

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

Cel zadania: Głównym celem zadania jest opracowanie czułych metod immunologicznych i molekularnych, które umożliwią wykrywanie najważniejszych wirusów infekujących ziemniaki w różnych organach roślin ziemniaka. Opracowane metody mają służyć zarówno rutynowej diagnostyce, jak i szybkiemu potwierdzeniu lub wykluczeniu infekcji. Cele szczegółowe w 2015 roku obejmowały: (I) przygotowanie materiałów do immunokoncentracji PVY z większych objętości soku, (II) zbadanie, czy odporność odmian wpływa na wykrywalność wirusów bezpośrednio w bulwach, (III) ocena przydatności kielków do wykrywania wirusów, (IV) warunków reakcji RT-PCR dla wirusa PVM (V) porównanie czułości wykrywania PVY za pomocą testu RT-LAMP z czułością testów paskowych, DAS-ELISA oraz RT-PCR oraz analiza wyników pod kątem oceny w/w metod do szybkiego wykrywania wirusów 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 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.

Temat badawczy 1.

Materiały i metody. Mikrosfery aktywowano wprowadzając na ich powierzchnię grupy hydroksylowe oraz aminowe. Przeciwciała modyfikowano i wiązano z mikrosferami. Mierzono koncentrację przeciwciał przed i po wiązaniu za pomocą metody BCA.

Wyniki i dyskusja. Mikrosfery posiadające na swojej powierzchni grupę aminową związały ok. 36 µg IgG/mg mikrosfer. Podobną wydajność wiązania z tego typu mikrosferami uzyskano w ubiegłym roku. Istotnie lepszą wydajność wiązania uzyskano dla mikrosfer z grupą hydroksylową – 0,79 mg IgG/mg mikrosfer.

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. Źródłem wirusów były wtórnie porażone rośliny. Na początku września zebrano bulwy spod każdej rośliny. Po czterech tygodniach przechowywania w część stolonową bulw badano za pomocą DAS-ELISA. Z tych samych bulw wycięto oczka do próby oczkowej oraz do badania kielków. Uzyskane kielki i potomne rośliny (liście) badano za pomocą DAS-ELISA.

Wyniki i dyskusja. Zastosowanie infektorów pozwoliło na uzyskanie wysokiej presji wirusem PVY i PVM. Poziom porażenia PVY był generalnie wyższy od PVM, co może świadczyć o tym, że PVY był efektywniej przenoszony przez mszyce niż PVM. Poziom porażenia PLRV, był bardzo niski, nie przekraczał 20-30% dla odmian umiarkowanie podatnych, co świadczy o słabej efektywności przenoszenia przez populacje mszyc obecne na polu w 2015 roku. W odmianach odpornych wykrywalność wirusów PVY i PVM w bulwach, porównywana z wynikami próby oczkowej, spadała w większym stopniu niż w kielkach. Jest to szczególnie wyraźne dla PVY. Dla tego wirusa spadek wykrywalności w bulwach był wprost proporcjonalny do wzrostu odporności, podczas gdy wykrywalność w próbce oczkowej i w kielkach obniżała się sigmoidalnie. W przypadku PLRV wydaje się, że wykrywalność w bulwach jest podobna do próby oczkowej, niezależnie od poziomu odporności odmian.

Temat badawczy 3.

Materiały i metody. Trzy niezależne laboratoria (Wykonawcy I-III) wykonały badanie porównujące test DAS-ELISA na kielkach z testem koktajl-ELISA na bulwach i z próbą oczkową. Zdrowe sadzeniaki wysadzono na polu w obecności infektorów wirusów i zbierano bulwy potomne. Po 4 tygodniach bulwy badano za pomocą koktajl-ELISA. Następnie z bulw otrzymywano kielki i rośliny potomne (próba oczkowa), które badano testem DAS-ELISA. Wykonano również doświadczenie testujące, czy RT-PCR w czasie rzeczywistym można adaptować do wykrywania wirusa Y ziemniaka bezpośrednio w bulwach. Z bulw trzech umiarkowanie podatnych odmian ziemniaka izolowano RNA i wykonano test RT-qPCR. Te same bulwy badano za pomocą próby oczkowej, DAS-ELISA na kielkach oraz DAS-ELISA na ekstraktach z bulw.

Wyniki i dyskusja. W 2015 roku żaden z Wykonawców nie wykrył w badanym materiale obecności PLRV. Porażenie PVM, oceniane próbą oczkową było niskie. Wyniki z 2015 roku potwierdzają dobrą skuteczność wykrywania PVM bezpośrednio w bulwach i w kielkach, obserwowaną w ubiegłych latach. Porażenie wirusem Y było wysokie u wszystkich wykonawców. Wykonawcy I-II potwierdzili niską skuteczność wykrywania PVY bezpośrednio w bulwach. Była ona natomiast wysoka u Wykonawcy III. Podobnie jak w przypadku PVY, wyniki testowania kielków były zgodne z próbą oczkową. W 2015 r. wykonano badanie przydatności RT-qPCR do wykrywania wirusów bezpośrednio w bulwach. Wbrew oczekiwaniom, test ten był kilkakrotnie mniej skuteczny niż próba oczkowa i badanie kielków oraz dwukrotnie mniej skuteczny niż badanie bulw testem ELISA. Uzyskany wynik świadczy najprawdopodobniej o tym, że konieczne jest podjęcie prac nad opracowaniem metody izolacji RNA z bulw ziemniaka.

Temat badawczy 4.

Materiały i metody. Dla konserwatywnych regionów genomu PVM zaprojektowano trzy pary starterów (M1-3), które testowano w reakcji RT-PCR i porównywano do starterów literaturowych.

Wyniki i dyskusja. Badane startery porównywano ze starterami CH opublikowanymi przez Croslin i Hamlin (2011). Pary M1, M2 oraz CH promowały amplifikację produktu PCR o długości zgodnej z przewidywaną. Natomiast dla pary M3 nie obserwowano powstawania produktu reakcji PCR. Dlatego wykluczono tę parę z dalszych prac. Czułość zaprojektowanych starterów M1 i M2 porównywano z czułością starterów CH. Na podstawie wykonanych badań, stwierdzono, że optymalną parą starterów do wykrywania PVM jest para M2.

Temat badawczy 5.

Materiały i metody. Porównanie czułości prowadzono na rozcieńczeniach soków uzyskanych z liści roślin ziemniaka zainfekowanych PVY i z roślin zdrowych (kontrola negatywna). Soki rozcieńczano za pomocą buforu fosforanowego w zakresie od 10 razy do 1 000 000 razy. Każde rozcieńczenie badano za pomocą testów paskowych, DAS-ELISA, RT-PCR i RT-LAMP.

Wyniki i dyskusja. Stosując testy immunologiczne (DAS-ELISA, testy paskowe) można było wykryć PVY w sokach rozcieńczonych od 10 do 500-krotnie. Czułość testu RT-PCR była 100-krotnie wyższa, za jego pomocą wykryto PVY w soku 50 000-krotnie rozcieńczony. Test RT-LAMP był 1000 razy bardziej czuły niż metody immunologiczne i 10-krotnie czulszy niż RT-PCR. Końcowe rozcieńczenie soku, w którym wykryto PVY tą metodą wynosiło 500 000 razy.

Analizując krzywe annealingu produktu RT-LAMP, stwierdzono, że test oprócz wysokiej czułości, pozwala również różnicować serotypy „O” i „N” wirusa.