

Using the IC real-time RT-PCR technique for the detection of *Tomato torrado virus* (ToTV) in tomato seedling from infected seeds

Zastosowanie techniki IC real-time RT-PCR do wykrywania wirusa nekrozy pomidora (ToTV) w siewkach z porażonych nasion

Henryk Pospieszny, Beata Hasiów-Jaroszewska, Natalia Rymelska, Natasza Borodynko

Summary

In 2007, a new virus *Tomato torrado virus* (ToTV) was identified. The occurrence and spread of the virus were reported in many parts of the world. Taking into consideration a low concentration and stability of the virus in plant sap, its poor mechanical transmission as well as effective transmission by whiteflies, the issue that should be solved is the way of virus transmission for very long distances. ToTV belongs to the family Secoviridae including several viruses transmitted by seeds were described, what may be expected also in the case of ToTV. In the preliminary study on the transmission ToTV by seeds a special emphasis was paid to the detection of virus in tomato plants. Antiserum prepared against ToTV was not specific enough for the enzyme-linked immunosorbent assay test (ELISA) but it was useful for immunomolecular techniques for the trapping virus particles (immunocapture – IC) from plant sap. The immunocapture real-time reverse transcription – polymerase chain reaction (IC real-time RT-PCR) techniques were developed for the detection of ToTV in tomato plants grown from seeds.

Key words: ToTV, IC real-time PCR, seedlings, detection

Streszczenie

W roku 2007 zidentyfikowano nowego wirusa *Tomato torrado virus* (ToTV), którego występowanie wykazano w różnych, odległych częściach świata. Biorąc to pod uwagę, a także takie właściwości wirusa, jak niska trwałość, niska koncentracja w soku roślinnym i słabe przenoszenie na drodze mechanicznej oraz bardzo efektywne przenoszenie przez mączliki, rodzi się pytanie o sposób przenoszenie ToTV na dalekie odległości i kontynenty. Wirus należy do rodziny Secoviridae, której liczni przedstawiciele przenoszeni są przez nasiona, czego można oczekiwać także w przypadku ToTV. We wstępnych badaniach nad przenoszeniem ToTV przez nasiona skoncentrowano się nad wykrywaniem wirusa w roślinach pomidora przy bardzo niskiej koncentracji cząstek wirusowych w soku. Dzięki opracowaniu specyficznych starterów, a także warunków przeprowadzenia reakcji techniki serologicznego wyłapywania i reakcji łańcuchowej polimerazy (IC real-time RT-PCR – immunocapture real-time reverse transcription – polymerase chain reaction) wykazano przydatność tej techniki do wykrywania ToTV w roślinach pomidora wyrosłych z nasion skażonych wirusem.

Słowa kluczowe: ToTV, IC real-time PCR, siewki, wykrywanie

Institut Ochrony Roślin – Państwowy Instytut Badawczy
Zakład Wirusologii i Bakteriologii
Władysława Węgorka 20, 60-318 Poznań
H.Pospieszny@iorpib.poznan.pl

Wstęp / Introduction

W roku 2001, w Hiszpanii, na pomidorach obserwowano objawy nekroz na roślinach i owocach, a miejscowi producenci pomidora chorobę tę nazwali „torrado”, co znaczy opalona ogniem (Jorda i wsp. 2003). Prawie w tym samym czasie podobne objawy chorobowe obserwowano w Polsce (Pospieszny 2005). Dopiero w roku 2007 ustalono, że czynnikiem sprawczym tych objawów jest wirus, którego nazwano *Tomato torrado virus* (ToTV) (Pospieszny i wsp. 2007; Verbeek i wsp. 2007). ToTV charakteryzuje się następującymi właściwościami: występuje w roślinach w bardzo niskich koncentracjach i jest nietrwały. Z tych powodów stosunkowo mało efektywnie przenosi się mechanicznie, ale bardzo efektywnie jest przenoszony przez mączlika (Pospieszny i wsp. 2010). Wiele odmian pomidora jest odpornych na wirusa. W tych okolicznościach, wydawałoby się niesprzyjających rozprzestrzenianiu się wirusa na dalekie odległości, w krótkim czasie jego obecność wykryto w różnych krajach i na różnych kontynentach: Hiszpania, Polska, Francja, Włochy, Węgry, Australia, Panama i in. W tej sytuacji rodzi się pytanie o rolę przenoszenia ToTV z nasionami pomidora w weretykalnym rozprzestrzenianiu się wirusa.

Celem pracy była ocena przydatności techniki molekularnej real-time RT-PCR w połączeniu z serologicznym zągęszczaniem wirusa (IC real-time RT-PCR – immunocapture real-time reverse transcription – polymerase chain reaction) do wykrywania ToTV w roślinach wyrosłych z nasion pochodzących z porażonych roślin.

Materiały i metody / Materials and methods

Pozyskiwanie nasion z roślin porażonych przez ToTV

Siewki pomidora odmiany Beta Lux, w stadium 2 par liści zakażano izolatami ToTV-Kra. Dojrzałe owoce macerowano i homogenat fermentowano przez 2–3 dni w temperaturze pokojowej, a następnie nasiona przemylano i przecierano przez gazę młyńską w celu usunięcia miąższu owoców. Nasiona przesuszano na bibule i przez co najmniej 3 tygodnie przechowywano w temperaturze około 5°C. Następnie nasiona odkażano powierzchniowo 10% roztworem H₃PO₄ i wysiewano pojedynczo do wielodoniczek, o wymiarach 7 × 7 cm. W okresie pomiędzy 4. a 5. tygodniem po wysianiu zbierano fragmenty liści, tworząc próby złożone z 10 roślin, które techniką IC real-time RT-PCR testowano na obecność ToTV.

IC real-time RT-PCR

Reakcja IC real-time RT-PCR stanowi modyfikację konwencjonalnej reakcji łańcuchowej polimerazy DNA z analizą ilości produktu w czasie rzeczywistym. Wykorzystuje się tutaj połączenie metody serologicznej z molekularną podobnie, jak przy IC RT-PCR. W metodzie IC rt RT-PCR na ściankach probówek PCR, wcześniej opłaszczonych specyficznymi przeciwciałami rozcień-

czonymi 50 razy w buforze węglanowym, są wylapywane cząstki wirusowe z testowanej próby i następnie do tej samej probówki dodaje się 25 µl mieszaniny odczynników do RT real time PCR zawierającej Brilliant II SYBR Green QRT-PCR One Step oraz startery ToTVrealF i ToTVrealR pozwalające na detekcję ToTV (tab. 1). Otrzymane w wyniku amplifikacji produkty poddano sekwencjonowaniu bezpośrednio z produktu PCR i otrzymaną sekwencję porównano z innymi zdeponowanymi w Banku Genów.

Tabela 1. Sekwencje starterów

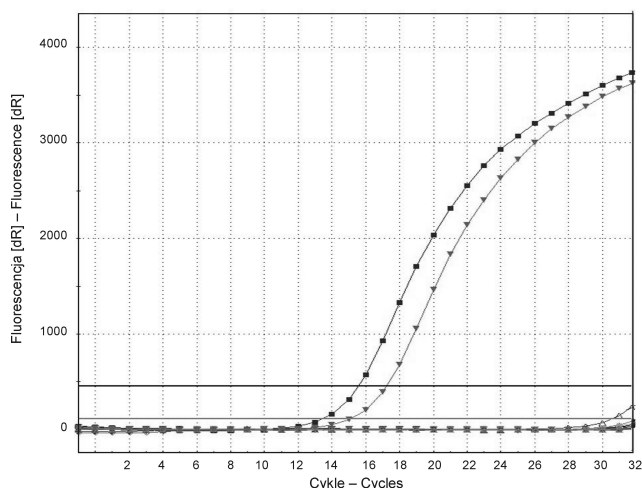
Tabela 1. Sequence of primers

Starter – Primer	Sekwencja – Sequence 5'–3'
ToTVrealF	5'AAGGACGAAGAGCGACTGT3'
ToTVrealR	5'GTGGTGTATTCAAGACTTC3'

Reakcję prowadzono w aparacie Mx3005P real-time PCR system (Stratagene).

Wyniki i dyskusja / Results and discussion

Rozpoznanie zjawiska ewentualnego przenoszenia ToTV z nasionami pomidora utrudniają właściwości wirusa i związane z tym problemy z jego wykrywaniem oraz doбором odpowiedniego modelu badawczego: izolat wirusa-odmiana pomidora. Jako model badawczy zastosowano odm. pomidora Beta Lux i izolat ToTV-Kra, który charakteryzuje: wysoka podatność odmiany na wirusa przy czym rośliny nie zamierają i produkują owoce, w przeciwieństwie do układu ToTV-Wal i Beta Lux, który praktycznie uniemożliwia otrzymanie nasion. ToTV należy do rodzaju *Torradovirus*, który wraz z rodzajami: *Como-virus*, *Fabavirus*, *Nepovirus*, *Cheravirus*, *Sadwavirus*, *Sequivirus* i *Waikavirus* należą do rodziny Secoviridae. Liczne wirusy należące do tej rodziny, w tym nietrwałe, przenoszą się z nasionami, co daje podstawy, aby można było tego oczekiwać także w przypadku wirusa ToTV. Wykrywanie ToTV w roślinach pomidora, zarówno testami serologicznymi, jak i molekularnymi, jest uciążliwe z co najmniej dwóch powodów: wyjątkowo niskiej koncentracji cząstek wirusowych w soku roślinnym oraz, w tej sytuacji, szczególnie negatywnego efektu interferencji niektórych składników soku w reakcje testów diagnostycznych. W przypadku wykrywania wirusa bezpośrednio w nasionach problemy te nabierają jeszcze większego znaczenia, gdyż zwykle koncentracja cząstek wirusowych jest znacznie niższa niż w liściach. Otrzymana wcześniej surowica skierowana przeciwko ToTV ze względu na obniżoną specyficzność nie jest przydatna w teście ELISA, jednak może być wykorzystana w technikach serologiczno-molekularnych do wylapywania i zągęszczania cząstek wirusowych z soku roślinnego. Celem ominięcia wyżej wspomnianych uciążliwości zastosowano technikę IC real-time RT-PCR do wykrywania ToTV w siewkach pomidora. Zaprojektowane



Rys. 1. Krzywe amplifikacji powstałe w reakcji IC real-time RT-PCR. Kontrola pozytywna – kolor czarny, próby porażone wirusem – kolor szary

Fig. 1. Amplification curves arising in IC real-time RT-PCR. Black line – positive control, sample from infected plants – grey line

w Zakładzie Wirusologii i Bakteriologii Instytutu Ochrony Roślin – Państwowego Instytutu Badawczego specyficzne startery i zastosowane warunki reakcji zagwarantowały przydatność techniki IC real-time RT-PCR do wykrywania ToTV, w roślinach pomidora bezobjawowo porażonych wirusem z nasion (rys. 1). Sekwencja produktów RT-PCR była identyczna z ToTV-Kra. Wyniki badań wykazały, że w większości tych roślin koncentracja wirusa była znacznie niższa niż w roślinach kontrolnych zakażonych

mechanicznie. Wyjątkowo niska koncentracja wirusa w testowanych roślinach była przyczyną uzyskiwania wyników niewiarygodnych w teście enzymoimmunologicznym (ELISA). IC real-time RT-PCR jest bardzo czułą techniką, sprzyjającą zagęszczaniu cząstek wirusowych oraz pozwalającą w dużym stopniu wyeliminować negatywny wpływ soku na jej specyficzność oraz stosunkowo niską czasochłonność i przez to przydatną do masowej diagnostyki. Dzięki temu, że nie ma potrzeby izolacji matrycy (RNA), skraca się czas wykonywania testu real-time RT-PCR; jednorazowo można przebadать około 90 prób. Warunkiem koniecznym jest posiadanie specyficznej surowicy.

Wnioski / Conclusions

1. Wykrycie ToTV w siewkach roślin wyrosłych z nasion pochodzących z chorych roślin jest trudne ze względu na wyjątkowo niską koncentrację cząstek wirusowych w soku roślinnym.
2. Technika IC real-time RT-PCR przy zastosowaniu zaprojektowanych specyficznych starterów i opracowanych warunkach może być z powodzeniem wykorzystana do wykrywania ToTV w roślinach pomidora wyrosłych z nasion skażonych wirusem.

Praca finansowana z projektu badawczego N N310 732040 z Narodowego Centrum Nauki na 2011–2013.

Literatura / References

- Jorda C., Martinez M.C., Cordoba M.C., Martinez O., Juarez M., Font J. 2003. El 'cribado' o 'torrao', una cultivo del tomato? Phytoma Espana 152: 130–136.
- Pospieszny H. 2005. Preliminary Study on the Spherical Virus Transmitted by Greenhouse Whitefly (*Trialeurodes vaporariorum*). 2nd Join Confer. Work Group Legum. Veget. Viruses, Florida, USA, Abstract Book, p. 30.
- Pospieszny H., Borodynko N., Obrepalska-Stepłowska A., Hasiów B. 2007. The first report of *Tomato torrado virus* in Poland. Plant Dis. 91, p. 1364.
- Pospieszny H., Budziszewska M., Hasiów-Jaroszewska B., Obrepalska-Stepłowska A., Borodynko N. 2010. Biological and molecular characterization of Polish isolates of *Tomato torrado virus*. J. Phytopathol. 58: 56–62.
- Verbeek M., Dulleman A.M., van der Heuvel J.F.J.M., Maris P.C., van der Vlugt R.A.A. 2007. Identification and characterization of tomato torrado virus, a new plant picorna-like virus from tomato. Arch. Virol. 152: 881–890.