

Inokulacja sokiem z ponad 95% roślin ziemniaka wywołała na roślinach testowych objawy chorobowe charakterystyczne dla ToTV. Technika IC/real-time RT-PCR wykonana z roślin testowych potwierdziła obecność wirusa w ponad 90% prób. Z tych samych roślin wykonano test RT-PCR, uzyskany produkt klonowano i sekwencjonowano. Sekwencje porównano z sekwencją wirusa użytego w badaniach oraz sekwencjami zdeponowanymi w Banku Genów i uzyskano podobieństwo nukleotydowe pomiędzy nimi na poziomie 98-99%. Przy wykrywaniu ToTV techniką IC/Real-time RT-PCR bezpośrednio w tych samych roślinach ziemniaka tylko 10% prób dało pozytywny wynik. Można to wytłumaczyć negatywnym wpływem soku ziemniaka, zarówno na serologiczne wyłapywanie cząstek wirusa, jak i na przebieg reakcji real-time RT-PCR.

Wirus nekrozy pomidora (ToTV) ze względu na stosunkowo dużą podatność odmian na niego i jego zdolność do przenoszenia się z bulwami ziemniaka może stanowić potencjalne zagrożenie dla tej rośliny, szczególnie w cieplejszym klimacie, gdzie w warunkach polowych może występować mączlik, jego bardzo efektywny wektor.

## LITERATURA

1. Alfaro-Fernandez A., Cordoba-Selles C., Cebrian-Mico M. C. 2006. Necrosis del tomate: "torrao" o "cribado". – Bol. Sanid. Veget. Plag. 2: 545-562
2. Amari K., Gonzales-Ibeas D., Gomez P., Sempere R. N., Sanchez-Pina A., Aranda M., Diaz-Pendon J. A., Navas-Castillo J., Blanca J., Hernandez-Gillardo M. D., Anastasio G. 2008. Tomato torrado virus is transmitted by *Bemisia tabaci* and infects pepper and eggplant in addition to tomato. – Plant Dis. 92: 1139
3. Pospieszny H. 2005. Preliminary study on the spherical virus transmitted by greenhouse whitefly (*Trialeurodes vaporariorum*). [In:] 2<sup>nd</sup> Join Conf. Work Group Legume Veget Virus. Fort Lauderdale, Florida, USA, April, 10-14 2005. Abstr.: 30
4. Pospieszny H., Borodynko N., Obrepalska-Stepłowska A., Hasiów B. 2007. The first report of tomato torrado virus in Poland. – Plant Dis. 91: 1364
5. Verbeek M., Dulleman A.M., van der Heuvel J. F. J. M., Maris P. C., van der Vlugt R. A. A. 2007. Identification and characterization of tomato torrado virus, a new plant picorna-like virus from tomato. – Arch. Virol 152: 881-890

## OPTIMALIZACJA WYKRYWANIA WIRUSÓW ZIEMNIAKA ZA POMOCĄ RT-PCR

*dr Krzysztof Treder, mgr inż. Bogumiła Zacharzewska*

*IHAR – PIB, Pracownia Diagnostyki Molekularnej i Biochemii w Boninie*

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

Od ponad dwudziestu lat prowadzone są badania nad wykrywaniem wirusów za pomocą RT-PCR. Test ten nie znalazł dotąd szerokiego zastosowania w rutynowej diagnostyce wirusów ziemniaka. Istnieje silne zapotrzebowanie na wiarygodne procedury i zestawy do wykrywania wirusów bezpośrednio w ekstraktach z bulw. Teoretycznie RT-PCR mógłby być w takim celu stosowany. Jednak nadal porażenie bulw wirusami ocenia się za pomocą prób oczkowych. Przyczyną tego stanu rzeczy jest niska wiarygodność wyników uzyskiwanych w

teście RT-PCR. Częstym problemem jest kontaminacja laboratorium diagnostycznego produktem reakcji, prowadząca do fałszywie pozytywnych wyników. Ponadto porównanie wykrywania wirusa Y ziemniaka za pomocą próby oczkowej z czułością RT-PCR wykazało, że obie metody zdiagnozowały zbliżoną liczbę porażen wirusem (Bolotowa i in. 2009). Na czułość testu duży wpływ ma metoda izolacji RNA (Zacharzewska i in. 2014) oraz warunki, w jakich prowadzone są reakcje odwrotnej transkrypcji i łańcuchowej polimeryzacji. Istotny wpływ ma również dobór starterów specyficznych dla badanych wirusów.

W celu zwiększenia czułości wykrywania wirusów ziemniaka za pomocą RT-PCR w Pracowni Diagnostyki Molekularnej i Biochemii w Boninie opracowano szereg starterów do wykrywania wirusów Y, M oraz liściozwoju ziemniaka. Wstępne wyniki świadczą o tym, że dokładna optymalizacja warunków RT-PCR pozwala na zwiększenie czułości wykrywania tych wirusów i może prowadzić do opracowania skutecznej procedury ich wykrywania w ekstraktach z bulw ziemniaka.

## LITERATURA

1. Bolotova Y. V., Karasev A. V., McIntosh C. S. 2009. Statistical analysis of the laboratory methods used to detect potato virus Y. – Am. J. Potato Res. 86: 265-271
2. 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. Doi: 10.1007/s12230-014-9383-y

## PRODUKCJA MINIBULW Z ROŚLIN *IN VITRO* I MIKROBULW W WARUNKACH POLOWYCH

*dr inż. Sławomir Wróbel*

*IHAR – PIB, Pracownia Nasiennictwa Ziemniaka w Boninie  
e-mail: wrobel@ziemniak-bonin.pl*

**M**inibulwy to plon bulw wielkości od 10 do nawet 50 mm, pochodzący z pierwszego pokolenia roślin *in vitro* lub mikrobulw. Minibulwy produkuje się najczęściej w szklarniach, namiotach foliowych lub siatkowych. Sposób ten pozwala na szybkie wyprodukowanie materiału nasiennego wybranej odmiany. Dotychczasowa produkcja w kontrolowanych warunkach zapewnia wysoką zdrowotność zbieranych bulw, ale generuje również wysokie koszty. Innym rozwiązaniem jest sadzenie mikrobulw i roślin *in vitro* bezpośrednio w warunkach polowych, co eliminuje konieczność posiadania wyżej wymienionych obiektów. Jednakże delikatność materiałów z *in vitro* stwarza ryzyko związane z ich przeżywalnością, szczególnie w początkowym okresie wzrostu. Przeprowadzone na ten temat badania miały na celu określenie możliwości rozmnażania materiałów z *in vitro* bezpośrednio w warunkach polowych. Oceniano plonowanie oraz porażenie PVY, PVM i PLRV bulw potomnych z roślin wyrosłych bezpośrednio z roślin *in vitro*, mikrobulw, minibulw, i dla porównania – z sadzeniaków tradycyjnych, sadzonych w polu w różnych terminach.

Badania prowadzono w latach 2006-2012 na dwóch odmianach o zróżnicowanej odporności na wirusy, wysadzając materiały nasienne bezpośrednio w polu w III dekadzie kwietnia (2. termin sadzenia). W latach 2010-2012 oceniano dodatkowo wpływ wcześniejszego (1.