



Webinarium Polskiego Towarzystwa Fitopatologicznego
17 grudnia 2020 r.

Jak wykryć wirusa? – nowoczesne techniki wykrywania i identyfikacji wirusów

Beata Hasiów-Jaroszewska

B.Hasiow@iorpib.poznan.pl

Instytut Ochrony Roślin - Państwowy Instytut Badawczy, Poznań

Szacuje się, że straty w uprawach roślin gospodarczo-ważnych spowodowane porażeniem przez różne gatunki patogenów wynoszą około 60 bilionów dolarów rocznie. Wirusy są patogenami wewnątrzkomórkowymi i brak jest środków chemicznych umożliwiających ich bezpośrednio zwalczanie stąd też ochrona roślin polega na szeroko pojętej profilaktyce. Jednym z jej elementów jest szybka i skuteczna diagnostyka, która pozwala na wczesne wykrycie wirusów w uprawie lub materiale propagacyjnym i podjęcie odpowiednich działań zapobiegawczych. Duże zróżnicowanie genetyczne populacji niektórych gatunków wirusów uniemożliwia ich wykrywanie dotąd stosowanymi metodami stąd też konieczne jest opracowywanie nowych, czułych technik, pozwalających na wykrywanie szerokiego spektrum izolatów. W ostatnich latach nastąpił intensywny rozwój metod diagnostycznych, w których wykorzystuje się techniki biologii molekularnej umożliwiające szybkie wykrywanie wirusów występujących często w niskiej koncentracji (qPCR, izotermiczna amplifikacja kwasów nukleinowych) oraz ich różnicowanie. Opracowanie danej techniki jest zawsze poprzedzone szczegółową analizą struktury genetycznej danego gatunku wirusa, tak aby możliwe było wykrycie jak najszerszego spektrum izolatów. Wiedza ta umożliwia wskazanie zachowawczych regionów w genomach odpowiednich do zaprojektowania starterów i/lub sond molekularnych. Izotermiczna metoda amplifikacji kwasów nukleinowych (ang. *loop mediated isothermal amplification*, LAMP) polega na przeprowadzeniu reakcji w warunkach stałej temperatury z wykorzystaniem dwóch lub trzech par starterów. Technika ta charakteryzuje się dużą czułością oraz specyficnością, a wydajność amplifikacji jest bardzo wysoka, zwykle wyższa niż w przypadku PCR. Reakcja jest prowadzona w stałej temperaturze (np. w łaźni wodnej), nie wymaga więc stosowania drogiego sprzętu. Wizualizacji produktów reakcji można dokonać np. poprzez stosowanie barwników interkalujących do DNA stąd też technika ta może być stosowana bezpośrednio w warunkach polowych i szklarniowych. Nowoczesnym narzędziem pozwalającym na identyfikację nowych, nieznanych patogenów lub nowopowstałych wariantów genetycznych jest sekwencjonowanie nowej generacji. (ang. *next generation sequencing*). Technologia ta umożliwia wykrycie całej populacji patogenów z danej, porażonej próbki roślinnej poprzez analizę sekwencji nukleotydów otrzymanych w wyniku tzw. „głębokiego sekwencjonowania”. W efekcie otrzymuje się ogromne ilości sekwencji, które są następnie poddane zaawansowanym analizom bioinformatycznym co umożliwia określenie jakim patogenem (patogenami) porażona jest roślina oraz uzyskanie sekwencji ich genomów i zakwalifikowanie do odpowiednich rodzin lub utworzenie nowych jednostek taksonomicznych. Metoda ta przyspiesza znacznie cały proces identyfikacji patogena, poznanie sekwencji jego genomu i następnie opracowanie bardziej rutynowych testów diagnostycznych. Zastosowanie tej techniki umożliwiło zidentyfikowanie nowych, do tej pory nieopisanych gatunków wirusów w Polsce.