodą oceny porażenia wirusem był test RT-qPCR, który wykrył PVY w dwukrotnie mniejszej liczbie bulw niż test ELISA na ekstraktach z bulw.

W osobnym doświadczeniu porównano skuteczność wykrywania PVY w kielkach za pomocą testu DAS-ELISA i testu RT-qPCR. DAS-ELISA był bardziej skuteczny niż RT-qPCR, gdyż wykrył obecność wirusa w większej liczbie kielków. Biorąc pod uwagę, że RT-qPCR w badaniach laboratoryjnych jest od 100 do 1000 razy bardziej czuły niż ELISA, spodziewano się wysokiej skuteczności tej metody w ocenie bulw i kielków. Uzyskany wynik świadczy najprawdopodobniej o tym, że w izolowanym RNA znajdują się inhibitory reakcji RT-qPCR. Ponieważ RNA stosowane w doświadczeniu miało bardzo dobrą czystość spektrofotometryczną (stosunek absorbancji 260/280 ok. 2.0), muszą to być substancje nieabsorbujące w ultrafiolecie. Konieczne jest podjęcie prac nad opracowaniem metody izolacji RNA z bulw ziemniaka.

LITERATURA

1. Wróbel S., Wąsik A. 2013. Seed potato production in Poland. – Am. J. Potato Res. 3: 260-268

IZOTERMICZNA AMPLIFIKACJA KWASÓW NUKLEINOWYCH JAKO SZYBKI TEST WYKRYWANIA WIRUSÓW ZIEMNIAKA NA PRZYKŁADZIE WIRUSA Y

mgr inż. Joanna Chołuj, mgr inż. Bogumiła Zacharzewska, dr Krzysztof Treder
IHAR-PIB, Pracownia Diagnostyki Molekularnej i Biochemii w Boninie
e-mail: j.choluj@ihar.edu.pl

Wirus Y ziemniaka (PVY) ma obecnie największe znaczenie w produkcji nasiennej ziemniaka w Polsce i na świecie (Wróbel, Wąsik 2013). Duże problemy w nasiennictwie stwarza bezobjawowe występowanie wirusa u wielu odmian ziemniaka, szczególnie gdy jego koncentracja jest niska. Dzięki temu wirus może przez kilka pokoleń rozprzestrzeniać się wraz z sadzeniakami i po namnożeniu wywoływać znaczne, nawet 80-proc., straty plonu.

Celem prezentowanych badań było opracowanie molekularnego testu do wykrywania PVY w warunkach polowych. W ubiegłych latach opracowano w naszej Pracowni test do wykry-

wania PVY za pomocą izotermicznej amplifikacji kwasów nukleinowych (RT-LAMP). Genom PVY jest zbudowany z jednoniciowego RNA. Dlatego procedury detekcji PVY polegające na amplifikacji fragmentu genomu (RT-PCR, RT-LAMP) wymagają izolacji RNA z badanych roślin. Do izolacji RNA stosowane są urządzenia laboratoryjne, takie jak wirówki czy pompy próżniowe, w związku z czym jej wykonanie w warunkach polowych może być problematyczne. Dlatego badano, czy możliwe jest przeprowadzenie testu RT-LAMP bezpośrednio na sokach, z pominięciem izolacji RNA. Uzyskane wyniki wskazują, że test RT-LAMP wykonany na sokach pozawala na wykrycie PVY z większą czułością niż w próbach RNA izolowanych z tych soków. Wynika to prawdopodobnie z opisywanej w literaturze odporności polimeraz stosowanych w izotermicznej amplifikacji kwasów nukleinowych na inhibitory obecne w soku roślinnym, na które z kolei bardzo wrażliwe są polimerazy stosowane w teście RT-PCR.

LITERATURA

2. Wróbel S., Wąsik A. 2013. Seed potato production in Poland. – Am. J. Potato Res. 3: 260-268

OCENA JEDNORODNOŚCI ODMIAN ZIEMNIAKA ZA POMOCĄ ELEKTROFOREZY NATYWNEJ I MOLEKULARNEGO TESTU ISAP

mgr inż. Anna Pawłowska, mgr inż. Joanna Chołuj, dr Krzysztof Treder

IHAR-PIB, Zakład Nasiennictwa i Ochrony Ziemniaka w Boninie

e-mail: a.pawlowska@ihar.edu.pl

Identyfikacja odmian i interesujących rodów ma szczególne znaczenie w przypadku psianki ziemniaka (*Solanum tuberosum*), pospolicie nazywanej ziemniakiem. Pochodzi on z Ameryki Południowej z regionów dzisiejszego Peru, Boliwii, Kolumbii i Chile. Obecnie jest rozprzestrzeniony na całym świecie jako roślina uprawna o dużym znaczeniu w Europie i Azji. Jest trzecim najważniejszym warzywem na świecie, po ryżu i pszenicy. Globalna produkcja ziemniaków przekracza 374 mln ton rocznie.

Produkcja ziemniaków jest wysoce wyspecjalizowana i charakteryzuje się wielostronnym użytkowaniem. Stąd dla odbiorcy bardzo ważna jest pewność odmiany, jaką otrzymuje. Natomiast dla hodowcy wytworzenie nowej odmiany o cechach pożądanых jest procesem kosztownym i długotrwałym, dlatego też musi mieć narzędzia do udowodnienia, że konkretna odmiana jest jego własnością. Odrębność odmiany może być określona za pomocą zespołu cech morfologicznych (kolor liści, kształt kwiatu) czy fizjologicznych (wielkość plonu, sposób kiełkowania). Takie podejście wymaga analizy całych roślin na różnych etapach ich fizjologicznego rozwoju. Ponadto na fenotyp duży wpływ mogą mieć abiotyczne i biotyczne czynniki środowiska: typ gleby, sposób uprawy i nawożenia czy infekcje patogenami powodujące objawy chorób. Na tej podstawie nie zawsze jest możliwe określenie odrębności odmianowej z powodu dużego podobieństwa fenotypowego, zwłaszcza na poziomie bulw. Ponadto tradycyjna analiza morfologiczna jest długotrwała, a nowoczesna produkcja nasiennej wymaga metod szybkich i dyskryminujących. Dlatego od dawna poszukiwano metod identyfikacji, które w prosty i obiektywny sposób pozwoliłyby na stwierdzenie tożsamości badanych odmian.

OPRACOWANIE TESTU RT-PCR DO WYKRYWANIA WIRUSA M ZIEMNIAKA

mgr inż. Bogumiła Zacharzewska, dr Krzysztof Treder
IHAR-PIB, Pracownia Diagnostyki Molekularnej i Biochemii
e-mail: k.treder@ihar.edu.pl

Wirus M ziemniaka (PVM) zaliczany jest do wirusów mało inwazyjnych z uwagi na stosunkowo niskie straty w plonie roślin porażonych tym wirusem. Jednak w roślinach porażonych innymi patogenami infekcja PVM może prowadzić do poważnych strat ekonomicznych. W badaniach prowadzonych w Pracowni Diagnostyki Molekularnej i Biochemii w Boninie stwierdzono, że opisywane w literaturze startery do wykrywania PVM za pomocą testu RT-PCR często nie wykrywają wirusa w roślinach, w których jego obecność potwierdzono testem ELISA.

Dlatego podjęto prace mające na celu opracowanie własnych starterów wykrywających PVM w reakcji RT-PCR. W celu zaprojektowania uniwersalnych starterów do wykrywania PVM konserwatywne regiony genomu tego wirusa identyfikowano poprzez dopasowanie sekwencji dostępnych w banku genów za pomocą programu Geneious (Biomatters). Dla tych regionów zaprojektowano pary starterów, których skuteczność testowano testem RT-PCR. Z liści roślin zainfekowanych PVM izolowano RNA. Uzyskane RNA doprowadzono do 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 reakcji 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, 1x 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; przyłączaniu starterów w 55°C przez 1 min, wydłużaniu starterów w 72°C przez 1 min. Końcowe wydłużanie 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. W ramach badań optymalizowano warunki reakcji. Czułość badano dla opracowanych starterów i starterów literaturowych.

Za pomocą analizy dopasowania siedmiu genomowych sekwencji PVM wykazano, że najbardziej konserwatywnym regionem genomu jest 3-końcowy fragment genu kodującego białko płaszcza. Drugi konserwatywny region zidentyfikowano w środkowej części genu kodującego RNA-zależną RNA polimerazę. Dla pierwszego regionu zaprojektowano dwie pary starterów – M1 i M2, a dla drugiego jedną parę – M3. Badane startery porównywano z literaturowymi starterami CH. Pary M1, M2 oraz CH promowały amplifikację produktu PCR o długości zgodnej z przewidywaną. Natomiast dla pary M3 nie obserwowano powstawania produktu reakcji PCR. Starter M3R jest zdegenerowany w 3. pozycji licząc od końca 3', co mogło negatywnie wpłynąć na efektywność amplifikacji przez parę M3. Dlatego wykluczono tę parę z dalszych prac.

Czułość zaprojektowanych starterów M1 i M2 porównywano z czułością starterów CH. RNA izolowane z rośliny porażonej PVM doprowadzono do 100 ng/μl i przygotowano serię rozcieńczeń pokrywających w dziesięciokrotnych rozcieńczeniach zakres 100 ng/μl – 10 fg/μl. Dla pary starterów CH produkt amplifikacji obserwowano do 10 pg/reakcję. Oba startery zaprojektowane w ramach doświadczenia (M1 i M2) promowały amplifikację produktu PCR do 1 pg RNA/reakcję. Jednak wydajność amplifikacji uzyskana za pomocą pary M2 była większa. Żadna z badanych par starterów nie amplifikowała produktów niespecyficznych w obecności 100 ng RNA izolowanego ze zdrowych roślin. Również w reakcjach, do których nie dodano RNA na etapie odwrotnej transkrypcji lub cDNA na etapie reakcji PCR nie powstały produkty niespecyficzne. Świadczy to 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.

WPLYW ENZYMÓW LITYCZNYCH NA IZOLACJĘ DNA ORAZ CZUŁOŚĆ TESTU PCR W DIAGNOSTYCE KWARANTANNOYCH BAKTERII ZIEMNIAKA

*mgr inż. Katarzyna Salamońska, dr inż. Włodzimierz Przewodowski
dr inż. Agnieszka Przewodowska, mgr inż. Wioleta Stochła
IHAR-PIB, Pracownia Diagnostyki Molekularnej i Biochemii w Boninie
e-mail: wlodzimierz.przewodowski@tu.koszalin.pl*

Jednym z najważniejszych czynników wpływających na prawidłową diagnostykę molekularną bakteryjnych patogenów roślin jest sposób izolacji kwasów nukleinowych (DNA/RNA). Jako jeden z początkowych etapów pozwalających na przygotowanie badanego materiału do oceny metodami molekularnymi etap ten warunkuje poprawność identyfikacji ww. patogenów, szczególnie izolowanych z tkanki roślinnej. Dla uzyskania zatem odpowiedniej czułości metod molekularnych niezbędne jest stosowanie procedury pozwalającej na izolację odpowiedniej jakości (czystości i ilości) materiału genetycznego z jednoczesnym pozbyciem się substancji hamujących przebieg reakcji PCR.

Celem prezentowanych badań było porównanie różnych warunków izolacji kwasów nukleinowych w obecności enzymów litycznych oraz ocena wpływu tych warunków na jakość wyizolowanego DNA oraz czułość testu PCR.

Jako modelowy materiał biologiczny stosowano komórki kwarantannowych bakterii *Clavibacter michiganensis* ssp. *sepedonicus* przygotowane w postaci świeżo sporządzonych zawiesin w sterylnej wodzie oraz ekstrakcie roślinnym.

Aby zapewnić zróżnicowanie warunków izolacji kwasów nukleinowych, DNA bakterii izolowano w obecności wody i soku z bulw ziemniaka, w których przed izolacją sporządzono zawiesiny bakteryjne. Do izolacji DNA użyto metody wysokosolnej, polegającej na selektywnym ekstrahowaniu kwasów nukleinowych w warunkach buforowych i obecności wysokich stężeń soli. W ramach badań porównywano różne warianty izolacji DNA z udziałem dwóch enzymów stosowanych w izolacji kwasów nukleinowych – proteinazy K oraz mutanolizyny. Jako kontrole stosowano próby bez enzymu. Po zakończonej izolacji wykalibrowano otrzymane DNA w zakresie od 10^{-1} do 10^{-9} μg/μl i poddano testowi PCR.