

Grupa wrażliwości	Kierunek użytkowania odmian	
	jadalne	skrobiowe
Podwyższona wrażliwość (4,1-6,0)	Bartek, Igor, Innovator, Krasa, Miłek, Stasia, Tetyda, Vineta, Viviana	---
Bardzo wrażliwe (>6,1)	---	---

Źródło: badania własne

WYKORZYSTANIE METODY REAL-TIME PCR DO IDENTYFIKACJI WIRUSA M ZIEMNIAKA W ROŚLINIE

dr Beata Tatarowska, prof. dr hab. Bogdan Flis, mgr Iwona Wasilewicz-Flis

IHAR-PIB Oddział w Młochowie, ul. Platanowa 19, 05-831 Młochów

e-mail: b.tatarowska@ihar.edu.pl

Analiza stanu zagrożenia poszczególnymi wirusami ziemniaka w Polsce wskazuje na coraz większe znaczenie wirusa M ziemniaka (*Potato virus M*, PVM). Uprawa odmian o niskiej odporności na ten wirus nastęrcza wiele trudności w produkcji nasiennej (Kostiwn, Ro-bak 2010). Na rynku brakuje form z wysokim poziomem odporności na PVM. Wirus ten występuje we wszystkich rejonach uprawy ziemniaka, ale znaczenie ekonomiczne ma głównie w Europie Wschodniej i Południowo-Wschodniej. Straty plonu bulw powodowane przez PVM mogą wynosić średnio 30%, a w skrajnych przypadkach nawet 75% (Kostiwn 2011). W polskiej hodowli odpornościowej w celu uzyskania form z podwyższoną odpornością na wirus M wykorzystuje się geny *Rm* i *Gm* (Świeżyński i in. 1981). Gen *Rm* pochodzi z dzikiego diploidalnego gatunku *Solanum megistacrolobum* i warunkuje odporność związaną z reakcją nadwrażliwości, która ujawnia się jedynie w obecności dotąd niepoznanych dodatkowych czynników genetycznych (Miętkiewska 1999).

Z gatunku *S. gourlayi* pochodzi gen *Gm*, który warunkuje wysoką odporność na infekcję wynikającą z ograniczonego namnażania i przemieszczania się wirusa (Waś i in. 1980). Odporność ta jest niezależna od szczepu PVM i przejawia się w szerokim zakresie temperatur. W formach rodzicielskich tworzonych w oddziale IHAR-PIB w Młochowie odporność na PVM warunkowana jest m.in. genem *Gm*, a jej źródłem w materiałach di- i tetraploidalnych był klon diploidalny DW 84-1457.

W celu oceny fenotypowej odporności na wirus M ziemniaka związanej z obecnością genów *Rm* i *Gm* stosuje się w Młochowie 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, 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 RT-PCR dla wirusa M ziemniaka.

Do ustalenia metodyki oceny zawartości wirusa PVM metodą Real-Time RT-PCR wytypowano 5 rodów 4x oraz wzorzec odporny (odmiana Gustaw). Rody wysadzano w szklarni do doniczek i w fazie 3-4 liści zakażano je mechanicznie (szczep M_{55a}). Z każdego genotypu zakażano po 10 roślin i stosowano 2 kontrole. Następnie rośliny przenoszono do kamer z kontrolowaną temperaturą (20 i 24°C). Po 4 tygodniach od zakażenia pobierano próbki liści ziemniaka, zamrażano je w -80°C, a następnie izolowano z nich RNA. Wirusowe RNA izolowano za pomocą zestawu Total RNA Mini (A&A Biotechnology). RNA eluowano przy użyciu jałowej wody wolnej od RNAz. W celu doczyszczania uzyskanego RNA ze śladów DNA genomowego wyizolowane RNA oczyszczano za pomocą zestawu Clean-up RNA Concentrator (A&A Biotechnology). RNA po oczyszczeniu eluowano jałową wodą wolną od RNAz. Odwrotną transkrypcję wykonano za pomocą zestawu TranScriba (A&A Biotechnology), z użyciem startera dN-heksamer.

W celu porównania ilości wirusowego RNA w badanych próbach przeprowadzono reakcje Real-Time PCR, amplifikując fragment cDNA uzyskany na bazie RNA wirusa PVM, a także fragment cDNA dla genu referencyjnego (18SrRNA). Na etapie projektowania eksperymentu wybrano cztery geny referencyjne ziemniaka (cox, 18SrRNA, lfl α , L2). Po przeprowadzeniu reakcji Real-Time PCR i analizie uzyskanych wyników jako gen referencyjny wybrano 18SrRNA – uzyskane sygnały w Real-Time PCR (wartości Ct) były najbardziej zbliżone do siebie. Uzyskane wyniki wykazały duże zróżnicowanie 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.

LITERATURA

1. Agindotan B. O., Shiel P. J., Berger P. H. 2007. Simultaneous detection of potato viruses PLRV, PVA, PVX and PVY from dormant potato tubers by TaqMan® real-time RT-PCR. – J. Virol. Meth. 142(1): 1-9
2. 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. – Austr. Plant Pathol. 41: 197-210
3. Boonham N. Walsh K., Mumford R. A., Barker I. 2000. Use of multiplex real-time PCR (TaqMan) for the detection of potato viruses. – EPPO Bull. 30: 427-430
4. Kostiw M. 2011. Ocena zagrożenia plantacji nasiennych ziemniaka przez choroby wirusowe. – Wieś Jutra 150/151: 27-29
5. Kostiw M., Robak B. 2010. Presja wirusów Y, M, S i liściozwoju ziemniaka w latach 2006–2008 w Boninie. – Biul. IHAR 256: 141-151
6. Lorenzen J. H., Piche L. M., Gudmestad N. C., Meacham T., Shiel P. 2006. A multiplex PCR assay to characterize Potato virus Y isolates and identify strain mixtures. – Plant Dis. 90: 935-940
7. Miętkiewska E. 1999. Współdziałanie dwóch typów odporności na wirus M ziemniaka (PVM), pochodzący od *Solanum gourlayi* i *S. megistacrolobum* w ziemniakach tetraploidalnych. – Biul. IHAR 209: 125-135
8. Mortimer-Jones S. M., Jones M. G. K., Jones R. A. C., Thomson G., Dwyer G. I. 2009. A single tube, quantitative real-time RT-PCR assay that detects four potato viruses simultaneously. – J. Virol. Meth. 161(2): 289-296
9. 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 Yin dormant potato tubers. – Am. J. Potato Res. 90: 43-50
10. Singh R. P., Nie X. 2003. Multiple virus and viroid detection and strain separation via multiplex reverse transcription- polymerase chain reaction. – Can. J. Plant Pathol. 25: 127-134
11. Świeżyński K. M., Dziewońska M. A., Ostrowska K. 1981. Inheritance of the resistance to Potato Virus M found in *Solanum gourlayi* Haw. – Genet. Pol. 22: 1-8
12. Waś M., Dziewońska M. A., Ostrowska K., Kowalska A. 1980. Reaction of *Solanum gourlayi* and its hybrids with *S. tuberosum* to Potato Virus M (PVM). – Phytopath. Z. 97: 186-191
13. Wasilewicz-Flis I. 2001. Selekcja rodów hodowlanych odpornych na wirus M ziemniaka (PVM), w których odporność determinowana jest genami Gm i Rm. Monogr. Rozpr. Nauk. 10. IHAR Radzików: 49-51

TERMOTERAPIA – SKUTECZNOŚĆ METODY W UWALNIANIU ROŚLIN OD WIRUSA S ZIEMNIAKA

inż. Danuta Sekrecka, mgr inż. Dorota Michałowska
IHAR-PIB Oddział w Boninie, e-mail: sekrecka@ziemniak-bonin.pl

Choroby wirusowe ziemniaka powodują degenerację plantacji nasiennych i wpływają na znaczne straty plonu. Największe zagrożenie stanowi wirus Y ziemniaka, który może powodować spadek plonu nawet o 50% (Chrzanowska 2000). Z kolei wirus S i M, które łatwo się rozprzestrzeniają, mogą powodować straty nawet 30% (Kostiw 2013). Infekcje wirusowe są poważnym zagrożeniem dla hodowli ziemniaka, gdyż ich koncentracja wzrasta w kolejnych pokoleniach bulw w wyniku rozmnażania wegetatywnego, a także dlatego, że są odporne na działanie zabiegów chemicznych. Dlatego też tak ważna jest eliminacja wirusów z zainfekowanych roślin ziemniaka (Faccioli 2001).

MATERIAŁY I METODY

Termoterapia. Bulwy trzech odmian: Birte, Paroli i Soraya porażone wirusem S ziemniaka wysadzono do doniczek z substratem torfowym i po wschodach umieszczono w fitotronie. Przez 4-6 tygodni rośliny były poddawane działaniu wysokiej temperatury: 37/33°C (dzień/noc), z zachowaniem 16-godzinnego fotoperiodu. W 5. tygodniu trwania termoterapii pobrano z roślin pąki kątowe i wyizolowano z nich merystemy. Z każdego genotypu merystemy izolowało 3 wykonawców (czynniki osobowe) i wyizolowano średnio po 100 merystemów. Z pąków kątowych izolowano merystemy wielkości 0,2-0,4 mm, a następnie umieszczano je pojedynczo w probówkach na pożywcę MS (Murashige, Skoog 1962) zestalonej agarą (0,4%), z dodatkiem kinetyny 0,04 mg/l i kwasu giberelinowego (GA₃) 0,1 mg/l. Prowadzono sukcesywne obserwacje wyszczepionych merystemów, usuwając ewentualne zakażenia grzybowo-bakteryjne. W miarę wzrostu i rozwoju merystemy przeszczepiano na świeżą pożywkę aż do uzyskania roślin in vitro.