

**SPRAWOZDANIE MERYTORYCZNE****z realizacji zadania na rzecz postępu biologicznego w produkcji roślinnej w 2019 roku****A. INFORMACJE OGÓLNE**

Tytuł zadania: Występowanie dotychczas nie monitorowanych wirusów (HpLV, ArMV) i wiroidów (HpSVd, AFCVd, CBCVd) na plantacjach produkcyjnych chmielu w Polsce.
Numer zadania: <i>(w załączniku nr 8 do rozporządzenia Ministra Rolnictwa i Rozwoju Wsi z dnia 29 lipca 2015 r. w sprawie stawek dotacji przedmiotowych dla różnych podmiotów wykonujących zadania na rzecz rolnictwa (Dz. U. poz. 1170 z późn. zm.))</i> <b>107</b>
Planowany okres realizacji zadania: <b>2019 r.</b>
Planowane nakłady w zł: <b>298 800</b>

**B. DANE WNIOSKODAWCY**

Imię i nazwisko osoby reprezentującej jednostkę badawczą, (tytuł lub stopień naukowy, stanowisko, nazwa i adres jednostki badawczej, telefon, fax)
<b>Wiesław Aleksander Oleszek, prof. dr hab. czł. koresp. PAN</b> <b>Dyrektor</b> <b>Instytut Uprawy Nawożenia i Gleboznawstwa – Państwowy Instytut Badawczy</b> <b>ul. Czartoryskich 8</b> <b>24-100 Puławy</b> <b>tel. 81 4786 700</b> <b>fax: 81 4786 900</b>

## C. INFORMACJA O WYKONAWCACH

### 1. Zespół badawczy

kierownik zadania		
imię i nazwisko	stopień i tytuł naukowy	miejsce zatrudnienia
Marcin Przybyś	dr	IUNG-PIB
wykonawcy zadania		
imię i nazwisko	stopień i tytuł naukowy	miejsce zatrudnienia
Urszula Skomra	dr	IUNG-PIB
Grażyna Korbecka-Glinka	dr	IUNG-PIB
Teresa Doroszewska	prof. dr hab.	IUNG-PIB

### 2. Kierownik zadania

Marcin Przybyś, dr  
Instytut Uprawy Nawożenia i Gleboznawstwa – Państwowy Instytut Badawczy  
Zakład Hodowli i Biotechnologii Roślin  
ul. Czartoryskich 8  
24-100 Puławy  
tel. 81 4786 934  
tel. sekretariat: 81 4786 931  
e-mail: mprzybys@iung.pulawy.pl

Kontakt w przypadku nieobecności kierownika zadania  
Urszula Skomra, dr  
Instytut Uprawy Nawożenia i Gleboznawstwa – Państwowy Instytut Badawczy  
Zakład Hodowli i Biotechnologii Roślin  
ul. Czartoryskich 8  
24-100 Puławy  
tel. 81 4786 943

## D. OPIS ZADANIA

### 1. Cele zadania

Lp.	Cel	Czy cel został zrealizowany (tak/nie <sup>1</sup> /częściowo <sup>1</sup> )
1	Ocena szkodliwości chorób wirusowych dla polskich plantacji chmielu, poprzez określenie występowania w Polsce wirusów (HpLV i ArMV) oraz wiroidów (CBCVd, HpSVd, AFCVd).	tak
2	Opracowanie narzędzi diagnostycznych pozwalających na jednoczesne wykrywanie trzech wiroidów oraz narzędzi do jednoczesnego wykrywania dwóch wirusów	tak
3	Uzyskanie bibliotek, które będą użyte do analizy wiromu chmielu za pomocą sekwencjonowania NGS	tak

<sup>1</sup> Jeśli dotyczy – proszę opisać pod tabelą, w jakim stopniu cel został osiągnięty i podać przyczyny

## 2. Harmonogram realizacji zadania

Lp.	Nazwa tematu badawczego	Termin rozpoczęcia – zakończenia realizacji tematu badawczego w miesiącach od rozpoczęcia realizacji zadania	Przewidywane koszty realizacji tematu badawczego
1	Gromadzenie próbek chmielu z plantacji produkcyjnych i banku genów	IV - IX	26 800
2	Opracowanie metody multiplex RT-PCR wykrywania badanych wirusów i wiroidów	I - VI	39 000
3	Wykrywanie patogenów chmielowych w 900 próbkach zgromadzonych w trakcie sezonu wegetacyjnego	VII - XII	134 000
4	Przygotowanie bibliotek do sekwencjonowania NGS cząsteczek RNA z próbek chmielu	I-XII	99 000
<b>Razem</b>			<b>298 800</b>

## 3. Opis tematów badawczych

### 3. 1. Temat badawczy 1

**Cel tematu badawczego 1:** Gromadzenie próbek chmielu z plantacji produkcyjnych i banku genów

Plantacje chmielu w Polsce mogą być zagrożone przez nowe patogeny. Celem tego tematu badawczego jest gromadzenie próbek chmielu z różnych rejonów uprawy chmielu oraz w różnych fazach rozwojowych. Próbki posłużą jako materiał badawczy do wykrywania wirusów i wiroidów chmielu.

Cel tematu badawczego 1 został osiągnięty.

#### **Materiały i metody**

Próbki roślin chmielu pobierano z plantacji produkcyjnych zlokalizowanych we wszystkich rejonach uprawy chmielu w Polsce: lubelskim, dolnośląskim, wielkopolskim. Próbki pobierano zarówno z odmian typu goryczkowego jak i aromatycznego. Dodatkowo gromadzono próbki z kolekcji odmian chmielu utrzymywanej w IUNG-PIB w Puławach. Próbki chmielu gromadzono 3-krotnie w trakcie sezonu wegetacyjnego, ponieważ niektóre patogeny są możliwe do wykrycia tylko w określonych stadiach rozwojowych rośliny. Pierwszy termin obejmował okres naprowadzania roślin chmielu na przewodniki, drugi obejmował fazę kwitnienia, a trzeci fazę dojrzałości. Próbki w postaci liści z różnych pięter rośliny pobierano do sterylnych probówek typu Falcon i jeszcze na plantacji schładzano do 4°C, a następnie transportowano do laboratorium. W laboratorium odważano po 50 mg materiału z kilku liści i umieszczano go w probówkach typu Eppendorf wypełnionych 6 kulkami ceramicznymi o średnicy 2,8 mm. Tak przygotowane próbki zamrażano w -86°C i w takiej temperaturze były one przechowywane do czasu wykonania analiz molekularnych.

#### **Wyniki**

Ogółem w roku 2019 zgromadzono 904 próbki chmielu (Tab. 1). Próbki gromadzono zarówno z roślin z różnymi objawami chorobowymi jak i z roślin bezobjawowych

Tab. 1. Próbki chmielu zgromadzone w ramach realizacji tematu badawczego 1:

Rejon uprawy	Odmiany i linie hodowlane chmielu				Ogółem
	aromatyczne		goryczkowe		
Lubelski	Lomik	36	Marynka	150	540
	Lubelski	96	Magnum	201	
	Perle	33			
	Sybilla	24			
Wielkopolski	Lubelski	15	Marynka	30	201
	Perle	15	Magnum	126	
	Hallertau Tradition	15			
Dolnośląski	Lubelski	30	Marynka	36	159
	Hallertau Tradition	36	Magnum	57	
Kol. IUNG-PIB	Sybilla	2	Oktawia	2	4
	Razem	302		602	

W roku 2019, próbki pobrano z 31 plantacji produkcyjnych i kolekcji odmian IUNG-PIB, o łącznym areale 53 ha.

## Dyskusja

Różne patogeny mogą być wykrywalne w zakażonych roślinach chmielu w różnych stadiach rozwojowych rośliny. HpLV jest wirusem trudnym do diagnostyki. Możliwość jego wykrycia jest zależna od stadium rozwojowego zakażonej rośliny. W roku 2018 w trakcie realizacji zadania 107 w ramach badań na rzecz postępu biologicznego w produkcji roślinnej wykrycie HpLV w badanych próbkach było możliwe tylko w 2 i 3 terminie zbioru próbek. Podobna sytuacja miała miejsce w obecnych badaniach. Podobną zależność obserwowali również Ziegler i in., 2014 oraz Tsai i in., 2012, którzy stwierdzili, że HpLV najłatwiej wykryć pobierając próbki w postaci dojrzałych liści z dolnej jej części, w drugiej połowie okresu wegetacyjnego. W przypadku detekcji ArMV, próbki liści najlepiej pobierać w okresie wiosennym, bo tylko wtedy możliwe jest stwierdzenie porażenia tym wirusem (Wetzel i in., 2002). Na temat optymalnego czasu dla pobierania pozostałych badanych patogenów brak jest danych literaturowych dlatego przyjęto strategię pobierania próbek do badań w 3 terminach sezonu wegetacyjnego. W tym celu każdą roślinę, z której pobierano próbkę do badań oznaczano etykietą, aby możliwe było pobranie 2 dodatkowych próbek w późniejszym terminie.

## Wnioski

- Z uwagi na nierównomierne rozmieszczenie badanych patogenów w tkankach gospodarza oraz ze względu na ograniczenia możliwości detekcji tych patogenów uzależnione od terminu gromadzenia próbek, należy pobierać próbki w kilku terminach z kilku miejsc na roślinie (pęd główny i boczne, różne piętra rośliny)

Mierniki dla tematu badawczego 1:

Lp.	miernik <sup>2</sup>	wartość miernika podana w opisie zadania	wartość miernika zrealizowana
1.1	Liczba próbek pobranych z plantacji produkcyjnych i kolekcji odmian	900	904

<sup>2</sup> Podać miernik – np. ilość testów, prób, badanych genotypów etc.

### 3.2 Temat badawczy 2

#### Cel tematu badawczego 2

Celem tematu badawczego było opracowanie narzędzi diagnostycznych pozwalających na jednoczesne wykrywanie trzech wiroidów (CBCVd, HpSVd, AFCVd) oraz narzędzi do jednoczesnego wykrywania dwóch wirusów chmielu (HpLV i ArMV).

Cel tematu badawczego 2 został osiągnięty.

#### Materiały i metody

Zgromadzone w IUNG-PIB kontrole pozytywne badanych patogenów posłużyły do opracowania metody wykrywania poszczególnych patogenów.

#### Multiplex PCR w kierunku wykrywania wiroidów chmielu (HSVd, CBCVd, AFCVd)

##### Odwrotna transkrypcja

W celu uzyskania cDNA, RNA wiroidów poddano reakcji odwrotnej transkrypcji. Reakcję prowadzono w następujący sposób. Do 6  $\mu$ l wody sterylnej pozbawionej RN-az dodawano 4  $\mu$ l mieszaniny specyficznych starterów w odwróconej orientacji, których stężenie końcowe wynosiło 1  $\mu$ M (HSVd, CBCVd, AFCVd) i 0,5  $\mu$ M 18S rRNA (Tab.2), 2  $\mu$ l RNA (0,5  $\mu$ g/ $\mu$ l) oraz 1  $\mu$ l mieszaniny dNTP 10 mM (Invitrogen, USA). Całość mieszaniny inkubowano w temperaturze 65°C przez 5 minut, a następnie schładzano na lodzie przez 1 minutę. Do schłodzonej mieszaniny dodawano 4  $\mu$ l buforu 5x First-Strand (Invitrogen), 1  $\mu$ l 0,1M DTT (Invitrogen), 1  $\mu$ l RNasin (40 u/ $\mu$ l) – inhibitora RN-az (ThermoFisher Scientific) oraz 1  $\mu$ l odwrotnej transkryptazy M-MLV Superscript III (200 u/ $\mu$ l) (Invitrogen). Końcowa objętość mieszaniny reakcyjnej wynosiła 20  $\mu$ l. Reakcję odwrotnej transkrypcji prowadzono w temperaturze 50°C przez 60 min, po czym ogrzewano do 70°C przez 15 minut, w celu zatrzymania reakcji i denaturacji odwrotnej transkryptazy.

Tab. 2 Startery reakcji PCR użyte do jednoczesnego wykrywania wiroidów chmielu:

Patogen	Starter	Sekwencja (5'-3')	Produkt (pz)	Literatura
HSVd	HSV-78P	AACCCGGGGCAACTCTTCTC	303	Sano i in. 2001
	HSV-83 M	AACCCGGGGCTCCTTTCTCA		
AFCVd	AGV-h106M	TTGTCGACGAAGGGTCCTCA	382	Sano i in. 2008
	AGV-h101P	TTGTCGACGACGAGTCACCA		
CBCVd	CVd-IV-F1	GGGGAAATCTCTTCAGAC	284	Bernad i Duran-Vila, 2006
	CVd-IV-R1	GGGGATCCCTCTTCAGGT		
18S rRNA	18S-F	CGCATCATTCAAATTTCTGC	844	Gambino i Gribaudo, 2006
	18S-R	TTCAGCCTTGCGACCATACT		

##### Amplifikacja DNA

Amplifikację DNA prowadzono przy użyciu 2  $\mu$ l cDNA uzyskanego w odwrotnej transkrypcji, 25  $\mu$ l Platinum Green Hot Start PCR 2x Master Mix (Invitrogen), po 0,5  $\mu$ M (HSVd, CBCVd, AFCVd) i 0,1  $\mu$ M (18S rRNA) specyficznych starterów reakcji PCR (Tab. 2). Mieszaninę reakcyjną uzupełniano wodą wolną od nukleaz do objętości końcowej 50  $\mu$ l. Reakcję PCR prowadzono w następujących warunkach: denaturacja wstępna 94°C przez 2 minuty, następnie 35 cykli: denaturacja 94°C przez 30 sekund, przyłączanie starterów 56°C przez 30 sekund, elongacja 72°C przez 30 sekund i końcowa elongacja 72°C przez 10 minut.

## Multiplex PCR w kierunku wykrywania wirusów chmielu (HpLV, ArMV)

### Odwrotna transkrypcja

Syntezę cDNA prowadzono w następujący sposób. Do 7  $\mu$ l wody sterylnej pozbawionej RN-az dodawano 3  $\mu$ l mieszaniny specyficznych starterów w odwróconej orientacji o stężeniu końcowym 2  $\mu$ M (ArMV) i 0,8  $\mu$ M (HpLV, 18S rRNA) (Tab.3), 2  $\mu$ l RNA (1  $\mu$ g/ $\mu$ l) oraz 1  $\mu$ l mieszaniny dNTP 10 mM (Invitrogen, USA). Całość mieszaniny inkubowano w temperaturze 65°C przez 5 minut, a następnie schładzano na lodzie przez 1 minutę. Do schłodzonej mieszaniny dodawano 4  $\mu$ l buforu 5x First-Strand (Invitrogen), 1  $\mu$ l 0,1M DTT (Invitrogen), 1  $\mu$ l RNasin (40 u/ $\mu$ l) – inhibitora RN-az (ThermoFisher Scientific) oraz 1  $\mu$ l odwrotnej transkryptazy M-MLV Superscript III (200 u/ $\mu$ l) (Invitrogen). Końcowa objętość mieszaniny reakcyjnej wynosiła 20  $\mu$ l. Reakcję odwrotnej transkrypcji prowadzono w temperaturze 50°C przez 60 min, po czym ogrzewano do 70°C przez 15 minut, w celu zatrzymania reakcji i denaturacji odwrotnej transkryptazy.

Tab. 3 Startery reakcji PCR użyte do wykrywania wirusów chmielu:

Patogen	Starter	Sekwencja (5'-3')	Produkt (nt)	Literatura
ArMV	ArMV-F	ACCAGTGCCTACAAGAGTGTGTCC	213	Komínek i in. 2003
	ArMV-R	TTGATTCCAGTTGTTAGTGACCCC		
HpLV	HpLV 5'Mlu	CGCACGCGTGGATAAACAACATACAA	1116	Ziegler i in. 2014
	HpLV 3'-1100	GCTTAGCAATTGCGGATTGCAC		
18S rRNA	18S-F	CGCATCATTCAAATTTCTGC	844	Gambino i Gribaudo, 2006
	18S-R	TTCAGCCTTGCGACCATACT		

### Amplifikacja DNA

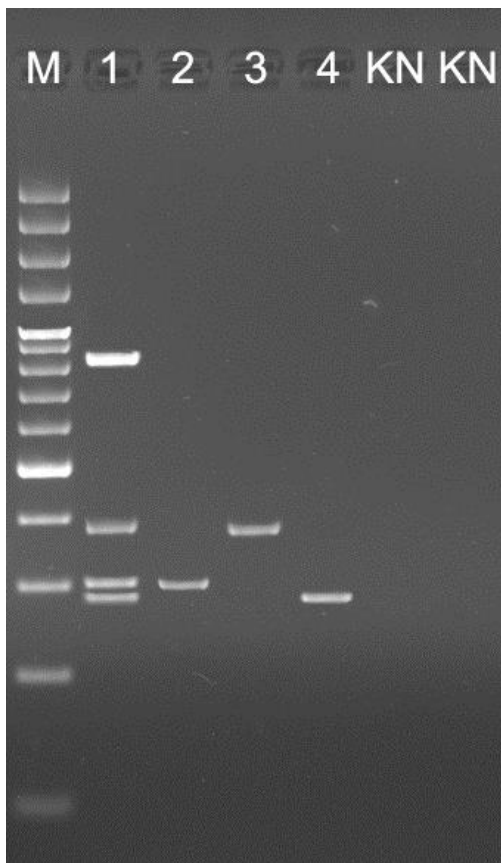
Amplifikację DNA prowadzono przy użyciu 2  $\mu$ l cDNA uzyskanego w odwrotnej transkrypcji, 25  $\mu$ l Platinum Green Hot Start PCR 2x Master Mix (Invitrogen), po 0,2  $\mu$ M (HpLV), 0,3  $\mu$ M (18s rRNA), 0,6  $\mu$ M (ArMV) specyficznych starterów reakcji PCR (Tab. 3). Mieszaninę reakcyjną uzupełniano wodą wolną od nukleaz do objętości końcowej 50  $\mu$ l. PCR prowadzono w następujących warunkach: denaturacja wstępna 94°C przez 2 minuty, następnie 35 cykli: denaturacja 94°C przez 30 sekund, przyłączanie starterów 60°C przez 30 sekund, elongacja 72°C przez 1 minutę i końcowa elongacja 72°C przez 10 minut.

Amplikony uzyskane w reakcji PCR analizowano na 2% żelu agarozowym wybarwionym bromkiem etydyny i wizualizowano w świetle UV.

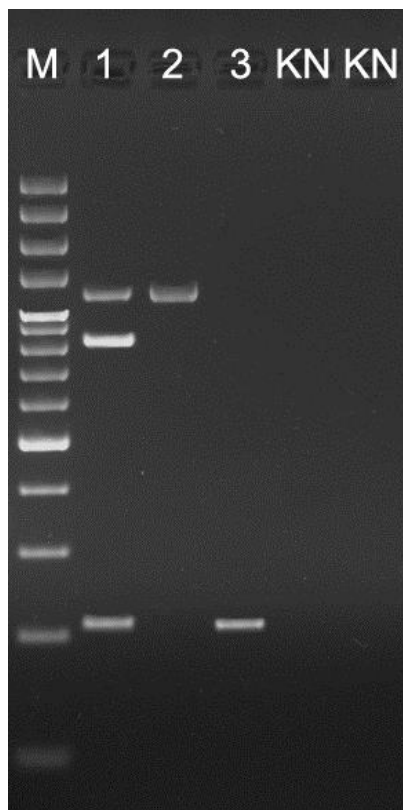
### Wyniki

W wyniku prowadzonych badań opracowano i zoptymalizowano warunki reakcji multiplex PCR dla jednoczesnego wykrywania wiroidów (HSVd, CBCVd, AFCVd) z kontrolą wewnętrzną RNA roślinnego oraz jednoczesnego wykrywania wirusów (HpLV, ArMV) z kontrolą wewnętrzną.

W efekcie uzyskano amplikony wszystkich badanych patogenów. Na fot. 1 i fot. 2 przedstawiono odpowiednio zdjęcie żeli agarozowych z jednocześnie widocznymi amplikonami wszystkich oznaczanych wiroidów wraz z kontrolą wewnętrzną oraz samych wiroidów lub wirusów.



Fot. 1. Wizualizacja produktów multiplex RT-PCR wiroidów chmielu (HSVd, CBCVd, AFCVd) z kontrolą wewnętrzną roślinnego rRNA. M – marker długości DNA, 1 – multiplex HSVd+AFCVd+CBCVd+18S rRNA, 2 – HSVd, 3 – AFCVd, 4 – CBCVd, KN – kontrola negatywna.



Fot. 2. Wizualizacja produktów multiplex RT-PCR wirusów chmielu (HpLV, ArMV) z kontrolą wewnętrzną roślinnego rRNA. M – marker długości DNA, 1 – multiplex HpLV+ArMV+18S rRNA, 2 – HpLV, 3 – ArMV, KN – kontrola negatywna.

## Dyskusja

Do detekcji wszystkich wiroidów: HSVd, CBCVd, AFCVd wykorzystano startery, które amplifikowały pełne genomy patogenów (Sano i in., 2001, Bernad i Duran-Vila, 2006, Sano i in., 2008). W efekcie uzyskano amplikony o długościach odpowiednio: 303 pz, 284 pz i 382 pz. Z uwagi na małe rozmiary genomów wiroidów amplifikacja ich w całości nie sprawiała trudności. Również Matoušek i in. (2003) oraz Luigi i Faggioli (2013), w celu wykrycia infekcji winorośli przez wiroidy amplifikowali pełną długość genomu wiroidów. Możliwe jest również wykrywanie HSVd bezpośrednio po izolacji RNA z liści bez etapu RT-PCR poprzez poddanie surowego ekstraktu elektroforezie na żelu poliakrylamidowym z wybarwianiem za pomocą srebra (Sano i in., 2004). Chociaż znane są metody multiplex PCR jednoczesnego wykrywania zakażeń roślin różnymi patogenami: jabłek (DiSerio i in., 2002), cytrusów (Wang i in., 2009), pomidorów (Matsushita i in., 2010), czy winorośli (Gambino i Gribaudo, 2006) lub chmielu (Lu i in., 2012), to nie było dotychczas opracowanej metody jednoczesnego oznaczania zestawu wiroidów: HSVd, AFCVd i CBCVd. W ramach realizacji tego tematu badawczego opracowano metodę multiplex PCR dla tego zestawu wiroidów. Dodatkowo w prowadzonych badaniach dodano możliwość zastosowania kontroli wewnętrznej monitorującej przebieg odwrotnej transkrypcji i multiplex PCR. Jako kontrolę wewnętrzną wykorzystano pochodzący od rośliny chmielu gen metabolizmu podstawowego kodujący 18S rRNA. Znaczenie kontroli wewnętrznej jest istotne szczególnie w przypadku uzyskiwania wyników fałszywie negatywnych w przypadku degradacji RNA lub obecności inhibitorów odwrotnej transkryptazy lub polimerazy DNA. Drugą część realizacji tematu badawczego było opracowanie multiplex PCR dla jednoczesnego wykrywania HpLV i ArMV. Do detekcji HpLV wykorzystano startery HpLV 5'Mlu i HpLV 3'-1100, które amplifikowały 5'-koniec genomu tego wirusa (1116 pz). Projektowanie tych starterów oparto o gen kodujący metylotransferazę, który jest silnie konserwowany ewolucyjnie (Schuman, 2002). Hataya (2000), do wykrywania HpLV stosował zdegenerowane startery reakcji, jednakże poza HpLV wykrywały one także wirusa M ziemniaka (PVM) oraz wirusa oparzeliny borówki wysokiej (BIScV). W celu wykrycia ArMV amplifikowano wysoce konserwatywny region kodujący białko płaszczka (CP) przy użyciu starterów ArMV-F i ArMV-R. W efekcie uzyskiwano amplikony o długości 213 pz, ale do detekcji ArMV, mogą być stosowane również inne fragmenty tego genu (Ipach i in., 1992, Grieco i in., 2000). Sun i in. (2014), do detekcji ArMV zaproponowali wykorzystanie multiplex Real-Time PCR z zastosowaniem sond typu TaqMan zlokalizowanych w rejonie genu MP – movement protein.

## Wnioski

- Zastosowanie zoptymalizowanych protokołów zamieszczonych w sprawozdaniu umożliwia jednoczesną detekcję wszystkich badanych wiroidów lub wirusów z jednoczesną kontrolą przebiegu procesu odwrotnej transkrypcji i multiplex PCR

Mierniki dla tematu badawczego 2:

Lp.	miernik <sup>3</sup>	wartość miernika podana w opisie zadania	wartość miernika zrealizowana
2.1	Liczba protokołów metody wykrywania dwóch wirusów (HpLV i ArMV) oraz trzech wiroidów (CBCVd, HSVd, AFCVd)	2 protokoły	2 protokoły

<sup>3</sup> Podać miernik – np. ilość testów, prób, badanych genotypów etc.



### 3.3 Temat badawczy 3

#### Cel tematu badawczego 3

Celem tematu badawczego była ocena występowania wirusów (HpLV i ArMV) oraz wiroidów (CBCVd, HpSVd, AFCVd) na plantacjach chmielu w Polsce.

Cel tematu badawczego 3 został osiągnięty.

#### Materialy i metody

Próbki polowe zgromadzone w temacie badawczym nr 1 do momentu analiz molekularnych przechowywano w  $-86^{\circ}\text{C}$ , a następnie schładzano w ciekłym azocie i rozdrabniano w homogenizatorze Tissue Lyser (Qiagen, Niemcy) przy częstotliwości wytrząsania 30 Hz przez 3 minuty. Zhomogenizowany materiał poddawano izolacji całkowitego RNA z wykorzystaniem zestawów do izolacji RNA – RNeasy PowerPlant Kit (Qiagen), zgodnie z procedurą zalecaną przez producenta. Z uwagi na znaczne ilości związków fenolowych zawartych w liściach chmielu, zredukowano objętość buforu lizującego MBL/ $\beta$ -ME z 600  $\mu\text{l}$  do 550  $\mu\text{l}$  i dodawano 50  $\mu\text{l}$  Phenolic Separation Solution, aby zapobiec tworzeniu się kompleksów kwasów nukleinowych z utlenionymi związkami fenolowymi, co powodowałoby zmniejszenie ilości izolowanego RNA.

Wyzolowane RNA doczyszczano z pozostałości DNA za pomocą zestawu DNase Max (Qiagen), zgodnie z procedurą zalecaną przez producenta. Następnie oczyszczone RNA było używane do uzyskania cDNA w reakcji odwrotnej transkrypcji zgodnie z procedurami opracowanymi w temacie badawczym nr 2. Uzyskane cDNA było wykorzystywane do amplifikacji DNA, w celu wykrycia badanych patogenów w polowych próbkach chmielu. Warunki prowadzenia reakcji PCR były zgodne z opracowanymi w temacie badawczym nr 2.

#### Wyniki

Na podstawie przeprowadzonych badań w 2019 r. stwierdzono występowanie na terenie Polski przypadków porażenia roślin chmielu jedynie przez utajony wirus chmielu (*Hop latent virus*, HpLV). Występowanie wirusa HpLV stwierdzono w lubelskim i dolnośląskim rejonie uprawy chmielu w Polsce (Tab. 4). Na terenie lubelskiego rejonu uprawy chmielu występowanie HpLV stwierdzono na plantacjach produkcyjnych gdzie uprawiana była odmiana Marynka, a w rejonie dolnośląskim na 2 plantacjach, na których były uprawiane odmiany Hallertau Tradition i Magnum. HpLV wykryto w próbkach gromadzonych w drugim i trzecim terminie zbioru.

Ogółem w 2019 r. HpLV wykryto w 3 próbkach pochodzących z 3 plantacji produkcyjnych.

Tab. 4. Występowanie wirusów i wiroidów w chmielu w Polsce.

Rejon uprawy	Patogen					
	HpLV			HSVd		
	Odmiana	WNP*	l. próbek	Odmiana	WNP*	l. próbek
Lubelski	Marynka	1	1		0	0
Wielkopolski	Marynka	0	0	Magnum	0	0
Dolnośląski	Hallertau Tradition	1	1		0	0
	Magnum	1	1			
Kol. IUNG-PIB		0	0		0	0
	Razem	3	3		0	0

\* WNP – liczba plantacji na jakiej stwierdzono występowania patogena,

W roku 2019 r. w żadnej z badanych próbek nie stwierdzono obecności wirusa mozaiki gęsiówki (*Arabis mosaic virus*, ArMV), wiroida karłowatości chmielu (HSVd), wiroida wyboistości jabłek (*Apple fruit crinkle viroid*, AFCVd) oraz wiroida pęknięcia kory cytrusowych (*Citrus bark cracking viroid*, CBCVd).

### Dyskusja

Monitoring występowania chorób wirusowych u roślin jest bardzo istotnym działaniem mającym wspierać wczesne wykrywanie zagrożeń i zapobieganie późniejszemu rozprzestrzenianiu się chorób. Uzyskane wyniki wskazują, że największym zagrożeniem upraw chmielu w Polsce jest HpLV. Pomimo nie stwierdzenia w 2019 r. obecności HSVd, CBCVd, AFCVd i ArMV nie można wykluczyć, że ten problem nie istnieje szczególnie, że zakażenia tymi patogenami są znane w Europie (Pethybridge, 2008, Radisek, 2012).

Wirus utajony chmielu (HpLV) należy do rodzaju *Carlavirus*. Wirus ten pierwszy raz w historii został opisany już w latach sześćdziesiątych XX wieku (Schmidt, 1966). Obecnie znane są przypadki jego występowania we Francji (Eppler, 1989), Nowej Zelandii (Hay i in., 1992), Australii (Pethybridge, 2000), Chinach (Yu i Liu, 1987), Południowej Afryce (Von Weschmar i in., 1989) i Japonii (Kanno i in., 1993). Zakażenie chmielu tym wirusem jest niebezpieczne ponieważ nie wywołuje żadnych widocznych objawów przez co może rozprzestrzeniać się na plantacji w sposób niekontrolowany. (Ziegler, i in. 2014). Jedynie na odmianie Hersbrucker Spät stwierdzono sporadycznie występujące plamki na liściach (Eppler, 1989). Wirus przenoszony jest przez mszyce w sposób nierwały. Głównym wektorem jest mszyca śliwowo-chmielowa (*Phorodon humuli*) (Adams i Barbara, 1982). Inne wektory, to mszyca brzoskwińczo-ziemniaczana (*Myzus persicae*) i mszyca ziemniaczana (*Macrosiphum euphorbiae*) (Crowle i in., 2006). HpLV nie ma innych poza chmielem naturalnych gospodarzy.

Ponieważ nieznanne są genetyczne źródła odporności na badane patogeny, dlatego ważne jest utrzymywanie wysokiej zdrowotności plantacji poprzez stosowanie wysokiej jakości materiału sadzonkowego i przestrzeganie zaleceń fitosanitarnych, co będzie chroniło plantacje przed zakażeniem, a potem rozprzestrzenianiem się infekcji.

### Wnioski

- Występowanie HpLV na plantacjach produkcyjnych stwierdzono w lubelskim i dolnośląskim rejonie uprawy chmielu w Polsce
- Na plantacjach chmielu w Polsce w roku 2019 nie stwierdzono występowania ArMV, HSVd, AFCVd i CBCVd
- Z uwagi na pojawiające się w ostatnich latach doniesienia dotyczące pojawiania się nowych nieobecnych dotąd w Europie patogenów jak HSVd, czy CBCVd należy prowadzić stały monitoring zdrowotności roślin chmielu na plantacjach produkcyjnych.
- W przypadku stwierdzenia obecności zakażonych roślin na plantacji należy rośliny zainfekowane i te z najbliższego sąsiedztwa usuwać z plantacji
- Do zakładania nowych plantacji lub wymiany nasadzeń na istniejących plantacjach należy stosować odwirusowany materiał sadzonkowy wysokiej jakości

Mierniki dla tematu badawczego 3:

Lp.	miernik <sup>4</sup>	wartość miernika podana w opisie zadania	wartość miernika zrealizowana
3.1	Liczba przeprowadzonych testów wykrywania badanych patogenów	1800 testów	1808 testów

<sup>4</sup> Podać miernik – np. ilość testów, prób, badanych genotypów etc.

### **3.4 Temat badawczy 4**

#### **Cel tematu badawczego 4**

Celem tematu badawczego było uzyskanie bibliotek do sekwencjonowania NGS cząsteczek RNA z próbek chmielu.

Cel tematu badawczego 4 został osiągnięty.

#### **Materiały i metody**

Do przygotowania bibliotek przygotowano rozcieńczenia RNA o stężeniu 0,5 µg/10µl i dodawano po 5 µl rRNA Binding Buffer oraz 5 µl rRNA Removal Mix – Plant. Mieszaninę poddawano denaturacji RNA w 65°C przez 5 minut, a następnie kontynuowano inkubację w temperaturze pokojowej przez 1 minutę. Następnie do 35 µl rRNA Removal Beads przenoszono 20 µl zdenaturowanego RNA i inkubowano w temperaturze pokojowej przez 1 minutę, po czym próbki umieszczano w statywie magnetycznym na 1 minutę. Supernatant po deplecji rRNA przenoszono do nowych próbek, dodawano po 99 µl RNA CleanXP beads i inkubowano w temperaturze pokojowej przez 15 minut. Po okresie inkubacji próbki umieszczano w statywie magnetycznym na 5 minut. Kiedy wszystkie kulki osiadły na ściance próbki cały supernatant odrzucano, a kulki przemywano 200 µl 70% etanolu, inkubowano przez 30 sekund, po czym cały supernatant odrzucano, a kulki suszono w temperaturze pokojowej przez 15 minut, po czym próbki wyjmowano ze statywu magnetycznego. Do wysuszonych kulek dodawano 11 µl Elution Buffer i inkubowano przez 2 minuty w temperaturze pokojowej. Następnie próbki ponownie umieszczano w statywie magnetycznym na 5 minut, po czym 8,5 µl supernatantu przenoszono do nowych próbek, dodawano do nich 8,5 µl Elute, Prime, Fragment High Mix i inkubowano przez 8 minut w 94°C, po czym schładzano do 4°C. Do schłodzonych próbek dodawano po 8 µl mieszaniny First Strand Synthesis Mix D z odwrotną transkryptazą SuperScript II (w stosunku 9:1) i inkubowano przez 10 minut w 25°C, następnie 15 minut w 42°C, przez 15 minut w 70°C i schładzano do 4°C.

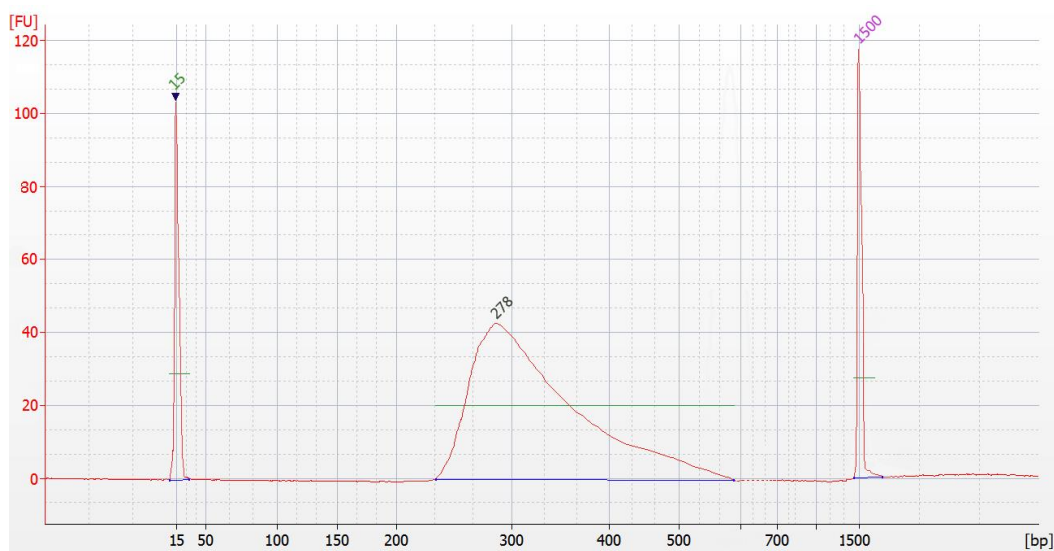
W kolejnym kroku dodawano 5 µl 50-krotnie rozcieńczonego End Repair Control oraz 20 µl Second Strand Marking Master Mix i inkubowano 60 minut w 16°C. Po inkubacji do próbek dodawano 90 µl AMPure XP beads i inkubowano w temperaturze pokojowej przez 15 minut, po czym próbki umieszczano w statywie magnetycznym na 5 minut. 135 µl supernatantu odrzucano, przemywano 200 µl 80% etanolu, inkubowano przez 30 sekund, supernatant odrzucano, a płukanie powtarzano. Po płukaniu supernatant odrzucano, a próbki suszono przez 15 minut i po tym czasie usuwano ze statywu magnetycznego. Do próbek dodawano 17,5 µl Resuspension Buffer, mieszaninę inkubowano w temperaturze pokojowej przez 2 minuty i umieszczano w statywie magnetycznym na 5 minut. 15 µl supernatantu – dwuniciowego cDNA, przenoszono do nowych próbek. W celu adenylacji 3'- końców, do próbek dodawano po 2,5 µl 100-krotnie rozcieńczonego A-Tailing Control i 12,5 µl A-Tailing Mix i inkubowano w 37°C przez 30 minut, 5 minut w 70°C i schładzano do 4°C. Do próbek dodawano po 2,5 µl 100-krotnie rozcieńczonego Ligation Control, 2,5 µl Ligation Mix, i 2,5 µl RNA adapter Mix, inkubowano w 30°C przez 10 minut, a następnie dodawano po 5 µl Stop Ligation Buffer, w celu inaktywacji procesu przyłączania adapterów do sekwencjonowania. W celu oczyszczenia produktów ligacji adapterów do próbek dodawano po 42 µl AMPure XP Beads, inkubowano w temperaturze pokojowej przez 15 minut, umieszczano w statywie magnetycznym na 5 minut, odrzucano 79,5 µl supernatantu, kulki przemywano 2-krotnie 200 µl 80% etanolu przez 30 sekund, a następnie suszono przez 15 minut. Po wyschnięciu kulek próbki wyjmowano ze statywu magnetycznego, dodawano do nich po 52,5 µl Resuspension Buffer, inkubowano przez 2 minuty, po czym ponownie umieszczano w statywie

magnetycznym na 5 minut. Przenoszono po 50 µl supernatantu do nowych próbek i ponownie dodawano do nich po 50 µl AMPure XP Beads, inkubowano w temperaturze pokojowej przez 15 minut, następnie umieszczano w statywie magnetycznym na 5 minut, odrzucano 95 µl supernatantu, kulki przemywano 2-krotnie 200 µl 80% etanolu przez 30 sekund, a następnie suszono przez 15 minut. Po wyschnięciu kulek próbki wyjmowano ze statywu magnetycznego, dodawano do nich po 22,5 µl Resuspension Buffer, inkubowano przez 2 minuty, po czym ponownie umieszczano w statywie magnetycznym na 5 minut i przenoszono 20 µl supernatantu do nowych próbek.

W celu zwiększenia liczby kopii cząsteczek DNA, które posiadają przyłączone adaptory do sekwencjonowania, do próbek dodawano po 5 µl PCR Primer Cocktail, 25 µl PCR Master Mix i prowadzono ograniczoną reakcję PCR: denaturacja wstępna 98°C przez 30 sekund, 15 cykli – denaturacja 98°C przez 10 sekund, przyłączanie starterów 60°C przez 30 sekund, elongacja 72°C przez 30 sekund, końcowa elongacja 72°C przez 5 minut. Po amplifikacji biblioteki oczyszczano poprzez dodanie po 50 µl AMPure XP Beads i inkubację w temperaturze pokojowej przez 15 minut. Po inkubacji próbki umieszczano na kolejne 5 minut w statywie magnetycznym, następnie odrzucano 95 µl supernatantu, kulki przemywano 2-krotnie 200 µl 80% etanolu przez 30 sekund, a następnie suszono przez 15 minut. Po wyschnięciu kulek próbki wyjmowano ze statywu magnetycznego, dodawano do nich po 32,5 µl Resuspension Buffer, inkubowano przez 2 minuty, po czym ponownie umieszczano w statywie magnetycznym na 5 minut i przenoszono 30 µl supernatantu do nowych próbek.

## Wyniki

W wyniku prowadzonych badań otrzymano 5 bibliotek do sekwencjonowania. W celu określenia poprawności przebiegu wszystkich etapów ich przygotowania przeprowadzono walidację bibliotek poprzez wykonanie elektroforezy kapilarnej (Fot. 3)



Fot. 3. Rozkład wielkości biblioteki do NGS.

## Dyskusja

Metody sekwencjonowania następnej generacji (NGS) oparte na masowym, równoległym sekwencjonowaniu różnorodnych cząsteczek RNA/DNA otwierają nowe możliwości wykrywania patogenów roślinnych. Największą zaletą tych metod jest brak konieczności zakładania *a priori* jaki wirus będzie wykrywany w czasie analiz. Sekwencjonowanie

całkowitego RNA z rośliny zakażonej pozwala na identyfikację RNA wszystkich patogenów w toku analizy bioinformatycznej, przy czym zbiór wirusów i wiroidów zidentyfikowanych w zakażonych roślinach określa się terminem wiromu (ang. virome; Barba, i in., 2014). Alternatywną metodą badania infekcji wirusowych jest badanie wyciszania RNA – mechanizmu obronnego roślin przed zakażeniem, indukowanego podczas infekcji wirusami. Ten mechanizm może być wykorzystany do detekcji nowych wirusów. dsRNA występujące w komórkach rośliny podczas replikacji genomu wirusa jest przetwarzane przez białka Dicer-like do siRNA (małe interferujące RNA), których zadaniem jest znakowanie wirusowych czasteczek RNA do degradacji (Valli et al. 2011). Oznaczanie sRNA (small RNA), w skład którego wchodzi również siRNA może więc zostać wykorzystane do oznaczania infekcji wirusowych.

W RNA wyizolowanym z rośliny dominują sekwencje gospodarza. Opracowano różne metody eliminacji poszczególnych frakcji roślinnego RNA z próbek (Boonham, i in., 2014, Massart, i in., 2014). W badaniach realizowanych w ramach zadania wykorzystano technologię deplekcji – Ribo-Zero firmy Illumina, która w znacznym stopniu eliminuje rRNA chmielu.

## Wnioski

- Zastosowanie zoptymalizowanego protokołu umożliwia uzyskanie bibliotek do sekwencjonowania NGS

Mierniki dla tematu badawczego 4:

Lp.	miernik <sup>5</sup>	wartość miernika podana w opisie zadania	wartość miernika zrealizowana
3.1	Liczba przygotowanych bibliotek	5 bibliotek	5 bibliotek

## 3.5 Literatura

- Adams, A.N., Barbara D.J. 1982. Host range, purification and some properties of two carlaviruses from hop (*Humulus lupulus*): hop latent and American hop latent. *Annual Applied Biology*, 101(3):483-494.
- Barba, M., Czosnek, H., Hadidi, A., 2014. Historical perspective, development and applications of next-generation sequencing in plant virology. *Viruses*, 6: 106-136
- Bernad, L., Duran-Vila, N. 2006. A novel RT-PCR approach for detection and characterization of citrus viroids. *Molecular Cellular Probes*, 20(2):105-113
- Crowle, D.R., Pethybridge S.J., Wilson, C.R. 2006. Transmission of hop latent and hop mosaic carlaviruses by *Macrosiphum euphorbiae* and *Myzus persicae*. *Journal of Phytopathology*, 154:745-747.
- Di Serio F., Malfitano M., Alioto D., Ragozzino A., Flores R. 2002. Apple dimple fruit viroid: sequence variability and its specific detection by multiplex fluorescent RT-PCR in the presence of Apple scar skin viroid. *Journal of Plant Pathology*, 84:27-34.
- Eppler, A. 1989. Presence of viruses in the hop growing region of Alsace (France). Page 209 in: *Proc. Int. Workshop Hop Virus Dis. Giessen*.
- Gambino G., Gribaudo I. 2006. Simultaneous detection of nine grapevine viruses by multiplex reverse transcription-polymerase chain reaction with coamplification of a plant RNA as internal control. *Virology*, 96(11):1223-1229.
- Grieco, F., Alkowni, R., Saponari, M., Savino, V, Martelli, G.P. 2000. Molecular detection of olive viruses. *Eppo Bulletin*, 30:469-473.

<sup>5</sup> Podać miernik – np. ilość testów, prób, badanych genotypów etc.

- Hataya, T., Uchino, K., Arimoto, R., Suda, N., Sano, T., Shikata, E., Uyeda, I. 2000. Molecular characterization of Hop latent virus and phylogenetic relationships among viruses closely related to carlaviruses. *Archives Virology*, 145(12):2503-2524.
- Hay, F. S., Close, R. C., Fletcher, J. D., Ashby, J. W. 1992. Incidence and spread of viruses in hop (*Humulus lupulus* L.) in New Zealand. *N.Z. J. Crop Hort. Sci.* 20:319-327.
- Ipach, U., Altmayer, B., Eichhorn, K.W. 1992. Detection of arabib mosaic virus using the polymerase chain reaction (PCR).
- Kanno, Y., Yoshikawa, N., Takahashi, T. 1993. Some properties of hop latent and apple mosaic viruses isolated from hop plants and their distributions in Japan. *Ann. Phytopathol. Soc. Jpn.* 59:651-658.
- Komínek, P., Svoboda, P., Abou Ghanem-Sabanadzovic, N. 2003. Improved detection of Arabis mosaic virus in grapevine and hop plants. *Acta Virologica*, 47:199-200.
- Matoušek, J., L. Orctová, L., Patzak, J., Svoboda, P., Ludvíková, I. 2003. Molecular sampling of hop stunt viroid (HSVd) from grapevines in hop production areas in the Czech Republic and hop protection. *Plant Soil Environmental* 49:168-75.
- Lu, W., Zhang, Z., Xu, P., Liu, S., Wang, H., Jiang, D., et al., 2012. Simultaneous Detection of Three Viroid Species Infecting Hops in China by Multiplex RT-PCR. *Journal of Phytopathology*, 160: 308-310
- Luigi, M., Faggioli, F. 2013. Development of a quantitative real-time RT-PCR (qRT-PCR) for the detection of hop stunt viroid. *European Journal of Plant Pathology*, 137:231-235.
- Massart, S., Olmos, A., Jijakli, H., Candresse, T., 2014. Current impact and future directions of high throughput sequencing in plant virus diagnostics. *Virus Research*, 188: 90-96
- Matoušek, J., Orctová, L., Patzak, J., Svoboda, P., Ludvíková, I. 2003. Molecular sampling of hop stunt viroid (HSVd) from grapevines in hop production areas in the Czech Republic and hop protection. *Plant, Soil and Environment*, 49(4):168-175.
- Matsushita Y., Usugi t., Tsuda S. 2010. Development of a multiplex RT-PCR detection and identification system of Potato spindle tuber viroid and Tomato chlorotic dwarf viroid. *European Journal of Plant Pathology*, 128:165-170.
- Pethybridge, S.J. , Hay, F.S., Barbara, D.J., Eastwell, K.C., Wilson, C.R. 2008. Viruses and Viroids Infecting Hop: Significance, Epidemiology, and Management, *Plant Disease*, 92(3):324-338.
- Pethybridge, S. J., Wilson, C. R., Sherriff, L. J., Leggett, G. W., Munro, D. 2000. Virus incidence in Australian hop (*Humulus lupulus* L.) gardens and cultivar differences in suscep-tibility to infection. *Aust. J. Agric. Res.* 51:685-689.
- Radisek, S., Majer, A., Jakse, J., Javornik, B., Matoušek, J. 2012. First Report of Hop stunt viroid Infecting Hop in Slovenia, *Disease Notes*, 96(4):592.
- Sano, T., Isono, S., Matsuki, K., Kawaguchi-Ito, Y., Tanaka, K., Kondo, K.-i., i in., 2008. Vegetative propagation and its possible role as a genetic bottleneck in the shaping of the apple fruit crinkle viroid populations in apple and hop plants. *Virus Genes*, 37: 298-303
- Sano, T., Yoshida, H., Goshono, M., Monma, T., Kawasaki, H., Ishizaki, K. 2004. Characterization of a new viroid strain from hops: evidence for viroid speciation by isolation in different host species. *Journal of General Plant Pathology* 70(3):181-187.
- Sano T., Mimura R., Ohshima K. 2001 Phylogenetic analysis of hop and grapevine isolates of hop stunt viroid supports a grapevine origin for hop stunt disease. *Virus Genes*. 22(1):53-59.
- Schmidt, H.E. 1966. Mechanical transmission of a rod-shaped Hop virus to herbaceous test plants. *Zentralblatt für Bakteriologie, Parasitenkunde, Infektionskrankheiten und Hygiene* 120, 461-466.
- Shuman, S. 2002. What messenger RNA capping tells us about eukaryotic evolution. *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* 3:619–625.
- Sun, N., Deng, C., Zhao, X., Zhou, Q., Ge, G., Liu, Y., Yan, W., Xia, Q. 2014. Extraction of total nucleic acid based on silica-coated magnetic particles for RT-qPCR detection of plant RNA virus/viroid. *Journal of Virological Methods*, 196:204-211,

- Tsai, C.W., Daugherty, M.P., Almeida, R.P.P. 2012. Seasonal dynamics and virus translocation of grapevine leafroll-associated virus 3 in grapevine cultivars. *Plant Pathology* 61:977-985.
- Valli A., Oliveros J., Molnar A., Baulcombe D., Garcia J.A. 2011. The specific binding to 21-nt double-stranded RNAs is crucial for the antisilencing activity of Cucumber vein yellowing virus P1b and perturbs endogenous small RNA population. *RNA* 17:1148-1158.
- Von Weschmar, W. B., Brits, G., Cole-man, T. 1989. Viruses in hops and aspects of virus epidemiology and hop production in South Africa at 34° southern latitude. *Strony: 33-42 w: Proc. Int. Workshop Hop Virus Dis. Giessen.*
- Wang, J., Boubourakas, I.N., Voloudakis, A.E., Agorastou, T., Magripis, G., Rucker, T.L., i in., 2013. Identification and characterization of known and novel viroid variants in the Greek national citrus germplasm collection: threats to the industry. *European Journal of Plant Pathology*, 137: 17-27.
- Wetzel, T., Jardak, R., Meuniera, L., Ghorbel, A., Reustle, G.M., Krczal, G. 2002. Simultaneous RT/PCR detection and differentiation of arabis mosaic and grapevine fanleaf nepoviruses in grapevines with a single pair of primers. *Journal of Virological Methods*, 101(1-2):63-69.
- Yu, J., Liu, Y. 1987. The occurrence of three viruses in hop (*Humulus lupulus* L.) in China. *Plant Pathol.* 36:38-44.
- Ziegler, A., Kawka, M., Przybys, M., Doroszevska, T., Skomra, U., Kastirr, U., Matoušek, J., Schubert, J. 2014. Detection and molecular analysis of Hop latent virus and Hop latent viroid in hop samples from Poland, *Journal fur Kulturpflanzen*, 66 (7). S. 248–254.

#### 4. Planowana prezentacja wyników badań

Publikacje w monografiach/czasopismach recenzowanych			
lp.	Monografia/czasopismo	Rodzaj publikacji	Liczba publikacji
1	Polish Journal of Agronomy	Praca oryginalna	1

Wyniki badań prezentowane w publikacji „Incidence of viruses and viroids in Polish hop garden” uzyskano do końca listopada 2019 r. Publikacja została przygotowana i wysłana do wydawnictwa w grudniu 2019 r. Obecnie manuskrypt znajduje się w recenzji.

#### 5. Adres, pod którym wyniki badań są dostępne na stronie internetowej wnioskodawcy:

<http://chmiel.iung.pulawy.pl/wyniki.html>

#### 6. Miernik zadania - stopień realizacji

Lp.	miernik	Wartość miernika podana w opisie zadania	Wartość miernika zrealizowana	Stopień realizacji miernika
1	2	3	4	5
<b>temat badawczy 1</b>				
1.1	Liczba próbek pobranych z plantacji produkcyjnych i kolekcji odmian	900	904	100%
<b>temat badawczy 2</b>				

2.1	Liczba protokołów metody wykrywania dwóch wirusów (HpLV i ArMV) oraz trzech wiroidów (CBCVd, HSVd, AFCVd)	2 protokoły	2 protokoły	100%	
<b>temat badawczy 3</b>					
3.1	Liczba przeprowadzonych testów wykrywania badanych patogenów	1800 testów	1808 testów	100%	
<b>temat badawczy 4</b>					
4.1	Liczba przygotowanych bibliotek	5 bibliotek	5 bibliotek	100%	
				<b>Średnia</b>	100%
				<b>% realizacji zadania</b>	100%

Sporządzono:

Pieczęć jednostki

Osoba reprezentująca jednostkę

Kierownik zadania

13.01.2020 r.

data

prof. dr hab. Wiesław Aleksander Oleszek

podpis i pieczęć

dr Marcin Przybyś

podpis