

KRZYSZTOF TREDER**MATEUSZ MIELCZAREK****ANNA PAWŁOWSKA****BOGUMIŁA ZACHARZEWSKA****MARIA FEDCZAK**

Instytut Hodowli i Aklimatyzacji Roślin — Państwowy Instytut Badawczy, Radzików, Oddział w Boninie, Pracownia Diagnostyki Molekularnej i Biochemii

Kierownik Tematu: dr Krzysztof Trederek Instytut Hodowli i Aklimatyzacji Roślin — Państwowy Instytut Badawczy, Radzików, Oddział w Boninie, Bonin 3, 76-009 Bonin, tel. 943423031 w. 207, e-mail: k.trederek@ihar.edu.pl

Prace zostały wykonane w ramach badań podstawowych na rzecz postępu biologicznego w produkcji roślinnej na podstawie decyzji Ministra Rolnictwa i Rozwoju Wsi nr HOR.hn.802.19.2018, Zadanie 58.

Opracowanie czułych metod wykrywania najważniejszych wirusów ziemniaka

Development of sensitive methods for detection of the most important potato viruses

Słowa kluczowe: test ELISA, RT-PCR, RT-LAMP, wirusy ziemniaka, wykrywanie, ziemniak

Sprawcami największych strat plonu w Polsce są: wirus ziemniaka Y (PVY, Y), wirus liściozwoju ziemniaka (PLRV, L) oraz wirus ziemniaka M (PVM, M). Głównym celem Zadania nr 58 jest opracowanie czułych metod wykrywania tych wirusów w różnych tkankach ziemniaka. Cel ten jest realizowany w postaci pięciu tematów badawczych: (I) Opracowanie i optymalizacja nowych metod wykrywania wirusów. (II) Ocena wpływu odporności odmian ziemniaka na skuteczność wykrywania wirusów w bulwach. (III) Badania nad wykrywaniem wirusów w bulwach i kielkach ziemniaka za pomocą koktajl i DAS ELISA. (IV) Adaptacja i optymalizację metod molekularnych do wykrywania wirusów w roślinach *in vitro*. (V). Opracowanie testów diagnostycznych do szybkiego wykrywania wirusów.

Zdrowotność sadzeniaków jest oceniana za pomocą tzw. próby oczkowej, która stanowi połączenie testu biologicznego z immunologicznym. Próba oczkowa polega na wycięciu fragmentów bulw z pojedynczymi oczkami, chemicznym przerwaniu ich spoczynku, podkiełkowaniu w 21°C w ciemności, a następnie wysadzeniu w szklarni

i wykonaniu testu DAS-ELISA wg Clark i Adams (1977) z użyciem soku z próbek liści pobranych z 4–6 tyg. roślin. Wykrywanie wirusów metodą ELISA prowadzone jest metodą pośrednią z roślin, ze względu na znaczący wzrost koncentracji cząstek wirusa w roślinach, co zwiększa szansę na wykrycie testem ELISA wirusów o bardzo niskiej koncentracji w bulwach. Bezpośrednie badanie bulw byłoby optymalne, jednak Hill i Jackson (1984) wykazali, że czułość testu ELISA jest za mała do wykrycia wirusów w bulwach. Podejmowano próby zwiększenia czułości tego testu. Wstępne wyniki wskazywały, że koktajlowa wersja testu umożliwia wykrywanie PVY i PLRV w bulwach (Treder i in., 2009). Wieloletnie badania prowadzone w ramach Zadania nr 58 wykazały, że test był wiarygodny jedynie dla PLRV i PVM. W przypadku PVY uzyskiwano zarówno wyniki zgodne z próbą oczkową, jak również wykazujące mniejszą skuteczność testu w porównaniu z próbą oczkową. W celu wyjaśnienia tej rozbieżności podjęto badania nad wpływem odporności odmian na skuteczność wykrywania wirusów w bulwach. Na podstawie dotychczas uzyskanych wyników stwierdzono, że wzrost odporności odmian ma negatywny wpływ na wykrywalność PVY. W celu zwiększenia czułości testu prowadzone są prace nad możliwością wykorzystania różnych metod zagęszczania cząstek wirusowych z większych objętości. Obiecujące wyniki uzyskano stosując cząstki magnetyczne pokryte przeciwciałami. Obecnie badana jest możliwość wykorzystania membran jonowymiennych w tym samym celu.

Alternatywą dla próby oczkowej może być test na kielkach opracowany dla PLRV przez Syllera (1988). W Zadaniu nr 58 prowadzone są prace nad wykrywaniem wirusów Y, M i L w tym organie. Potwierdzono dobrą zgodność wykrywania wirusów Y, M i L w kielkach z próbą oczkową. Do wykrywania w bulwach można także stosować testy molekularne — RT-PCR lub RT-LAMP, (Singh i in., 1995; Boonham i in., 2008). Koszt testów molekularnych można obniżyć zastępując komercyjne zestawy do izolacji RNA krzemionką (Zacharzewska i in., 2014) lub cząstkami magnetycznymi (Treder i in., 2018).

Metody molekularne mogą być również przydatne do oceny stanu zdrowia roślin wprowadzanych do kolekcji zasobów genowych ziemniaka. Taką kolekcję (Bank Genów Ziemniaka) posiada Pracownia Zasobów Genowych i Kultur *in vitro*, wchodząca w skład Oddziału IHAR — PIB w Boninie. Rutynowa ocena kolekcji na obecność wirusów wykonywana jest za pomocą ELISA. Koszt testu RT-PCR jest zbyt wysoki do oceny kolekcji. Można go obniżyć stosując multipleksowy wariant (m-RT-PCR) testu (Du i in., 2008). W ramach Zadania nr 58 opracowano wariant klasycznego m-RT-PCR do jednoczesnego wykrywania Y, M i L w tej samej próbce. Za pomocą opracowanego testu stwierdzono, że przebadane 150 genotypy ziemniaka z kolekcji podstawowej Banku Genów są wolne od wirusów Y, M i L. Dalsze usprawnienie testu wymaga opracowania m-RT-PCR w czasie rzeczywistym.

Rozwój metod izotermicznej amplifikacji kwasów nukleinowych umożliwił opracowanie metod diagnostycznych, które można wykonać poza laboratorium (Boonham i in., 2008). W ramach Zadania nr 58 opracowano szybki test fluorescencyjny RT-LAMP do wykrywania PVY (Przewodowska i in., 2015) oraz jego czulszy wariant, umożliwiający różnicowanie serotypów PVY (Treder i in., 2018) i kolorymetryczne wykrywanie wirusa poprzez obserwację zmiany barwy badanych prób (Treder i in.,

2017). Zmiana barwy była specyficzna dla prób RNA izolowanego z roślin z wirusem i nie zachodziła w próbach, do których dodawano RNA z roślin zdrowych. Opracowano również procedurę wykrywania wirusów Y, M i L za pomocą testu RT-LAMP bezpośrednio w soku z roślin, bez izolacji RNA. Metoda działała dobrze we fluorescencyjnej wersji RT-LAMP. W kolorymetrycznym RT-LAMP, zmiana barwy następowała zarówno po dodaniu do prób soku wyciśniętego z roślin z badanymi wirusami, jak i po dodaniu soku z roślin zdrowych.

Celem projektu w 2018 r. było: (I) opracowanie metody zagęszczania wirusów z większych objętości poprzez wiązanie cząstek wirusa na membranach jonowymiennych, (II) zbadanie, czy odporność odmian wpływa na wykrywalność wirusów bezpośrednio w bulwach, (III) ocena przydatności kielków do wykrywania wirusów, (IV) opracowanie multipleksowego RT-PCR w czasie rzeczywistym do wykrywania wirusów Y, M i L; (V) opracowanie metody przygotowania soków do RT-LAMP, eliminującej z soku czynniki wywołujące zmianę barwy błękitu hydroksynaftolowego (HNB).

W roku 2018 w ramach prac nad metodą zagęszczania wirusów z większych objętości na membranach jonowymiennych stwierdzono, że PVM wiązał się silnie a PLRV słabo ze złożem Q. Oba wirusy nie wiązały się ze złożem S. W skład populacji PVY wchodziły wiriony o słabym i silnym wiązaniu do złoża Q oraz o słabym i silnym wiązaniu do złoża S. Zagęszczanie cząstek wirusów na membranie Q miało pozytywny wpływ na wykrywanie PVY. Dla PVM zabieg ten zwiększał dwukrotnie czułość wykrywania wirusa, jednak negatywnie wpływał na wysokość absorbancji w teście ELISA. Zateżnienie cząstek wirusa nie powiodło się dla PLRV, prawdopodobnie z uwagi na słabe oddziaływanie tego wirusa ze złożem Q w zastosowanych warunkach. W 2018 r. w doświadczeniu polowym porażenie PVY było wysokie w porównaniu z ubiegłymi sezonami a porażenie PVM i PLRV bardzo niskie, podobnie jak w ubiegłych sezonach. Dla PVY potwierdzono wpływ odporności odmian na spadek wykrywalności wirusa w bulwach. Badając wykrywalność wirusów w bulwach i kielkach ziemniaka potwierdzono dobrą zgodność wykrywania wirusów w kielkach z próbą oczkową. Wyższą skutecznością wykazał się test koktajl ELISA niż DAS-ELISA dla kielków. Stwierdzono wyższą skuteczność wykrywania PVM bezpośrednio w bulwach niż za pomocą próby oczkowej. Test RT-qPCR był bardziej skuteczny w ocenie porażenia liści, kielków i bulw wirusem Y niż RT-LAMP i DAS-ELISA. Wyniki prac nad optymalizacją metod molekularnych do wykrywania wirusów w roślinach *in vitro* w 2018 r. potwierdziły, że pojedynczy RT-PCR w czasie rzeczywistym pozwalał na wykrycie wszystkich badanych wirusów. Multipleksowy test RT-PCR w czasie rzeczywistym do wykrywania wirusów Y, L i M wymaga dalszych badań. W roku 2018 wykazano, że stosując chloroform można wizualnie wykrywać PVY za pomocą kolorymetrycznego testu RT-LAMP z barwnikiem HNB bez izolacji RNA z badanych prób. Dodanie do prób alfa-kazeiny istotnie skracало czas wykrycia w próbach o niskiej koncentracji PVY. Czułość wizualnej detekcji z HNB była taka sama jak czułość wykrywania PVY za pomocą fluorescencyjnego testu RT-LAMP.

LITERATURA

- Boonham N., Glover R., Tomlinson J., Mumford R. 2008. Exploiting generic platform technologies for the detection and identification of plant pathogens. *Eur. J. Plant Pathol.* 121: 355 — 363.
- Clark M. F., Adams A. N. 1977. Characteristics of the microplate method of enzyme-linked immunosorbent assay for the detection of plant viruses. *J. Gen. Virol.* 34: 475 — 483.
- Du Z., Chen J. and Hiruki C. 2006. Optimization and application of a multiplex RT-PCR system for simultaneous detection of five potato viruses using 18S rRNA as an internal control. *Plant Disease* 90: 185 — 189.
- Hill S. A., Jackson E. A. 1984. An investigation of the reliability of ELISA as a practical test for detecting potato leafroll virus and potato virus Y in tubers. *Plant Pathol.* 33: 21 — 26.
- Przewodowska A., Zacharzewska B., Chołuj J., Treder K. 2015. A one-step, real-time reverse transcription loop-mediated isothermal amplification assay to detect Potato virus Y. *Am. J. Potato Res.*, 92: 303 — 311.
- Singh R. P., Kurz J, Boiteau G., Bernard G. 1995. Detection of potato leafroll virus in single aphids by the reverse transcription polymerase chain reaction and its potential epidemiological application. *J. Virol. Methods* 55: 133 — 43.
- Syller J. Detection of potato leaf roll virus in intact sprout disks by enzyme-linked immunosorbent assay. *Journal of Phytopathology*, 121: 58 — 64.
- Treder K., Chołuj J., Zacharzewska B., Babujee L., Mielczarek M., Burzyński A., Rakotondrafara A. 2018. Optimization of a magnetic capture RT-LAMP assay for fast and real-time detection of potato virus Y and differentiation of N and O serotypes. DOI:10.1007/s00705-017-3635-3, *Archives of Virology* 163: 447 — 458.
- Treder K., Chołuj J., Zacharzewska B., Mielczarek M. 2017. Detection of potato virus Y (PVY) by reverse-transcription loop-mediated nucleic acid amplification (RT-LAMP). *Plant Breed. Seed Sci.* 75: 77 — 85.
- Treder K., Przewodowski W., Barnyk A. 2009. Factors influencing detection of potato leafroll virus and potato virus Y in potato tuber extracts. *Plant Breed. Seed Sci.* 59: 65 — 74.
- 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.*, 91: 525 — 531.