

Received: 06.03.2018 / Accepted: 25.05.2018

Use of qRT-PCR assay with TaqMan probe for simultaneous detection of various *Pepino mosaic virus* (PepMV) strains in infected plants

Zastosowanie techniki qRT-PCR z sondą TaqMan do jednoczesnego wykrywania różnych szczepów wirusa mozaiki pepino (*Pepino mosaic virus*, PepMV) w porażonych roślinach

Beata Hasiów-Jaroszewska*, Daria Budzyńska, Julia Minicka, Natasza Borodynko-Filas

Summary

Pepino mosaic virus (PepMV) has been a serious threat to greenhouse tomato production for many years. So far, five PepMV strains have been distinguished: European (EU), Peruvian (LP), southern Peruvian (PES), American 1 (US1) and Chilean 2 (CH2), the latter dominating in Europe. The occurrence of mixed infections with two different strains (combinations of EU and CH2) has also been observed. During 2016–2017, 71 tomato samples were analyzed for the presence of PepMV at the Plant Disease Clinic Institute of Plant Protection – National Research Institute. The conventional reverse transcription polymerase chain reaction (RT-PCR) and quantitative RT-PCR (qRT-PCR) with TaqMan probe were used. The presence of PepMV was confirmed in 23 samples, however, the use of qRT-PCR allowed additional detection of a mixed infection of EU/CH2 strains in 3 samples. Thus, the qRT-PCR technique can be used to verify the presence of various PepMV strains in our country.

Słowa kluczowe: PepMV; strains; qRT-PCR; detection

Streszczenie

Wirus mozaiki pepino (*Pepino mosaic virus*, PepMV) od wielu lat stanowi poważne zagrożenie w uprawie pomidora szklarniowego. Do tej pory w populacji wirusa wyróżniono pięć szczepów: europejski (EU), peruwiański (LP), południowo-peruwiański (PES), amerykański 1 (US1) oraz chilijski 2 (CH2), z których ten ostatni dominuje w Europie. W wielu europejskich krajach stwierdzono również występowanie mieszanych infekcji szczepów EU/CH2. W latach 2016–2017 w Klinice Chorób Roślin Instytutu Ochrony Roślin – Państwowego Instytutu Badawczego przebadano 71 próbek roślin pomidora na obecność PepMV. próbki analizowano za pomocą konwencjonalnej techniki odwrotnej transkrypcji i łańcuchowej reakcji polimerazy (RT-PCR) oraz w czasie rzeczywistym z wykorzystaniem sondy typu TaqMan (qRT-PCR). W obu przypadkach potwierdzono obecność PepMV w 23 próbkach, a zastosowanie qRT-PCR umożliwiło dodatkowo wykrycie mieszanej infekcji szczepów EU/CH2 w 3 próbkach. Technika qRT-PCR może być więc stosowana do weryfikacji obecności różnych szczepów PepMV na terenie naszego kraju.

Key words: PepMV; szczepy; qRT-PCR; wykrywanie

Instytut Ochrony Roślin – Państwowy Instytut Badawczy
Władysława Węgorka 20, 60-318 Poznań

*corresponding author: b.hasiow@iortpib.poznan.pl

Wstęp / Introduction

Wirus mozaiki pepino (*Pepino mosaic virus*, PepMV) jest obecnie jednym z najgroźniejszych patogenów pomidora szklarniowego sklasyfikowanym na liście A2 organizmów regulowanych w Unii Europejskiej 2004/200/EC według Europejskiej i Śródziemnomorskiej Organizacji Ochrony Roślin. Występowanie PepMV stwierdzono w wielu krajach Europy, w Ameryce Południowej i Północnej oraz Chinach (French i wsp. 2001; Jordá i wsp. 2001; Pospieszny i wsp. 2003; Maroon-Lango i wsp. 2005; Ling 2007). Wirus należy do rodzaju *Potexvirus* i posiada typową dla reprezentantów tego rodzaju organizację genomu, jak i morfologię cząstek. Wiriony PepMV są nitkowate o długości około 480–520 nm, a genom stanowi jednoniciowe RNA (około 6410 nt) o dodatniej polarności. W genomie można wyróżnić pięć otwartych ramek odczytu (ORFs) kodujących odpowiednio RNA zależną RNA polimerazę (ORF1), blok trzech białek pełniących funkcję transportową (ORF2-4) oraz białko płaszczu (ORF5) (Maroon-Lango i wsp. 2005; Ling 2007; Hasiów i wsp. 2008). Wirus przenosi się bardzo łatwo mechanicznie, a także w niewielkim stopniu z nasionami pomidora (Hanssen i wsp. 2010). Do tej pory zidentyfikowano pięć różnych szczepów wirusa: europejski (EU), peruwiański (LP), południowo-peruwiański (PES), amerykański 1 (US1) oraz chilijski 2 (CH2) (Hanssen i wsp. 2009; Hanssen i Thomma 2010; Moreno-Pérez i wsp. 2014). Przez wiele lat w Europie wykrywano głównie izolaty należące do szczepu EU, obecnie to jednak izolaty reprezentujące szczep CH2 dominują w populacji wirusa. W Polsce od 2005 roku odnotowywano zdecydowaną przewagę szczepu CH2 (Minicka i wsp. 2016), i co istotne nie obserwowano mieszanych infekcji z izolatami szczepu EU, które występowały w Belgii, Holandii i Hiszpanii (Hanssen i wsp. 2008). Stwierdzono tam również występowanie różnego typu rekombinantów pomiędzy izolatami z grupy EU i CH2, które występowały w warunkach naturalnych w mieszanej infekcji (Hanssen i wsp. 2008). Zaobserwowano nasilenie objawów na roślinach równocześnie zainfekowanych obydwojema szczepami wirusa, przy czym nie jest jednak jasne, czy było to związane z ich synergistycznym oddziaływaniem, czy też nowo powstałe warianty rzeczywiście wpływały na nasilenie infekcji. Zmienność genetyczna PepMV i jego potencjalna zdolność do tworzenia nowych wariantów genetycznych na drodze mutacji punktowych bądź rekombinacji, może mieć istotny wpływ na diagnostykę tego patogena oraz rozwijanie metod jego kontroli i ograniczania rozprzestrzeniania. W latach 2016–2017, w Polsce, w ramach prac prowadzonych w Klinice Chorób Roślin Instytutu Ochrony Roślin – Państwowego Instytutu Badawczego analizowano 71 próbek pomidorów pochodzących z upraw szklarniowych na terenie całego kraju.

Celem pracy było określenie, które szczepy PepMV obecnie dominują w Polsce oraz czy występuje zjawisko mieszanych infekcji w uprawach pomidora. Analizy przeprowadzono z wykorzystaniem techniki łańcuchowej reakcji polimerazy DNA z analizą ilości produktu w czasie rzeczywistym (qPCR) opracowanej przez Ling i wsp. (2007), która umożliwia wykrywanie izolatów reprezentujących różne szczepy PepMV.

Materiały i metody / Materials and methods

Identyfikacja szczepów PepMV techniką RT-PCR i sekwencjonowania / Identification of PepMV strains using RT-PCR assay and sequencing

W latach 2016–2017 w Klinice Chorób Roślin analizowano 71 próbek z roślin pomidora pod kątem występowania PepMV. Na porażonych roślinach pomidora obserwowano różnego typu objawy: typową dla PepMV bąblowatość liści, żółtaczkowe przebarwienia, ale również silne zniekształcenia liści oraz nierównomierne wybarwianie owoców. Na części roślin przesłanych do badań nie obserwowano żadnych objawów. W przypadku trzech próbek objawy były z kolei bardziej nasilone (silne malformacje liści i nekrozy na owocach), co sugerowało obecność nowych wariantów wirusa bądź mieszanej infekcji. Do badań stosowano procedurę badawczą PB-03 „Wykrywanie materiału genetycznego wirusa mozaiki pepino (*Pepino mosaic virus*, PepMV) metodą RT-PCR” (Certyfikat Akredytacji Laboratorium Badawczego AB 1435). Całkowity RNA izolowano z fragmentów liści szczytowych lub owoców za pomocą kitu RNeasy Plant Mini Kit (Qiagen, Hilden, Niemcy) zgodnie z dołączoną procedurą. Dla każdej próbki wykonano reakcję RT-PCR z parą starterów TGB3F/R (Hasiów-Jaroszewska i Borydynko 2013) amplifikującą region genomu PepMV o wielkości 470 nt obejmujący gen *TGB3*. Reakcję przeprowadzano w objętości 50 µl mieszaniny o składzie: 1 µl RNA o stężeniu 500 ng/µl, 500 nM startera 5' i 3', 25 µl 2x DreamTaq PCR Master Mix (ThermoScientific, Waltham, MA, USA), 1 µl RevertAid Reverse Transcriptase (200 U/µL) i 22 µl wody. Profil termiczny obejmował odwrotną transkrypcję przez 20 minut w 42°C, a następnie wstępną denaturację – 3 minuty w 95°C. Amplifikację prowadzono w 30 cyklach: denaturacja 30 sekund w 94°C, przyłączanie starterów 30 sekund w 51°C i wydłużanie nici 30 sekund w 72°C. Reakcję zakończono w 72°C przez 5 minut. Obecność otrzymanych produktów amplifikacji obserwowano na 1% żelu agarozowym w świetle UV względem markera wielkości DNA HyperLadder™ 100 bp (Bioline, Londyn, Wielka Brytania). W celu szczegółowej identyfikacji szczepów uzyskane produkty RT-PCR sekwencjonowano w firmie zewnętrznej (Genomed, Warszawa, Polska).

Identyfikacja szczepów PepMV techniką qRT-PCR z sondą TaqMan / Identification of PepMV strains using qRT-PCR assay with TaqMan probe

Wyizolowany RNA wykorzystano w reakcji qRT-PCR. Reakcje prowadzono z wykorzystaniem odpowiednich par starterów umożliwiających jednoczesne wykrywanie izolatów ze szczepów EU i CH2, sondy TaqMan (Ling i wsp. 2007) i zestawu iTaq™ Universal Probes One-Step Kit (Bio-Rad, Hercules, CA, USA). Reakcje prowadzono w objętości 20 µl mieszaniny o składzie: 1 µl RNA o stężeniu 500 ng/µl, 300 nM każdego ze starterów 5' i 3', 400 nM sondy TaqMan (tab. 1), 10 µl iTaq Universal probes reaction mix (2x), 0,5 µl iScript Advanced reverse transcriptase i 6,5 µl wody. Profil termiczny obejmował odwrotną transkrypcję przez 10 minut w 50°C, następnie aktywację polimerazy i denaturację DNA 1 minutę w 95°C. Amplifikację prowadzono w 30 cyklach: denaturacja 10 sekund w 95°C oraz przyłączanie starterów i wydłużanie nici 30 sekund w 55°C. Wyniki sczytywano w kanale FAM.

Porównanie czułości RT-PCR i qRT-PCR / The comparison of sensitivity of RT-PCR and qRT-PCR assays

W celu porównania czułości obu technik sporządzono dziesiętne rozcieńczenia całkowitego RNA (500 ng/µl–50 fg/µl) wyizolowanego z tkanki roślinnej, które następnie wykorzystano jako matryce w reakcji RT-PCR i qRT-PCR. Każdą reakcję qRT-PCR wykonano w dwóch powtórzeniach. Reakcje przeprowadzono jak wyżej.

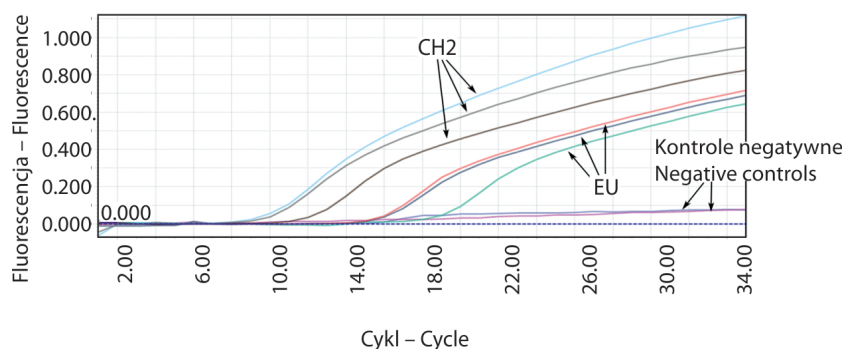
Wyniki i dyskusja / Results and discussion

Spośród 71 próbek pochodzących z zielonych części roślin i owoców analizowanych za pomocą RT-PCR obecność wirusa potwierdzono w 23 przypadkach. Zastosowane w reakcji RT-PCR startery umożliwiły wykrycie wszystkich szczepów PepMV, ponieważ zostały zaprojektowane na podstawie zachowawczej sekwencji genu wirusa. Sekwencjonowanie uzyskanych produktów RT-PCR wykazało obecność szczepu CH2 we wszystkich badanych próbkach. Analizy prowadzone z wykorzystaniem techniki qRT-PCR potwierdziły obecność PepMV w 23 z 71 przebadanych próbek, jednakże w trzech z nich stwierdzono obecność mieszanej infekcji szczepów CH2 i EU (rys. 1). W reakcji otrzymano wartości *C_q* wynoszące odpowiednio 9,81; 11,95 i 12,74 dla szczepów CH2 oraz 16,14; 16,32 i 19,05 dla szczepów EU. Sekwencjonowanie produktów reakcji RT-PCR będącej *de facto* mieszaniną różnych wariantów genetycznych wirusa umożliwiło wskazanie tylko szczepu CH2. Zastosowanie reakcji qRT-PCR z sondą TaqMan pozwoliło zaś na identyfikację obu szczepów w trzech badanych próbkach. Porównanie czułości obu reakcji wykazało, że qRT-PCR jest dziesięciokrotnie czulszy i możliwe było wykrycie PepMV w 500 fg/µl całkowitego RNA (rys. 2). Znacznie krótszy był też czas trwania reakcji (około godziny) w porównaniu z konwencjonalną metodą RT-PCR, która wymaga dodatkowo przeprowadzenia analizy elektroforetycznej. Wadą techniki qRT-PCR jest jed-

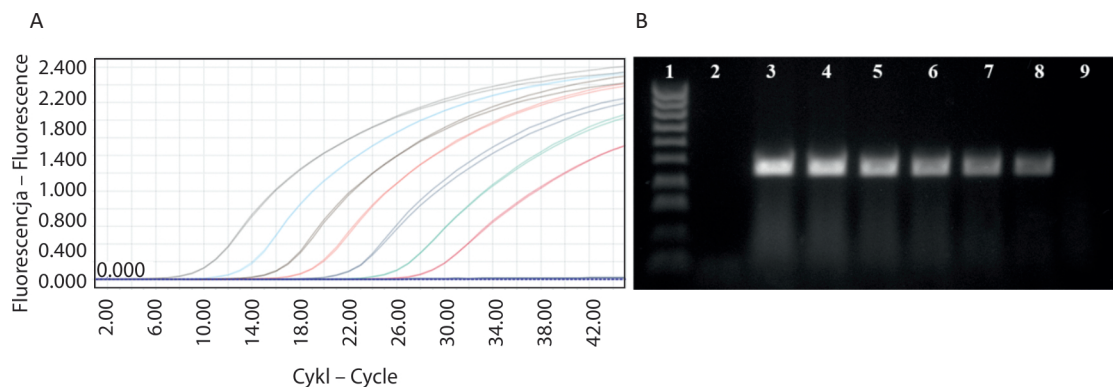
Tabela 1. Startery i sonda użyte do wykrywania PepMV w reakcji qRT-PCR

Table 1. Primers and TaqMan probe used for PepMV detection in qRT-PCR reaction

Starter Primer	Sekwencja 5'-3' Sequence 5'-3'	Amplifikowany szczep PepMV Amplified strain of PepMV
KLO5-48	ACTCCTAGAGCTGACCTCAC	EU
KLO5-51	TCTCCAGCAACAGGTTGGTA	EU
KLO5-49	ACTCCTAGAGCTGATCTTAC	CH2
KLO5-52	TCACCTGCAACTGGTTGATA	CH2
KLO5-50 (SONDA)	FAM-TGTCAGCTTGCATTTACTTCCAAAA-TAMRA	EU i CH2



Rys. 1. Krzywe amplifikacji uzyskane w reakcji qRT-PCR z sondą TaqMan w przypadku mieszanej infekcji CH2/EU PepMV
Fig. 1. Amplification curves obtained in RT-PCR reaction with TaqMan probe in case of mixed infection CH2/EU PepMV



Rys. 2. Porównanie czułości reakcji qRT-PCR i RT-PCR: A – krzywe amplifikacji otrzymane w reakcji qRT-PCR, odpowiadające stosowanym rozcieńczeniom RNA (500 ng/μl–50 fg/μl), B – rozdziel elektroforetyczny reakcji RT-PCR: linia 1 – marker wielkości HyperLadder™ 100 bp (Bioline, Londyn, Wielka Brytania), linia 2 – kontrola negatywna, linie 3–9 – produkty reakcji RT-PCR odpowiadające stosowanym rozcieńczeniom RNA (500 ng/μl–500 fg/μl)

Fig. 2. Comparison of sensitivity of qRT-PCR and RT-PCR assays: A – amplification curves obtained in qRT-PCR with total RNA dilutions as templates (500 ng/μl–50 fg/μl), B – detection limit of RT-PCR assay: lane 1 – HyperLadder™ 100 bp (Bioline, London, UK), lane 2 – negative control – water, lanes 3–9 – correspond to serial ten-fold dilutions of RNA (500 ng/μl–500 fg/μl)

nak zdecydowanie wyższy koszt odczynników, próbek i sond do przeprowadzenia reakcji w porównaniu do techniki RT-PCR. Obecność PepMV w Polsce odnotowano w wielu szklarniach całego kraju, a dominującym szczepem jest nadal CH2. Występowanie mieszanych infekcji ze szczepem EU stwarza realne zagrożenie powstania rekombinantów o odmiennych właściwościach biologicznych. Wydaje się, że szczep EU nie został wyeliminowany z populacji wirusa w Polsce, ale może występować w roślinach w mieszanych infekcjach lub też jego koncentracja w tkankach jest niewielka. Istnieje również możliwość, że w związku z obrotem materiału roślinnego na terenie Unii Europejskiej sadzonki pomidora, w których występują mieszane infekcje PepMV zostały sprowadzone do Polski z innych regionów Europy. Ponieważ wszystkie izolaty PepMV są bardzo efektywnie przenoszone mechanicznie, w przypadku wystąpienia wirusa w danej szklarni należy zachować wszelką ostrożność, aby ograniczyć jego rozprzestrzenianie podczas zabiegów pielęgnacyjnych. Rutynowo należy odkażać powierzchnie użytkowe, narzędzia i ręce, a także stosować odzież ochronną. Analiza występowania różnych szczepów PepMV w uprawach pomidora w Polsce jest niezwykle ważnym elementem w kontekście zróżnicowania genetycznego wirusa, zmian w strukturze jego populacji oraz stosowania produktów ochrony roślin opartych na ochronie krzyżowej, które zawierają nie jeden, a wiele szczepów wirusa. Obecnie na terenie kraju dostępny jest preparat PMV®-01, który zostały zarejestrowany jako środek ochrony roślin zgodnie z przepisami unijnymi (EC) N° 1107/2009. Zawiera on łagodny szczep CH2 PepMV, do stosowania w ramach ochrony krzyżowej. Zjawisko ochrony krzyżowej (cross-protection) zachodzi tylko pomiędzy izolatami pokrewnymi danego

gatunku wirusa. Polega ono na celowym zakażeniu roślin łagodnym izolatem wirusa (izolat ochronny), aby chronić je przed innym, ostrym izolatem tego samego wirusa (izolat konkurencyjny). W przyszłości jednak mogą się pojawiać na rynku inne produkty, w których wykorzystywany będzie inny szczep lub szczepy wirusa. Wprowadzanie na rynek Unii Europejskiej takich produktów i ich stosowanie przez producentów będzie się wiązać z powszechnym występowaniem różnego rodzaju szczepów PepMV w uprawie pomidora. W związku z tym kolejnym krokiem jest opracowanie technik umożliwiających rozróżnienie wszystkich do tej pory opisanych szczepów PepMV w badanej próbce. Posiadanie odpowiednich narzędzi biologii molekularnej umożliwiających szybkie i skuteczne wykrywanie różnych szczepów PepMV w roślinach jest niezbędne w celu potwierdzenia skuteczności stosowanych produktów (obecność lub brak PepMV w szczepionych roślinach) czy też weryfikacji obecności PepMV w sprowadzonych do kraju nasionach i roślinach pomidora.

Wnioski / Conclusions

1. Wyniki przeprowadzonych badań wskazują, iż dominującym szczepem w uprawie pomidora w Polsce jest CH2, aczkolwiek sporadycznie stwierdzono również obecność mieszanych infekcji CH2 i EU.
2. Technika qRT-PCR z sondą TaqMan ze względu na swoją czułość i specyficzność jest doskonałym narzędziem do weryfikacji obecności różnych szczepów PepMV w uprawie.

Literatura / References

- French C.J., Bouthillier M., Bernardy M., Ferguson G., Sabourin M., Johnson R.C., Masters C., Godkin S., Mumford R. 2001. First report of *Pepino mosaic virus* in Canada and the United States. *Plant Disease* 85 (10): 1121. DOI: 10.1094/PDIS.2001.85.10.1121B.
- Hanssen I.M., Mumford R., Blystad D.-R., Cortez I., Hasiów-Jaroszewska B., Hristova D., Pagán I., Pereira A.-M., Peters J., Pospieszny H., Ravníkar M., Stijger I., Tomassoli L., Varveri C., van der Vlugt R., Nielsen S.L. 2010. Seed transmission of *Pepino mosaic virus* in tomato. *European Journal of Plant Pathology* 126: 145–152. DOI: 10.1007/s10658-009-9528-x.
- Hanssen I.M., Paeleman A., Vandewoestijne E., Van Bergen L., Bragard C., Lievens B., Vanachter A.C.R.C., Thomma B.P.H.J. 2009. *Pepino mosaic virus* isolates and differential symptomatology in tomato. *Plant Pathology* 58 (3): 450–460. DOI: 10.1111/j.1365-3059.2008.02018.x.
- Hanssen I.M., Paeleman A., Wittemans L., Goen K., Lievens B., Bragard C., Vanachter A.C.R.C., Thomma B.P.H.J. 2008. Genetic characterization of *Pepino mosaic virus* isolates from Belgian greenhouse tomatoes reveals genetic recombination. *European Journal of Plant Pathology* 121 (2): 131–146. DOI: 10.1007/s10658-007-9255-0.
- Hanssen I.M., Thomma B.P.H.J. 2010. *Pepino mosaic virus*: a successful pathogen that rapidly evolved from emerging to endemic in tomato crops. *Molecular Plant Pathology* 11 (2): 179–189. DOI: 10.1111/j.1364-3703.2009.00600.x.
- Hasiów B., Borodynko N., Pospieszny H. 2008. Complete genomic RNA sequence of the Polish *Pepino mosaic virus* isolate belonging to the US2 strain. *Virus Genes* 36 (1): 209–214. DOI: 10.1007/s11262-007-0171-3.
- Hasiów-Jaroszewska B., Borodynko N. 2013. Detection of *Pepino mosaic virus* isolates from tomato by one-step reverse transcription loop-mediated isothermal amplification. *Archives of Virology* 158 (10): 2153–2156. DOI: 10.1007/s00705-013-1706-7.
- Jordá C., Lázaro Pérez A., Martínez-Culebras P., Abad P., Lacasa A., Guerrero M.M. 2001. First report of *Pepino mosaic virus* on tomato in Spain. *Plant Disease* 85 (12): 1292. DOI: 10.1094/PDIS.2001.85.12.1292C.
- Ling K.-S. 2007. Molecular characterization of two *Pepino mosaic virus* variants from imported tomato seed reveals high levels of sequence identity between Chilean and US isolates. *Virus Genes* 34 (1): 1–8. DOI: 10.1007/s11262-006-0003-x.
- Ling K.-S., Wechter W.P., Jordan R. 2007. Development of a one-step immunocapture real-time TaqMan RT-PCR assay for the broad spectrum detection of *Pepino mosaic virus*. *Journal of Virological Methods* 144 (1–2): 65–72. DOI: 10.1016/j.jviromet.2007.03.022.
- Maroon-Lango C.J., Guaragna M.A., Jordan R.L., Hammond J., Bandla M., Marquardt S.K. 2005. Two unique US isolates of *Pepino mosaic virus* from a limited source of pooled tomato tissue are distinct from a third (European-like) US isolate. *Archives of Virology* 150 (6): 1187–1201. DOI: 10.1007/s00705-005-0495-z.
- Minicka J., Hasiów-Jaroszewska B., Borodynko-Filas N., Pospieszny H., Hanssen I.M. 2016. Rapid evolutionary dynamics of the *Pepino mosaic virus* – status and future perspectives. *Journal of Plant Protection Research* 56 (4): 337–345. DOI: 10.1515/jppr-2016-0054.
- Moreno-Pérez M.G., Pagán I., Aragón-Caballero L., Cáceres F., Fraile A., García-Arenal F. 2014. Ecological and genetic determinants of *Pepino mosaic virus* emergence. *Journal of Virology* 88 (6): 3359–3368. DOI: 10.1128/JVI.02980-13.
- Pospieszny H., Borodynko N., Palczewska M. 2003. First record of *Pepino mosaic virus* in Poland. *Journal of Plant Diseases and Protection* 100: 97.