

Lp. w zał. do Rozporządzenia MRiRW: 58.

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

Kierownik zadania: *dr K. Treder*

Głównym celem niniejszego projektu jest opracowanie czułych metod wykrywania wirusa *Y ziemniaka* (PVY), wirusa *M ziemniaka* (PVM) oraz wirusa *liściozwoju ziemniaka* (PLRV) w bulwach, kielkach i liściach roślin ziemniaka. 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 kielkach 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.

#### Materiały i metody:

Temat badawczy 1. Opracowano sposób wytwarzania mikrosfer magnetyczno-krzemionkowych i osadzenia na ich powierzchni przeciwciał specyficznych wobec PVY, PVM i PLRV. Opracowane mikrosfery porównano z komercyjnymi mikrosferami dedykowanymi do wiązania przeciwciał. Przygotowano rozcieńczenia soku z liści roślin porażonych badanymi wirusami oraz z roślin zdrowych (kontrola negatywna). Cząstki wirusa zagęszczono na mikrosferach magnetycznych z 1 ml rozcieńczeń i wykonano test ELISA. Porcje 0,1 ml tych samych rozcieńczeń bezpośrednio analizowano za pomocą DAS-ELISA.

Temat badawczy 2. Wyszczono w polu zdrowe bulwy odmian Irys, Korona, Quincy, Rosalind i Zeus. Na początku września zebrano i ponumerowano bulwy. Po czterech tygodniach przechowywania z bulw pobrano fragment tkanki przystolonowej, który badano za pomocą koktajl-ELISA. Z tych samych bulw wycięto oczka do próby oczkowej oraz oczka do badania kielków. Kielki badano za pomocą DAS-ELISA i koktajl-ELISA. Liście roślin z próby oczkowej badano za pomocą DAS-ELISA.

Temat badawczy 3. Porównanie prowadzone było przez niezależnych wykonawców. Każdy wykonawca badał co najmniej 3 rody lub odmiany ziemniaka. Zdrowe sadzeniaki wyszczono na polu. Spod krzaków pobrano bulwy. Wykonano koktajl-ELISA bezpośrednio w ekstraktach z bulwach oraz wycięto oczka do uzyskania kielków i roślin potomnych do wykonania próby oczkowej. Kielki i rośliny z prób oczkowych oceniano za pomocą DAS-ELISA.

Temat badawczy 4. Opracowano startery do wykrywania PLRV i porównano czułości wykrywania PLRV za ich pomocą optymalizując dla PLRV metodykę wg Zacharzewska i in. (2014). Czułość badano dla starterów L2, L4, L5 i L6 oraz starterów literaturowych (Singh i in., 1995) stosując rozcieńczenia RNA izolowanego z zainfekowanych roślin. Oceniono skuteczności wykrywania PVY w roślinach *in vitro* za pomocą SC-RT-PCR. Rośliny infekowano mechanicznie wirusem PVY. RNA izolowano wg Zacharzewska i in. (2014) oraz za pomocą komercyjnego zestawu. W badanych roślinach nie wykryto PVY za pomocą standardowego RT-PCR. Dlatego wykonano dodatkowo detekcję za pomocą RT-PCR w czasie rzeczywistym. Badanie to wykonano w Interdyscyplinarnym Centrum Nowoczesnych Technologii Uniwersytetu Mikołaja Kopernika w Toruniu.

Temat badawczy 5. Startery projektowano za pomocą programu LAMP Designer (Premier Biosoft). W celu porównania czułości wykrywania PVY, RNA izolowane z roślin doprowadzono do 100 pg/1µl i seryjnie rozcieńczono do 10 fg/1µl. Po 1 µl takich rozcieńczeń dodano do mieszaniny reakcyjnej RT-LAMP i wykonywano reakcję w 65°C przez 30 min. Procedurę izolacji RNA na krzemionce (Zacharzewska i inni 2014) optymalizowano do wykonania w warunkach polowych. W tym celu krzemionkę zastąpiono mikrosferami magnetycznymi. Opracowano skrócone warianty, w których pominięto etap przemywania acetonem oraz suszenia osadu.

#### Wyniki i dyskusja:

Temat badawczy 1. Wytworzono mikrosfery o dobrych właściwościach magnetycznych i dyspersyjnych, jednak procedura wiązania przeciwciał na ich powierzchni była mało wydajna, związano 80 µg przeciwciał na 1 mg mikrosfer. Komercyjne mikrosfery posiadają zdolność do

wiązania ok 7 mg przeciwciał na 1 mg mikrosfer. Tą różnicą, w zdolności do wiązania przeciwciał przez mikrosfery wytworzone oraz komercyjne, tłumaczyć można różnice w uzyskanych wynikach. Gdy magnetyczny test ELISA wykonano na wytworzonych mikrosferach, w ogóle nie wykryto PVY i PVM a wartości uzyskane dla PLRV były niskie, choć wystarczająco wysokie by wykryć wirus nawet w 1000 razy rozcieńczonym soku. Z wykorzystaniem komercyjnych mikrosfer wykryto badane wirusy we wszystkich rozcieńczeniach. Ponadto wartości absorbancji uzyskane dla 1000 razy rozcieńczonych soków z roślin porażonych, były bardzo wysokie.

Temat badawczy 2. Stwierdzono związek pomiędzy odpornością odmian na PVY a wykrywalnością tego wirusa w bulwach. Im wyższy stopień odporności odmian, tym większa rozbieżność wyników wykrywania PVY w bulwach i w próbie oczkowej.

Temat badawczy 3. W bieżącym roku żaden z wykonawców nie wykrył w badanym materiale obecności PLRV. Również PVM w ogóle nie został wykryty przez jednego z wykonawców a w badaniach Wykonawcy II wykryto go tylko w 8 roślinach na 90 badanych. PVY również występował nielicznie. W badaniach wykazano niską skuteczność wykrywania PVY bezpośrednio w bulwach. Testowanie kielków przez wszystkich wykonawców dawało dobrą zgodność z próbą oczkową, niezależnie od tego, czy wykonano je testem koktajlowym, czy DAS ELISA.

Temat badawczy 4. Opracowano startery (L2, L4, L5, L6), które porównano ze starterami wg Singh i inni. (1995). Najwyższą czułość uzyskano stosując startery L2. Oceniano również skuteczności wykrywania PVY w roślinach *in vitro* za pomocą SC-RT-PCR. Doświadczenie powtarzano kilkakrotnie, ponieważ nie wykrywano PVY w badanych roślinach. Dlatego ostatnią serię roślin przebadano za pomocą testu RT-PCR w czasie rzeczywistym. RNA izolowano na krzemionce wg Zacharzewska i in. (2014) oraz za pomocą komercyjnego zestawu. W obu przypadkach uzyskano taką samą skuteczność wykrywania PVY, przy czym stosując izolację na krzemionce wirusa wykrywano przy mniejszej liczbie cykli niż dla RNA izolowanego za pomocą komercyjnego zestawu.

Temat badawczy 5. Zaprojektowano trzy zestawy starterów (Y2, Y4 i Y5) i porównano skuteczność i czułość wykrywania PVY za ich pomocą i za pomocą starterów literaturowych. Spośród badanych starterów najwyższą czułość detekcji umożliwiły startery Y4. Dla tych starterów optymalizowano izolację RNA do warunków polowych. Zastosowano statyw magnetyczny oraz opracowano uproszczoną metodę izolacji RNA na mikrosferach magnetycznych. Wykazano, że zastosowany układ buforowy oraz skrócona do kilku minut (8-20) procedura izolacji RNA pozwala na skuteczne wykrycie PVY w próbach zawierających 10 pg całkowitego RNA. Nieznacznie dłuższa procedura pozwoliła na wykrycie PVY w 1 pg całkowitego RNA.