

1. Tytuł zadania: **Badania nad regulatorową funkcją cząsteczek miRNA w przebiegu infekcji wirusami ziemniaka PVY i TRV (nr 95)**

2. Kierownik zadania: dr Zhimin Yin, IHAR-PIB, Oddział Młochów

Cel zadania: Celem pracy jest zdobycie podstawowej wiedzy na temat, które cząsteczki miRNA mogą być zaangażowane w reakcję roślin tytoniu na zakażenie wirusem PVY. Tytoń jest rośliną modelową i testową. Wyniki badań przyczynią się do postępu wiedzy o roli miRNA w interakcji ziemniak – wirusy ziemniaka.

W 2015 r. badano:

(a) wybór izolatów PVY do badań miRNA różniących się między sobą serologicznie, biologicznie i molekularnie.

Materiały i metody

Odmiany ziemniaka: King Edward, Desiree, Pentland Ivory (rekomendowane przez Singh et al. 2008) oraz odmiany Etola i Nicola. Odmianę Nicola użyto w celu sprawdzenia zdolności wywoływania choroby PTNRD (ang. potato tuber necrotic ringspot disease) przez badane izolaty. Używano również roślin tytoniu (*Nicotiana tabacum*) odmiany Samsun.

Izolaty PVY: 12/94, Wi, Gr99, Ditta, LW, 34/01, Ny. Izolaty te pochodziły z kolekcji PVY w IHAR-PIB Oddział Młochów, były przechowywane w temperaturze -20°C w liściach tytoniu odmiany Samsun. W celu uzyskania inokulum zakażano w szklarni po pięć roślin tytoniu każdym z izolatów. Ich czystość była sprawdzana testem ELISA z użyciem potrójnych przeciwciał. Oprócz poliklonalnych zastosowano 2 specyficzne monoklonalne: Y^N (Bioreba) rozpoznające PVY^{NTN} i Y^O (SASA) rozpoznające PVY^O. Tak sprawdzone źródła poszczególnych izolatów PVY użyto do zakażeń roślin pięciu odmian ziemniaka oraz tytoniu odmiany Samsun, po 10 roślin/izolat. Wszystkie rośliny zakażano w fazie 4-6 liści i utrzymywano w fitotronie w temperaturze 22°C i 14-godzinnym dniu. Przeprowadzono obserwacje symptomów porażenia: brak objawów, nekrozy lokalne, objawy systemiczne. Obecność wirusa w roślinach testowano za pomocą testu ELISA, trzema przeciwciałami (PVY^{all}, PVY^O, PVY^N), w trzech różnych terminach: 0 (termin kontrolny), 3 i 14 dni od daty zakażenia.

Reakcję RT-PCR (ang. reverse transcription PCR) przeprowadzono w celu potwierdzenia zakażenia roślin danym szczepem wirusa po ok. trzech tygodniach, kiedy na roślinach zakażonych pojawiły się silne objawy porażenia. Po wyizolowaniu wirusowego RNA przeprowadzono reakcję odwrotnej transkrypcji, a następnie reakcję PCR przy użyciu specyficznych starterów wg. Lorenzena, 2006 lub Chikh Ali, 2010.

Wyniki

Wszystkie testowane izolaty powodowały objawy na wzorcowych odmianach ziemniaka, King Edward, Desiree oraz Pentland Ivory: mozaiki, deformacje liści, zahamowanie wzrostu, nekrozy liści, nekrozy nerwów (Tabela 1). Odmiany te posiadają dominujące geny *Nc*, *Ny* i *Nz*, które warunkują reakcję nadwrażliwości, specyficzną dla szczepów PVY, tzn., *Nc:ny:nz* w odmianie King Edward, *nc:Ny:nz* w odmianie Desiree i *Nc:Ny:Nz* w odmianie Pentland Ivory (Singh et al. 2008). Wyniki naszych badań wskazują, że izolaty PVY 12/94, 34/01, Gr99, Nysa, LW, Wi oraz Ditta są wirulentne względem genów *Nc*, *Ny* i *Nz*.

W roślinach tytoniu (*Nicotiana tabacum*) odmiany Samsun izolaty 12/94, Ditta, Nysa oraz 34/01 powodowały nekrozy nerwów (ang. vein necrosis; VN), podczas gdy izolaty Gr99 i LW powodowały rozjaśnienia nerwów (ang. vein clearing; VCL).

Ocena nekroz na bulwach (PTNRD) została przeprowadzona na odmianie Nicola (Tabela 1). Izolaty 12/94 oraz Ditta powodowały PTNRD, natomiast izolaty Wi, LW oraz Gr99 nie powodowały nekroz. Dwa inne izolaty, Nysa i 34/01 powodowały nekrozy na bulwach.

W odmianie Etola izolaty Gr99, Ditta i Nysa powodowały nekrozy lokalne w miejscu zakażenia, silne objawy na górnych liściach (nieinokulowanych) oraz silne objawy PTNRD

w bulwach (Tabela 1). Izolaty LW i Wi nie wywoływały nekroz HR na liściach zakażanych i na bulwach nie zaobserwowano objawów PTNRD, natomiast wywoływały słabe objawy na liściach górnych. Izolat 34/01 powodował HR w liściach zakażanych i silne objawy w liściach górnych, ale nie wywołał objawów PTNRD w bulwach ziemniaka. Izolat 12/94 wywoływał tylko objawy HR na liściach zakażonych.

Tabela 1. Objawy porażenia roślin ziemniaka i tytoniu po zakażeniu różnymi izolatami PVY (2015)

Odmiana ziemniaka/ tytoniu	Izolaty PVY (w nawiasach numery w bazie NCBI GenBank)						
	12/94 (AJ889866)	Gr99 (AJ890343)	Ditta (AJ890344)	Nysa (FJ666337)	Wi (EF558545)	34/01 (AJ890342)	LW (AJ890349)
King Edward*	MO, DEF	MO, DEF	MO, def	MO, DEF	MO	MO	mo
Desiree*	MO	mo	mo	mo	mo	mo, D	mo
Pentland Ivory*	MO	st, MO, VN, D	MO, DEF	MO	n, nv, DEF, m, st, D,	MO	MO
Samsun (tytoń)	VN	VCL	VN	VN	VN	VN	VCL
Nicola*	MO, PTNRD,	MO P-	MO PTNRD,	MO P-	mo P-	MO, PTNRD	mo, P-
Etola	HR, Ø, P-	HR, SHR, NV, D PTNRD	HR, n, def, m PTNRD	HR, n, nv, D PTNRD	no HR m, nec P-	HR, N, VN, MO P-	no HR m, n P-

Objawy porażenia na liściach górnych (niezakażanych), z wyjątkiem HR (na liściach zakażanych). Słabe objawy opisano małymi literami. HR: reakcja nadwrażliwości, nekrotyzacja lokalnie w miejscu zakażenia. ST: zahamowanie wzrostu (ang. stunt); DEF: deformacja liści. VN: nekrozy nerwów (ang. vein necrosis). Ø: brak symptomów. N: nekrozy. MO: silna mozaika. VCL: rozjaśnienia nerwów (ang. vein clearing). PTNRD: nekrozy na bulwach (ang. potato tuber necrotic ringspot disease. P-: brak objawów PTNRD. D: zamieranie roślin 35 dni po inokulacji (ang. dying); *: Brak lokalnych nekroz HR.

Dyskusja

Rośliny sześciu odmian ziemniaka/tytoniu podległy zakażeniu siedmioma izolatami PVY, z wyjątkiem odmiany Etola izolatem 12/94, co oznacza, że odmiana ta posiada odporność typu HR na ten izolat PVY.

Trzy izolaty: 12/94, Gr99 i 34/01 charakteryzują się różną patogenicznością w stosunku do odmiany Etola i Nicola. Izolat 12/94 nie poraża odmiany Etola, powoduje nekrozy PTNRD w odmianie Nicola, nekrozy nerwów na liściach tytoniu odmiany Samsun. Izolat Gr99 powoduje PTNRD w Nicola, nie powoduje PTNRD na bulwach odmiany Etola, powoduje rozjaśnienie nerwów w tytoniu. Izolat 34/01 powoduje symptomy na liściach odmiany Etola, nie powoduje PTNRD w bulwach tej odmiany. Izolaty 12/94 i Gr99 są serotypu N, natomiast izolat 34/01 – serotypu O.

Na podstawie wyników do dalszych badań wybrano trzy izolaty: 12/94, Gr99 i 34/01, różniące się rodzajem wywoływanych objawów na odmianie Etola, Nicola i tytoniu odmianie Samsun.

(b) przydatność genów referencyjnych do oznaczania ekspresji genów w roślinach tytoniu porażonych PVY przy użyciu techniki RT-qPCR: PP2A, GAPDH, Nad5, EF1 α , EBQ3, GTP.

Materiały i metody

W 2015 r. przetestowano sześć różnych kandydujących genów referencyjnych stosowanych w badaniach interakcji wirus-roślina: PP2A, GAPDH, Nad5, EF1 α , EBQ3, GTP.

Wybrane izolaty PVY na podstawie wyników badań zadania 1, 12/94, Gr99 i 34/01, zostały wykorzystane do zakażenia roślin tytoniu, odmiany Samsun, po 15 roślin każdym izolatem. Kontrolą doświadczenia były rośliny tytoniu odmiany Samsun traktowane sterylizowaną wodą z dodatkiem karborundum w taki sam sposób jak rośliny zakażane.

Całkowite RNA izolowano z pięciu pojedynczych roślin każdej kombinacji (5 roślin niezakażanych, 5 roślin traktowanych wodą, 5 roślin zakażanych trzema wirusami (5 x 3)

w dwóch terminach po 3 i 14 dniach po inokulacji (po 25 roślin w każdym terminie, razem 50), przy użyciu zestawu do izolacji mirVana miRNA. Odwrotna transkrypcja została przeprowadzona przy użyciu zestawu TaqMan microRNA Reverse Transcription Kit (Applied Biosystems) trzykrotnie, w celu uzyskania dobrej jakości próbek do dalszych analiz. Poziom ekspresji sześciu kandydujących genów referencyjnych oznaczono przy użyciu techniki SYBR Green według Frazier et al. (2010) w termocyklerze Real-Time PCR (qPCR) System LightCycler 480 (Roche). Testowano różne rozcieńczenia DNA genów referencyjnych. Otrzymane dane posłużą do analizy ekspresji genów przy użyciu programu Statgraphics.

Wyniki

Efektywność starterów dla sześciu genów referencyjnych analizowano w kolejnych rozcieńczeniach cDNA, to jest rozcieńczonych 1x, 10x, 100x, 1000x, 4x, 16x i 64x. Efektywność licząco według wzoru $E \% = (10^{[-1/\text{slope}-1]}) \times 100$ wahała się od 97-114%, wskazując na właściwe dobranie starterów. Gen EF-1a nie podlegał ekspresji w badanych próbach.

Geny PP2A, GAPDH, Nad5, EBQ3, oraz GTP pokazywały pojedynczy pik w analizie krzywej topnienia, co oznacza wysoką specyficzność starterów.

Poziom ekspresji stwierdzono dla genów PP2A, GAPDH, Nad5, EBQ3 oraz GTP, z wartością progową C_p 22-27 cykli. Gen EF-1a nie podlegał ekspresji w badanych próbach.

Dyskusja

Metoda Real-time PCR (qPCR) pozwala na obserwację procesu powielania materiału genetycznego w czasie rzeczywistym, umożliwia szybkie i dokładne wykonanie pomiaru ilości materiału genetycznego obecnego w próbce. Podczas kolejnych etapów przygotowywania próby w celu oznaczenia liczby transkryptów badanych genów, może dochodzić do zmian ilości materiału genetycznego, których najczęstszą przyczyną jest różna wydajność izolacji mRNA oraz odwrotnej transkrypcji w poszczególnych próbach. Stąd potrzeba normalizacji wyników między analizowanymi próbkami, poprzez wykorzystanie genu referencyjnego. Gen referencyjny powinien charakteryzować się stałym, nieregulowanym poziomem ekspresji w danej tkance. Badania ekspresji genów referencyjnych wykazały jednak istniejące różnice w liczbie transkryptów w tkankach zdrowych i zmienionych chorobowo (Romanowski et al. 2007).

Jeden na sześć genów referencyjnych nie podlegał ekspresji w roślinach tytoniu zakażonych izolatami PVY. Geny PP2A, GAPDH, Nad5, EBQ3, oraz GTP pokazywały pojedynczy pik w analizie krzywej topnienia, co wskazuje, że produkty PCR są pojedyncze i specyficzne dla każdego genu. Wykazano również wystarczający poziom ekspresji dla genów PP2A, GAPDH, Nad5, EBQ3 oraz GTP. W celu znalezienia odpowiedniego genu referencyjnego do badań w kolejnym roku zostanie przetestowany zestaw sześciu kolejnych kandydujących genów referencyjnych, by wybrać najlepszy gen referencyjny do dalszych badań, na podstawie analizy statystycznej danych 12 badanych genówkandydujących.

Referencje

Chikh AM, Maoka T, Natsuaki KT, Natsuaki T, 2010. The simultaneous differentiation of *Potato virus Y* strains including the newly described strain PVY^{NTN-NW} by multiplex PCR assay. *J Virol Methods*. 2010 165(1):15-20.

Frazier TP, Xie F, Freistaedter A, Burklew CE, Zhang B. 2010. Identification and characterization of microRNAs and their target genes in tobacco (*Nicotiana tabacum*). *Planta*. 232:1289-1308.

Lorenzen JH, Piche LM, Gudmestad NC, Meacham T, Shiel P, 2006. A multiplex PCR assay to characterize *Potato virus Y* isolates and identify strain mixtures. *Plant Dis*. 90: 935-940.

Romanowski T, Markiewicz A, Bednarz N, Bielawski KP. 2007. Geny metabolizmu podstawowego jako geny referencyjne w ilościowym oznaczaniu ekspresji genów metodą real-time PCR. *Postępy Hig Med Dośw* 61: 500-510.

Singh RP, Valkonen JP, Gray SM, Boonham N, Jones RA, Kerlan C, Schubert J. 2008. Discussion paper: The naming of *Potato virus Y* strains infecting potato. *Arch Virol*. 153(1):1-13.