

Multiplex-RT-PCR apuna kasvivirusten laaja-alaisessa tunnistamisessa

Jaana Jukkala

Pro gradu -tutkielmassani ”Multiplex-RT-PCR-sovellusten kehittäminen kasvivirusdiagnoosia varten ja virusten tunnistaminen siRNA-analyysillä” optimoin Ruokaviraston kasvintuhojalaboratoriolle multiplex-RT-PCR-menetelmän ennakkoon valittujen RNA-virusten laaja-alaista tunnistamista varten. Rinnakkaisena menetelmänä käytin siRNA-analyysia varmistakseni multiplex-RT-PCR:stä saatujen tulosten oikeellisuuden. Tutkimus on havainnollistava osoitus siitä, kuinka kasvivirusten tunnistusmenetelmät kehittyvät jatkuvasti.

Multiplex-RT-PCR ja siRNA-analyysi

Multiplex-PCR-menetelmässä käytetään samassa reaktiossa useita, eri DNA-jaksoille spesifisiä alukkeita, mikä mahdollistaa esimerkiksi useiden eri virusten tai virusryhmien tunnistamisen samalla PCR-reaktiolla. Multiplex-PCR säästää tavalliseen PCR:ään verrattuna aikaa, reagensseja ja kustannuksia, koska tällöin jokaiselle alukeparille ei tarvitse tehdä omaa reaktioseosta. Haasteena multiplex-PCR:ssä on optimoida reaktio-olosuhteet kaikille alukepareille sopiviksi.

Kasvivirusdiagnoosissa on yleistynyt sekvensointitapa, jossa sekvensoidaan kasviin kertyneitä pieniä RNA-molekyylejä (small interfering RNA, siRNA). siRNA-syväsekvensoinnin käyttö kasvivirusten tunnistusmenetelmänä perustuu kasvien kykyyn suojautua virustar-

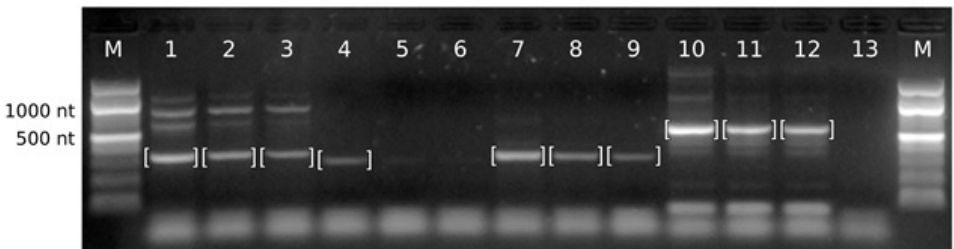
tunnoilta RNA-hiljennyksen avulla. RNA-hiljennyksessä kasvin puolustusmekanismi tunnistaa vierasperäisen kaksijuosteisen RNA:n ja hajottaa sen 21–24 nukleotidin mittaisiksi siRNA-molekyyleiksi. siRNA-syväsekvensoinnissa 21–24 nukleotidin pituiset RNA-molekyylit eristetään kasvista ja sekvensoidaan. siRNA-molekyyliden sekvenssien välillä esiintyy päällekkäisyyttä, mistä johtuen sekvensseistä voidaan koota eripituisia yhtenäisiä sekvenssejä. Vertailemalla koottuja sekvenssejä tietokannoista löytyvien virusten perimään voidaan selvittää näytteessä esiintyvät virukset ja viroidit. siRNA-menetelmän merkittävimmät edut ovat, ettei se edellytä ennako-oletusta näytteessä mahdollisesti esiintyvistä viruksista ja viroideista ja että menetelmällä on mahdollista havaita kaikki virukset ja viroidit yhdellä kertaa.

Multiplex-RT-PCR-menetelmän optimointi

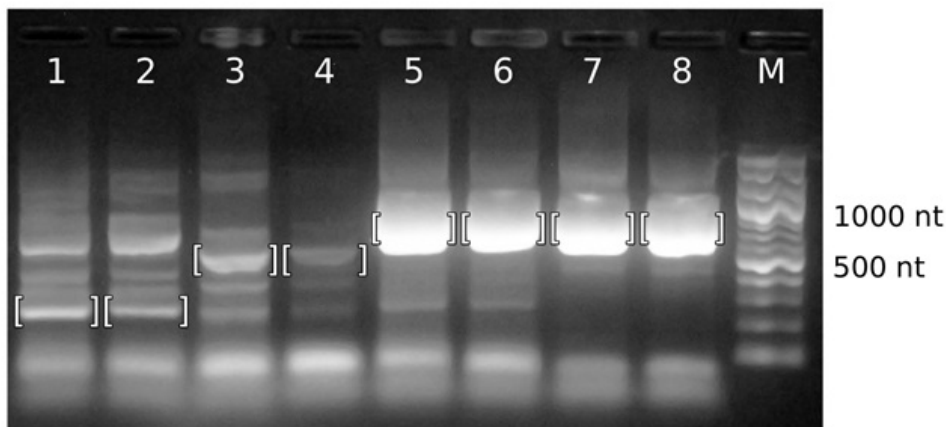
Tutkimuksessa haluttiin luoda kaksi tai useampi multiplex-RT-PCR-testi, yhdeksälle, kirjallisuudesta etsitylle, degeneroidulle alukeparille poty-, potex-, tobra- ja tospovirussukujen, tobamoviruksen alaryhmä yhden, nepoviruksen a- ja b-alaryhmien, *Bromoviridae*-virusheimon ja *Tom-busviridae*-heimoon kuuluvien carmo-, diantho- ja tombusvirussukujen samanaikaiseen tunnistamiseen. Tavoitteena oli näin luoda menetelmä, jolla voidaan havaita yhtäaikaaisesti kaikkia niitä RNA-virusia, joita kokemuksen ja kirjallisuuden perusteella on todennäköisintä löytää Ruokavirastoon tarkastettavaksi tulevasta kasviaineistosta. Kyseisiin virusheimoihin ja -sukuihin kuulu-

vat monet karanteenituhoojiksi luokitellut virukset, kuten *Chrysanthemum stem necrosis virus* (CSNV) ja tomaatin ruskokurttuvirus (ToBR-FV). Lisäksi näihin virusryhmiin kuuluu useita laatutuhoojia.

Multiplex-RT-PCR-menetelmän optimointi tehtiin testaamalla eri magnesiumsulfaatin pitoisuuksia ja monistamalla positiiviset viruskontrollit eri alukkeiden sitoutumisvaiheen lämpötiloissa ja arvioimalla näiden vaikutusta PCR-tuotteiden monistumiseen. Multiplex-PCR-testien herkkyys arvioitiin suorittamalla testit infektoituneen kasvin kokonais-RNA:sta tehdyillä laimennoksilla, jotka sisälsivät positiivisen kontrolliviruksen. Optimoitua multiplex-PCR-menetelmää testattiin luonnonkasveista kerättyyn,



Gelelektroforeesikuva multiplex A -testin herkkyystuloksista. PCR-reaktiot sisältävät infektoituneen kasvin kokonais-RNA:sta tehtyjä laimennoksia, jotka sisälsivät positiivisen kontrolliviruksen. Näytteiden järjestys: 1: viiniköynnöksen viuhkalehtivirus (GFLV) (1:10), 2: GFLV (1:50), 3: GFLV (1:100), 4: omenan mosaiikkivirus ApMV (1:10), 5: ApMV (1:50), 6: ApMV (1:100), 7: luumun rokkovirus PPV (1:10), 8: PPV (1:50), 9: PPV (1:100) 10: pepinon mosaiikkivirus PepMV (1:10), 11: PepMV (1:50), 12: PepMV (1:100) 13: negatiivinen vesikontrolli. Oikean kokoiset PCR-tuotteet ovat merkitty erottamaan ne epäspesifisistä tuotteista.



Geielektroforeesikuva multiplex B -testin herkkyystuloksista. PCR-reaktiot sisältävät infektoituneen kasvin kokonais-RNA:sta tehtyjä laimennoksia, jotka sisälsivät positiivisen kontrolliviruksen. Näytteiden järjestys: 1: tomaatin mustarengaslaikkuvirus TBRV (10 ng), 2: TBRV (1 ng), 3: tomaatin kitukasvuvirus TBSV (10 ng), 4: TBSV (1 ng), 5: tupakan rattlevirus TRV (10 ng), 6: TRV (1 ng), 7: tupakan mosaiikkivirus TMV (10 ng) ja 8: TMV (1 ng). Oikean kokoiset PCR-tuotteet ovat merkitty erottamaan ne epäspesifisistä tuotteista.

mahdollisesti viroottiseen kasviaineistoon, sekä taimituotannon emokasvimateriaaliin. Menetelmän valikoivuutta ja tarkkuutta tarkasteltiin sekvensoimalla luonnollisesti infektoituneiden kasvinäytteiden antamat tuotteet, sekä tekemällä rinnakkaisena testinä siRNA-analyysi ja analysoimalla menetelmällä saadut sekvenssit bioinformaattisesti.

Multiplex-RT-PCR nykyään osana Ruokaviraston kasvintuhoojalaboratorion rutiinidiagnostiikkaa

Tutkimuksessa pystyttiin luomaan kaksi multiplex-RT-PCR-testiä,

multiplex A ja B, jotka tunnistavat yhteensä kahdeksaan eri virusryhmään kuuluvia viruksia. Tutkimustulokset osoittivat multiplex-RT-PCR-testien kykenevän tunnistamaan kaikki positiiviset viruskontrollit kun infektoituneen kasvin kokonais-RNA:n konsentraatio oli alle 5 ng/μl, mitä Ruokaviraston kasvintuhoojalaboratoriossa pidetään riittävänä multiplex-PCR-testin herkkyuden kannalta. Kehitettyjä multiplex-PCR-testejä voidaan pitää poikkeuksellisina, sillä monessakaan laboratoriossa ei ole käytettävissä yhtä laaja-alaista testiä RNA-virusten tunnistamiseen kuin mitä tutkimuksessa optimoiduilla

testeillä voidaan tunnistaa. Nykyään multiplex-RT-PCR-testiä käytetään kasvintuhoojalaboratoriossa osana rutiinidiagnostiikkaa kasvivirusien tunnistamiseen. Sen avulla on löytynyt kasveista sellaisia viruksia, joita ei muilla laboratoriossa käytössä olevilla menetelmillä olisi luultavasti pystytty havaitsemaan. Tällaisiin löydöksiin kuuluvat esimerkiksi paprikan lievä läikkävirus (PMMoV) ja hortensian rengaslaikkuvirus (HdRSV).

Rinnakkaisena testinä käytetty siRNA-syväsekvensointi tunnisti samat kasviviruset näytteistä kuin mitä multiplex-RT-PCR-testit, mikä vahvistaa luottamusta optimoituja multiplex-RT-PCR-testejä kohtaan. Multiplex-PCR säästää aikaa sekä materiaalikustannuksia verrattuna tavalliseen PCR:ään, mistä johtuen multiplex-PCR:n käyttö tarjoaa selviä etuja Ruokaviraston kasvintuhoojalaboratoriolle, jossa käsitellään suuria näytemääriä nopeassa aikataulussa. Pro-gradu -työn aineiston avulla multiplex-PCR-testit akkreditoitiin, eli validoitiin ja tarkastettiin ulkopuolisella asiantuntijalla, mikä varmistaa menetelmän soveltuvan rutiinidiagnostiikan käyttöön. Työ toi tieteellisesti uutta sekvenssitietoa mahdollisesti aiemmin tuntemattomasta potyviruslajista ja toi ensimmäisenä tiedon suikeroalpien (*Lysimachia nummularia* L.) kuuluvan osaksi tupakan rattleviruksen (TRV) isäntäkirjoa.

Pro gradu -tutkielma on palkittu vuonna 2020 Kasvinsuojeluseuran stipendillä. Kirjoittaja on maatalous- ja metsätieteiden maisteri ja agronomi. Kirjoittaja työskentelee Verdera Oy:ssä.

Lisätietoa aiheesta:

Pro gradu -tutkielma on luettavissa osoitteessa: <http://urn.fi/URN:NBN:fi:hulib-201903051419>

Santala J., Jukkala J., Tuomola J., Valkonen J.P.T. First Report of Tobacco rattle virus Infecting *Lysimachia nummularia* in Finland. *Plant disease* 104 (2): 604–604

Ruokavirasto 2019. Paprikan lievä läikkävirus todettu Suomessa ensimmäisen kerran. <https://www.ruokavirasto.fi/viljelijat/kasvintuotanto/kasvinterveys/ajankohtaista-kasvinterveydesta/paprikan-lieva-laikkavirustodettu-suomessa-ensimmaisen-kerran/>