

Małgorzata Jeżewska
Zakład Wirusologii i Bakteriologii, Instytut Ochrony Roślin – Państwowy Instytut Badawczy,
Poznań

**Poszukiwanie źródeł odporności u pszenic na wirus odglebowej mozaiki
zbóż (*Soil-borne cereal mosaic virus, SBCMV*)**

Sprawozdanie z prac wykonanych w 2008 roku

1. Cel pracy

- a) Ocena reakcji wybranych odmian pszenicy ozimej i pszenżyta ozimego na porażenie przez wirus odglebowej mozaiki zbóż (SBCMV)
- b) Adaptacja techniki real-time PCR (qPCR) do badań odporności pszenic na SBCMV
- c) Porównanie izolatów SBCMV pochodzących z różnych lokalizacji.

2. Materiał i metody

2.1. Materiał

Jako źródło inokulum do badań reakcji odmian stosowano podłoże infekcyjne zawierające mieszaninę izolatów SBCMV w obecności wektora glebowego *Polomyxa graminis*.

Odmiany żyta ozimego, podatne na porażenie przez SBCMV (Amilo, Dańkowskie Złote) wykorzystywano do namnażania izolatów do dalszych badań.

Odmiany i rody hodowlane pszenicy ozimej zostały wytypowane przez Hodowców, na podstawie uprzednio uzyskanych wyników badań. Do tej listy dodano również 4 odmiany pszenżyta ozimego. Wytypowano następujące odmiany pszenicy ozimej: Bogatka, Batuta, CHD 1378/02, Figura, Legenda, Muszelka, Ostroga, Smuga, Tonacja oraz pszenżyta ozimego: Grenado, Moderato, Pizarro i Woltario. Dodatkowo przyjęto do badań odmianę pszenicy Brilliant, ze względu na wcześniej potwierdzoną jej podatność na porażenie przez SBCMV, jako odmianę porównawczą.

Do badań zróżnicowania SBCMV wybrano następujące izolaty: SBCMV-Cer, SBCMV-Choryń, SBCMV-Chude, SBCMV-St, SBCMV-Żab.

2.2. Metody

A. Test TAS-ELISA

Korzystano z zestawu (immunoglobuliny, przeciwciała monoklonalne i koniugat) produkcji firmy Loewe (Niemcy)

B. Izolacja RNA SBCMV

RNA izolowano przy użyciu zestawu RNeasy Plant Mini Kit produkcji firmy Qiagen (Niemcy).

Druga metoda – rekomendowana dla qPCR wg Changa (1993).

C. RT-PCR

Reakcje PCR wykonywano w termocyklerze T Personal Biometra. Do przeprowadzenia reakcji RT-PCR wykorzystywano zestaw produkcji firmy Qiagen, Qiagen®OneStepRT-PCR Kit.

Do przeprowadzenia reakcji RT-PCR używano następujących par starterów:

a) przydatnych w diagnostyce SBCMV

wg Vaianopoulos i in. (2005):

- **uniwersalnych: FURO1-F/FURO1-R, FURO c1F/FURO c1R, FURO c2F/FURO c2R**
- **specyficznych: SBWMV c1F/SBWMV c1R i SBCMV c1F/SBCMV c1R.**

b) generujących długie produkty, przeznaczone do klonowania, sekwencjonowania i porównywania sekwencji izolatów

wg Koenig i Huth'a (Arch. Virol. (2000) 145: 689-697):

- **uniwersalnych sb40/sb20**, amplifikujących fragment RNA 2 SBCMV i SBWMV (oczekiwany produkt: 625 pz)
- **specyficznych dla SBCMV, sb11/gsb55**, amplifikujących fragment RNA 1 (oczekiwany produkt 420 pz)

c) Pa/Pb oraz P2/P3, wg Kastirr i in. (Proceedings of the 5th Symposium IWGPVFFV, Zurich 2002, 119-122); oczekiwane produkty 400 I 1200 pz

d) SBCMV-F/SBCMV-R, generujące produkt o wielkości 980 pz, wg Fomichevej i in. (Proceedings of the 7th Symposium IWGPVFFV, Quedlinburg 2008)

e) SBWMV-EF/SBWMV-UNR i SBWMV-UNF/SBWMV-UNR, generujące produkty o wielkości, odpowiednio, 643 i 338 (wg Clovera i in. (Plant Pathol. (2001, 50: 761-767) przeznaczone do qRT-PCR.

Profile termiczne reakcji PCR dostosowywano do rodzaju starterów, a w razie potrzeby wyznaczano optimum reakcji przy użyciu termocyklera gradientowego T-Professional (Biometra).

Syntezę starterów zlecano Pracowni Sekwencjonowania DNA i Syntezy Oligonukleotydów w Instytucie Biochemii i Biofizyki (Warszawa).

Obecność produktów reakcji PCR wykrywano metodą elektroforezy na 1% żelu agarozowym w buforze TBE. Rozdziały elektroforetyczne wykonywano w aparacie model Mini (Sigma). Produkty PCR barwiono bromkiem etydydy i obserwowano w świetle UV. Wielkość

produktów oceniano przez porównanie z markerem DNA: O'Gene Ruler 100 bp Marker (Fermentas).

D. Badanie reakcji wybranych odmian pszenicy ozimej i pszenżyta ozimego na porażenie przez SBCMV

Doświadczenie przeprowadzono w warunkach szklarniowych w korytkach zawierających infekcyjne podłoże, zawierające mieszaninę izolatów SBCMV (A). Siewki roślin pikowano do podłoża i pozostawiano na okres 8 –9 tygodni, po czym sprawdzano liczbę porażonych roślin testem TAS-ELISA.

3. Wyniki i ich omówienie

3.1. Podsumowanie doświadczenia polowego Choryń 2007/2008

Porównanie wyników oceny porażen 12 odmian pszenicy ozimej przez SBCMV oraz średniego plonu uzyskanego z 5 powtórzeń w doświadczeniu polowym przedstawiono w Tabeli 1. Dane z Tabeli 1 są dość zaskakujące. Najwyższy plon (91,8 dt/ha) uzyskano dla odmiany Muszelka, pomimo jej stosunkowo dużej podatności na porażenie przez SBCMV (18% roślin porażonych). Podobnie w przypadku odm. Naridana, dla której plon wyniósł 85,6 dt/ha, stwierdzono 16% roślin porażonych. Z drugiej strony, odm. Smuga, w obrębie której w ogóle nie stwierdzono obecności wirusa, uzyskała plon 79,0 dt/ha, a odm. Alkazar (2% porażen) zaledwie 69,6 dt/ha. Można zatem wysnuć wniosek, że izolat SBCMV-Choryń jest izolatem łagodnym i nie stanowi istotnego czynnika kształtowania plonu. W poprzednich doświadczeniach również otrzymywano wyniki wskazujące na łagodny charakter tego izolatu. Ponadto trzeba także uwzględnić pewną przypadkowość wykrywania wirusa z powodu małej charakterystyczności objawów.

3.2. Reakcja wybranych odmian pszenicy ozimej i pszenżyta ozimego na porażenie przez SBCMV

W Tabeli 2 przedstawiono wyniki badań podatności odmian pszenicy i pszenżyta na porażenie przez SBCMV z infekcyjnego podłoża zawierającego mieszaninę izolatów wirusa. Z każdej odmiany przebadano po 32 rośliny. W tym doświadczeniu odmianami o najniższej podatności na SBCMV okazały się CHD 1378/02 oraz Figura, całkowicie wolne od wirusa. 0% porażen dla rodu CHD 1378/02 jest wynikiem bardzo zachęcającym, ale należy go

ostrożnie interpretować, gdyż wymaga potwierdzenia w warunkach polowych. Podobny wynik uzyskano dla odm. Figura, dla której jednak w warunkach polowych wykazano niewielką podatność na odglebową mozaikę zbóż. Równie obiecująca jest odm. Ostroga, która w dwóch doświadczeniach, polowym i szklarniowym, charakteryzowała się niską podatnością na porażenie przez SBCMV. Ta zaleta wymaga jednak potwierdzenia w kolejnych doświadczeniach.

Najlepsze wyniki na podstawie 5 doświadczeń, polowych i szklarniowych, przeprowadzonych w różnych warunkach, uzyskano dla odmian: **Bogatka**, **Legenda** i **Tonacja**.

Najwyższy procent porażen wykryto w roślinach odm. Smuga (37,5%); jest to tym bardziej nieoczekiwane, że w doświadczeniu polowym, Choryń 2007/2008, którego podsumowanie zamieszczono w p. 3.1., w roślinach odm. Smuga w ogóle nie wykryto porażen przez SBCMV.

Co się tyczy oceny porażen pszenżyta, to wyniki nie potwierdziły tezy, że jest to rodzaj bardziej podatny na SBCMV niż pszenica; najwyższy udział roślin porażonych, w przypadku odm. Pisarro, wyniósł zaledwie 18,6%, a więc był o połowę niższy od najsilniej porażonej odmiany pszenicy.

Wyniki tego doświadczenia stanowią ważną weryfikację poprzednich danych dotyczących oceny podatności odmian pszenicy na SBCMV. Potwierdziły znaczenie izolatu wirusa wobec którego odmiana jest testowana. Również porównując wyniki wcześniejszych doświadczeń polowych przeprowadzonych w Choryni i w Strzelcach odnotowano wyraźne rozbieżności. Rozbieżności wyników obrazują złożoność czynników biologicznych, klimatycznych i środowiskowych wpływających na ostateczny efekt rozwoju wirusy i jej skutki ekonomiczne.

3.3. Wykrywanie SBCMV w liściach i korzeniach roślin pszenicy i pszenżyta wybranych odmian

Sprawdzano obecność wirusa w liściach i w korzeniach dwóch odmian pszenicy (CHD 1378/02 i Figura) oraz dwóch odmian pszenżyta (Grenado i Moderato), wykazujących małą podatność na porażenie przez SBCMV. Przebadano po 16 roślin z każdej odmiany. Wyniki przedstawiono w Tabeli 3.

W przypadku obu odmian pszenicy potwierdzono znaczny poziom odporności na porażenie przez SBCMV, gdyż odnotowano brak wirusa zarówno w liściach jak i w korzeniach wszystkich badanych roślin.

Natomiast wyniki dotyczące pszenżyta nie są tak jednoznaczne. Wirus wykryto w 5 roślinach odm. Grenado, przy czym w 3 przypadkach zarówno w liściach jak i w korzeniach, w 1 przypadku tylko w liściach i w 1 roślinie tylko w korzeniach. Mniej porażen (2 rośliny) stwierdzono dla odm. Moderato, w 1 roślinie tylko w liściach i w 1 tylko w korzeniach. Jest to o tyle interesujące, że według danych literaturowych w przypadku odmian odpornych najczęściej następuje „zatrzymanie” wirusa na poziomie korzeni poprzez działanie mechanizmu blokującego jego transport do liści. W odniesieniu do badanych odmian pszenżyta nie stwierdzono takiego zjawiska. Można natomiast zauważyć, że dla pełnej oceny odporności odmian i materiałów hodowlanych należy wykonywać diagnostykę zarówno w liściach jak i w korzeniach.

3.4. Porównanie skuteczności metod izolacji RNA SBCMV

Sprawdzanie skuteczności metody izolacji RNA SBCMV opisanej przez Changa podjęto jako pierwszy etap adaptacji techniki Real-time PCR, umożliwiającej ilościowy pomiar stężenia wirusa w tkankach roślinnych, co z kolei stwarza podstawy precyzyjnej oceny podatności roślin na porażenie przez wirus.

Metoda ekstrakcji wg Changa wykazała wyraźnie niższą efektywność w porównaniu z rutynowo stosowaną procedurą wg Qiagena i dlatego nie nadaje się do stosowania do wykrywania SBCMV za pomocą techniki Real-time PCR.

3.5. Badanie zróżnicowania polskich izolatów SBCMV na poziomie molekularnym

W celu porównania sekwencji izolatów SBCMV pochodzących z różnych lokalizacji sprawdzono przydatność 7 par staterów, opisanych w p. 2.2. Metody, generujących produkty RT-PCR odpowiedniej długości. Przydatność starterów oceniano na podstawie reakcji z ekstraktami RNA SBCMV kontroli pozytywnej oraz z prób roślin, w których stwierdzono wysoką koncentrację wirusa (wg testu TAS-ELISA).

Startery SBWMV-EF/SBWMV-UNF oraz SBWMV-UNF/SBWMV-UNR, jak również P2/P3, nie generowały produktów reakcji PCR a więc okazały się nieprzydatne dla zamierzonych badań. Startery sb11/gsb55 oraz Pa/Pb cechowała niestabilność działania, przypuszczalnie związana z labilnością wirusowego RNA na odcinkach przyłączenia starterów. Zawodność generowania produktów PCR przy użyciu tych par starterów spowodowała rezygnację z ich dalszego stosowania.

Najbardziej przydatna okazała się para starterów SBCMV-F/SBCMV-R. Generowany produkt o długości 980 pz uzyskano dla dwóch izolatów: SBCMV-Choryń i SBCMV-Chude. Nie uzyskano jednak pozytywnego efektu klonowania produktów. Podjęto zatem próbę sekwencjonowania amplifikowanego fragment DNA wyeluowanego bezpośrednio z żelu po elektroforezie kończącej procedurę PCR. Efekt sekwencjonowania był jednak nie zadowalający.

Obecnie kontynuowane są prace nad uzyskaniem produktów PCR z izolatów SBCMV-Cer, SBCMV-St i SBCMV-Żab oraz optymalizacja procesu klonowania tych produktów.

Tabela 1.

Porównanie oceny porażień 12 odmian pszenicy ozimej przez SBCMV oraz plonu w doświadczeniu polowym, Choryń 2007/2008

Odmiana pszenicy	Plon (dt/ha)	% wykrytych porażień przez SBCMV
Muszelka	91,8	18
Ostroga	86,4	6
Naridana	85,6	16
Finezja	82,9	6
Legenda	82,8	2
Bogatka	80,3	14
Smuga	79,0	0
Figura	76,9	10
Brilliant	75,0	36
Tonacja	73,8	4
Boomer	72,9	16
Alkazar	69,6	2

Tabela 2.

Podatność odmian pszenicy ozimej i pszenżyta ozimego na porażenie przez SBCMV w doświadczeniu szklarniowym (badano po 32 rośliny z każdej odmiany)

Odmiana	Liczba roślin porażonych	% porażen
Pszenica		
Batuta	7	21,8
Bogatka	4	12,5
Brilliant	1	3,1
CHD 1378/02	0	0
Figura	0	0
Legenda	3	9,3
Muszelka	3	9,3
Ostroga	1	3,1
Smuga	12	37,5
Tonacja	1	3,1
Pszenżyto		
Grenado	2	6,2
Moderato	1	3,1
Pisarro	6	18,6
Woltario	4	12,4

Tabela 3.

Wykrywanie SBCMV w liściach i korzeniach roślin pszenicy i pszenżyta odmian wykazujących małą podatność na porażenie przez ten wirus (z każdej odmiany przebadano po 16 roślin)

Odmiana	Liczba roślin, w których wykryto SBCMV		
	W liściach	W korzeniach	W liściach i w korzeniach
PSZENICA			
CHD 1378/02	0	0	0
Figura	0	0	0
PSZENŻYTO			
Grenado	1	1	3
Moderato	1	1	0

4. Podsumowanie i wnioski

Celem pracy było wyłonienie odmian i materiałów wyjściowych do hodowli pszenicy o szczególnie niskiej podatności na porażenie przez wirus odglebowej mozaiki zbóż, SBCMV. Ze względu na złożoność genetycznego uwarunkowania tego zjawiska a także rolę izolatu wirusa oraz czynników klimatycznych, realizacja tego celu wymaga wielokrotnego testowania wybranych materiałów przy uwzględnieniu zróżnicowanych warunków doświadczalnych. Na podstawie uzyskanych danych można już wskazać odmiany rokujące duże nadzieje jako mało podatne na SBCMV. Są to przede wszystkim 3 odmiany sprawdzone w 5 doświadczeniach (polowych i szklarniowych): **Bogatka**, **Legenda** i **Tonacja**. Ponadto obiecujące wstępne wyniki, wymagające jednak potwierdzenia, odnotowano dla odmian Figura i Ostroga oraz dla rodu CHD 1378/02.

W dalszej części pracy planuje się rozszerzenie puli ocenianych materiałów jak również uruchomienie nowoczesnej metody oceny jakim jest zastosowanie techniki Real-time PCR. Jak wynika jednak z danych uzyskanych w 2008 roku, w przypadku polskich izolatów SBCMV jest to zadanie wymagające opracowania własnych starterów, charakteryzujących się dużą niezawodnością.