



Wykorzystanie metody Real-Time PCR do identyfikacji wirusa M ziemniaka w roślinie.

B. Tatarowska, B. Flis, I. Wasilewicz-Flis

Instytut Hodowli i Aklimatyzacji Roślin – PIB, Oddział w Młochowie
ul. Platanowa 19, 05-831 Młochów

Wprowadzenie i cel pracy

Analiza stanu zagrożenia poszczególnymi wirusami ziemniaka w Polsce wskazuje na coraz większe znaczenie wirusa M ziemniaka (*Potato virus M*, PVM). Uprawa odmian ziemniaka o niskiej odporności na ten wirus nastręcza wiele trudności w produkcji nasiennej (Kostiw i Robak 2010). Na rynku brakuje form posiadających wysoki poziom odporności na PVM. Wirus ten występuje we wszystkich rejonach uprawy ziemniaka, ale znaczenie ekonomiczne ma głównie w Europie Wschodniej i Południowo-Wschodniej. Straty w plonie bulw powodowane przez PVM mogą wynosić średnio 30%, a w skrajnych przypadkach nawet 75% (Kostiw 2011). W celu oceny fenotypowej odporności na wirus M ziemniaka stosuje się w IHAR – PIB oddział Młochów powszechnie dwie metody oceny: inokulację mechaniczną i inokulację poprzez szczepienie (Wasilewicz-Flis 2001). Coraz częściej w badaniach nad wykrywaniem wirusów ziemniaka wykorzystuje się techniki molekularne: PCR lub RT-PCR (Singh i Nie 2003, Lorenzen i in. 2006, Belinda i in., 2012) lub RT-PCR w czasie rzeczywistym oraz ilościowy PCR (Agindotan i in. 2007, Mortimer-Jones i in. 2009). Protokoły Real-Time RT-PCR są obecnie standaryzowane dla różnych wirusów ziemniaka w kilku międzynarodowych laboratoriach (Boonham i in. 2000, Agindotan i in. 2007, Singh i in. 2012). Wielu badaczy stwierdza, że wyniki uzyskiwane przy zastosowaniu techniki Real-Time RT-PCR są bardziej wiarygodne i dokładne, niż wyniki uzyskiwane przy zastosowaniu testów ELISA. Celem niniejszej pracy było opracowanie metodyki i warunków reakcji Real-Time PCR dla wirusa M ziemniaka.

Materiał i metody

Do ustalenia metodyki oceny zawartości wirusa PVM metodą Real-Time PCR wytypowano 4 rody 4x oraz wzorce (odm. Gustaw – odporna i odm. Bzura – podatna). Rody wysadzano w szklarni do doniczek. W fazie 3-4 liści przeprowadzano zakażenia mechaniczne (szczep M_{55a}). Z każdego genotypu zakażano po 10 roślin i stosowano 2 kontrole. Następnie rośliny przenoszono do kamer z kontrolowaną temperaturą (20°C i 24°C). Po 4 tygodniach od zakażenia pobierano próbki liści ziemniaka, zamrażano w -80°C, a następnie izolowano z nich RNA. Izolację wirusowego RNA przeprowadzano za pomocą zestawu Total RNA Mini (A&A Biotechnology). W celu doczyszczczenia uzyskanego RNA ze śladów DNA genomowego, wyizolowane RNA oczyszczano za pomocą zestawu Clean-up RNA Concentrator (A&A Biotechnology). Odwrotną transkrypcję wykonano za pomocą zestawu TranScriba (A&A Biotechnology), z użyciem startera dN-heksamer. W celu porównania ilości wirusowego RNA w badanych próbach, przeprowadzano reakcje Real-Time PCR amplifikując fragment cDNA uzyskany na bazie RNA wirusa PVM, a także fragment cDNA dla genu referencyjnego (18SrRNA). Po przeprowadzeniu reakcji Real-Time PCR i analizie uzyskanych wyników jako gen referencyjny wybrano gen 18SrRNA – uzyskane sygnały w Real-Time PCR (wartości Ct) były najbardziej zbliżone do siebie.

Tabela 1. Analiza RNA wirusa PVM – skład mieszaniny reakcyjnej.

RT 2x HS-PCR Master Mix Sybr A	10 µl
Starter PVM-F 10 µM 5'-AAG AAA GCT GAA ACT GCC AAA GA-3'	0,4 µl
Starter PVM-R 10 µM 5'-CCG CTC TCG CAG GAA TTC TCG-3'	0,4 µl
cDNA	0,5 µl
Woda	8,7 µl

Tabela 2. Analiza RNA wirusa PVM - profil temperaturowo-czasowy.

95°C, 3 min	wstępna denaturacja	x40
95°C, 15 s	denaturacja	
65°C, 30s	przyłączanie starterów, wydłużanie produktu PCR	
Odczyt fluorescencji		
65°C > 95°C	wyznaczanie krzywej topnienia produktu PCR poprzez pomiar fluorescencji w różnych temperaturach	

Tabela 3. Analiza RNA 16SrRNA ziemniaka – skład mieszaniny reakcyjnej.

RT 2x HS-PCR Master Mix Sybr A	10 µl
Starter 18SrRNA-F 10 µM 5'-GGG CAT TCG TAT TTC ATA GTC AGA G-3'	0,4 µl
Starter 18SrRNA –R 10 µM 5'-CGG TTC TTG ATT AAT GAA AAC ATC CT-3'	0,4 µl
cDNA	0,5 µl
Woda	8,7 µl

Tabela 4. Analiza RNA 16SrRNA ziemniaka – profil temperaturowo-czasowy.

95°C, 3 min	wstępna denaturacja	x40
95°C, 15 s	denaturacja	
68°C, 30s	przyłączanie starterów, wydłużanie produktu PCR	
Odczyt fluorescencji		
65°C > 95°C	wyznaczanie krzywej topnienia produktu PCR poprzez pomiar fluorescencji w różnych temperaturach	

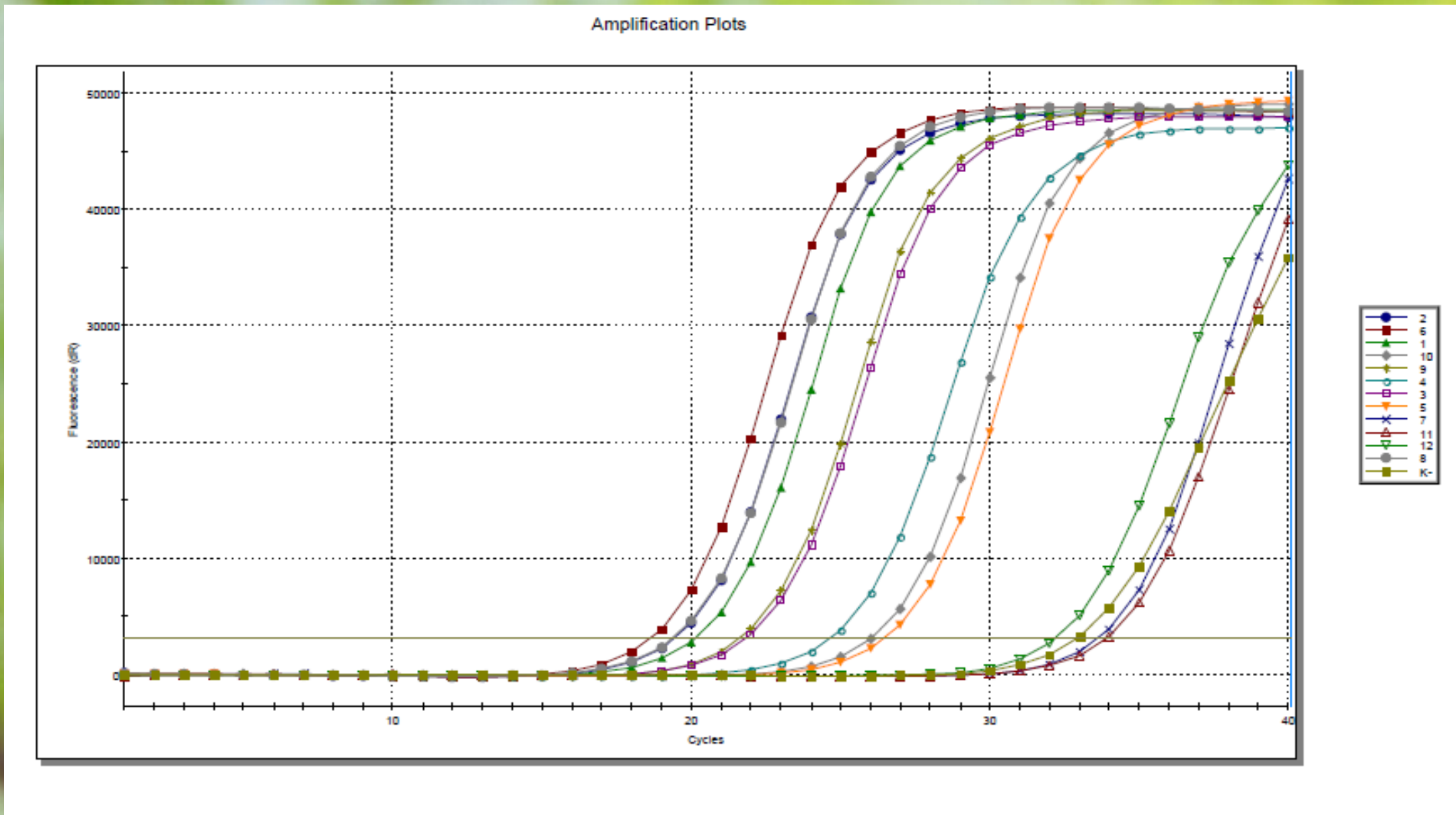
Wyniki i wnioski

Otrzymane wyniki przedstawiono jako stosunek ilości kopii cDNA (a zatem też mRNA) PVM na jedną kopię cDNA (mRNA) 18SrRNA ziemniaka (tab. 5). Stosunek ten liczono wg wzoru: $W^{CH8SrRNA}/W^{CPVM}$ (gdzie: Ct- cycle treshold; W- wydajność reakcji). Uzyskane wyniki wykazały duże zróżnicowanie w zawartości wirusa M ziemniaka w liściach. Zawartość wirusa M w roślinie w dużym stopniu zależała od genotypu i rodzaju temperatury, w której inkubowano zakażane rośliny ziemniaka. Opracowanie metodyki i warunków reakcji Real-Time PCR dla wirusa M ziemniaka pozwoli z sposób bardziej wiarygodny i dokładny określać zawartość wirusa w próbkach roślinnych. Ustalone warunki reakcji Real-Time PCR dla wirusa M ziemniaka i genu referencyjnego 18SrRNA przedstawiono w tabelach 1-4.

Tabela 5. Stosunek ilości kopii RNA wirusa M na jedną kopię genu referencyjnego 18SrRNA ziemniaka.

Genotyp	$W^{CH8SrRNA}/W^{CPVM}$
1. 14-II-76 (20°C)	1.54E-02
2. 14-II-76 (24°C)	4.26E-02
3. 14-II-114 (20°C)	4.49E-03
4. 14-II-114 (24°C)	5.95E-04
5. 14-II-48 (20°C)	9.39E-05
6. 14-II-48 (24°C)	4.42E-02
7. Bzura (20°C)	4.18E-02
8. Bzura (24°C)	3.25E-02
9. 14-II-56 (20°C)	3.96E-03
10. 14-II-56 (24°C)	1.70E-04
11. Gustaw (20°C)	Nie wykryto RNA wirusa
12. Gustaw (24°C)	Nie wykryto RNA wirusa

Krzywa amplifikacji ocenianych próbek i wzorców.



Literatura
Agindotan Bright O., Patrick J. Shiel, and Philip H. Berger. 2007 Simultaneous detection of potato viruses, PLRV, PVA, PVX and PVY from dormant potato tubers by TaqMan® real-time RT-PCR. *Journal of Virological Methods* 142 (1): 1-9.
Belinda A., Cox R., Jones A.C. 2012. Effects of tissue sampling position, primary and secondary infection, cultivar, and storage temperature and duration on the detection, concentration and distribution of free viruses within infected potato tubers. *Australian Plant Pathol.* 41: 197-210.
Boonham, N., K. Walsh, R.A. Mumford, and I. Barker. 2000. Use of multiplex real-time PCR (TaqMan) for the detection of potato viruses. *EPPO Bulletin* 30: 427-430.
Kostiw M. 2011. Ocena zagrożenia plantacji nasiennej ziemniaka przez choroby wirusowe. *Więś Jutra* 150/151: 27-29.
Kostiw M., Robak B. 2010. Presja wirusów Y, M, S i liściozwoju ziemniaka w latach 2006–2008 w Boninie. *Biul. IHAR* 256: 141-151.
Lorenzen J.H., Pêche L.M., Godmestad N.C., Meacham F., Shiel P. 2006. A multiplex PCR assay to characterise Potato virus Y isolates and identify strain mixtures. *Plant Disease*. 90: 935-940.
Mortimer-Jones S.M., Jones M.G.K., Jones R.A.C., Thomson G., Dwyer G.J. 2009. A single tube, quantitative real-time RT-PCR assay that detects four potato viruses simultaneously. *Journal of Virological Methods* 161 (2): 289-296.
Singh M., Singh R.P., Fageria M.S., Nie X., Coffin R., Hawkins G. 2012. Optimization of a real-time RT-PCR assay and its comparison with ELISA, conventional RT-PCR and the grow-out test for large scale diagnosis of potato virus Y in dormant potato tubers. *American Journal of Potato Research* 90: 43-50.
Singh R. P. and X. Nie. 2003. Multiple virus and viroid detection and strain separation via multiplex reverse transcription- polymerase chain reaction. *Canadian Journal of Plant Pathology*. 25:127-134.
Wasilewicz – Flis L. 2001. Selekcja rodów hodowlanych odpornych na wirus M ziemniaka (PVM), w których odporność determinowana jest genami *Gm1* i *Rov*. Instytut Hodowli i Aklimatyzacji Roślin, Radzików, IHAR Monografie i rozprawy naukowe 10/2001: 49-51.

Przedstawione badania zostały sfinansowane w ramach badań podstawowych na rzecz Postępu Biologicznego w Produkcji Roślinnej w latach 2014-2020.