

## Nasiennictwo i odmianoznawstwo



Narodowe Centrum  
Badań i Rozwoju



Państwowa Inspekcja  
Ochrony Roślin i Nasiennictwa



FITOEXPORT

GIORIN, U.W., ILOT, IHAR-PIB, IOR-PIB



### ZASTOSOWANIE METODY MULTIPLEKS REAL-TIME PCR SZANSĄ NA USPRAWNIENIE OCENY WERYFIKACYJNEJ SADZENIAKÓW ZIEMNIAKA W ŚWIETLE WYNIKÓW PROJEKTU FITOEXPORT

#### NEW MULTIPLEX REAL-TIME PCR ASSAY AS AN OPPORTUNITY TO IMPROVE CERTIFICATION OF POTATO SEED TUBERS IN THE LIGHT OF THE FITOEXPORT PROJECT RESULTS

dr hab. Krzysztof Treder<sup>1</sup> ORCID: 0000-0002-8764-0574,  
dr Agata Kaczmarek<sup>1,3</sup> ORCID: 0000-0002-7463-5821, mgr Agnieszka Mocka<sup>2</sup>,  
mgr Marek Woźny<sup>2</sup>, mgr inż. Anna Pawłowska<sup>1</sup>, mgr inż. Milena Sagan<sup>1</sup>,  
mgr Anna Rosińska<sup>2</sup>, mgr Justyna Pięcińska<sup>2</sup>, dr Janina Butrymowicz<sup>2</sup>  
<sup>1</sup> IHAR-PIB, Oddział w Boninie, Zespół Diagnostyki Molekularnej i Biochemii  
<sup>2</sup> Centralne Laboratorium GIORiN w Toruniu, ul. Żwirki i Wigury 73, 87-100 Toruń  
<sup>3</sup> bieżąca afiliacja: European Food Safety Authority (EFSA), Parma, Włochy

#### Streszczenie

Zespół z oddziału IHAR-PIB w Boninie brał udział w realizacji projektu FITOEXPORT kierowanego przez dr Janinę Butrymowicz z Głównego Inspektoratu Ochrony Roślin i Nasiennictwa (GIORiN). Celem badań realizowanych przez zespół było opracowanie multimetody pozwalającej na jednoczesne wykrywanie w próbkach pobranych z bulwy sześciu wirusów ziemniaka (PVY, PLRV, PVM, PVS, PVA i PVS) oraz wiroida wrzecionowatości bulw ziemniaka (PSTVd). Do wykrywania stosowano test molekularny RT-PCR w czasie rzeczywistym opracowany w fazie A projektu. Bieżąca publikacja omawia wyniki prac wdrożeniowych przeprowadzonych w fazie B projektu.

**Słowa kluczowe:** certyfikacja sadzeniaków, test RT-PCR w czasie rzeczywistym, wiroid wrzecionowatości bulw ziemniaka, wirusy jakościowe ziemniaka

#### Abstract

The team from the IHAR-PIB Division in Bonin participated in the consortium project FITOEXPORT led by dr Janina Butrymowicz from the State Plant Health and Seed Inspection Service. The aim of the research carried out by the team was to develop a multi-method facilitating the simultaneous detection of six potato viruses (PVY, PLRV, PVM, PVS, PVA, and PVX) and potato spindle tuber viroid (PSTVd) in samples collected from the tuber. To achieve this goal, the team developed a real-time RT-PCR in Phase A of the project. The current publication discusses the results obtained in phase B as part of the implementation work.

**Keywords:** potato spindle tuber viroid, qualitative potato viruses, real-time RT-PCR test, seed potato certification



Narodowe Centrum  
Badań i Rozwoju



Państwowa Inspekcja  
Ochrony Roślin i Nasiennictwa



FITOEXPORT

GIORiN, UW, ILOT, IHAR-PIB, IOR-PIB



### Zadanie 3 w Fazie A i Podzadanie 6.3 w Fazie B projektu

Zastosowanie molekularnego testu do wykrywania wirusów ziemniaka Y, M, L, S, X, A oraz wiroida wrzecionowatości bulw ziemniaka (PSTVd) w sadzeniakach ziemniaka

#### Zespół z Oddziału IHAR-PIB w Boninie



Kierownik zadania:  
dr hab. **Krzysztof Treder**



mgr inż. **Anna Pawłowska**



st. technik  
**Maria Fedczak**



Główny wykonawca:  
dr **Agata Kaczmarek**

mgr inż. **Mateusz Mielczarek**

mgr inż. **Milena Sagan**

technik  
**Alicja Przewłoka**

#### Zespół z Centralnego Laboratorium GIORiN w Toruniu

Kierownik projektu: dr **Janina Butrymowicz**

Wirusolodzy z Centralnego Laboratorium GIORiN w Toruniu:



Kierownik zespołu:  
mgr **Justyna Pięcińska**



mgr **Anna Rosińska**



mgr **Marek Woźny**



mgr **Agnieszka Mocka**

Rys. 1. Skład zespołów z oddziału IHAR-PIB w Boninie oraz z CL GIORiN w Toruniu współpracujących w ramach projektu FITOEXPORT

Szczegółowe cele projektu FITOEXPORT, skład konsorcjum i wyniki badań wykonanych przez zespół w Boninie w ramach fazy A przedstawiono w poprzedniej publikacji w Ziemniaku Polskim (Treder i in. 2021 nr 3). W ramach tych prac opracowano multipleksowy test RT-PCR w czasie rzeczywistym, pozwalający na jednoczesne wykrycie sześciu wirusów oraz wiroida PSTVd w dwóch równolegle wykonywanych reakcjach.

W celu wdrożenia opracowanej w fazie A multimetody w laboratoriach PIORiN podjęto

we współpracy z Centralnym Laboratorium GIORiN w Toruniu badania nad automatyzacją poszczególnych etapów wykrywania wirusów i wiroida ziemniaka. Optymalizowano stosowanie odpowiednich urządzeń do takich etapów metody jak: (1) homogenizacja tkanki bulw, (2) izolacja RNA, (3) składanie reakcji, (4) amplifikacja i detekcja w termocyklerze do PCR w czasie rzeczywistym.

Aby ocenić skuteczność automatycznej homogenizacji prób i izolacji z nich RNA na robocie King Fisher, porównano wydajność i jakość preparatów RNA uzyskanych za jej



pomocą z metodami: kolumnkową wg procedury izolacji RNA z fazy A oraz manualną wg procedury izolacji RNA z buforem CTAB, która jest stosowana obecnie w laboratoriach PIORiN. Do izolacji RNA na robocie King Fisher stosowano zestaw z kulkami magnetycznymi firmy Applied Biosystems™ (ThermoScientific) – MagMAX™ Plant RNA Isolation Kit. Uzyskane za pomocą różnych metod preparaty RNA oceniano pod względem czystości spektrofotometrycznej oraz koncentracji przez pomiar absorbancji w ultrafioletcie oraz fluorescencji na fluorymetrze Qubit. Ponadto koncentrację i poziom degradacji RNA w uzyskanych preparatach oceniano za pomocą aparatu do elektroforezy kapilarnej Qiaxcell Advanced System. Poziom koncentracji RNA oznaczany za pomocą różnych urządzeń był bardzo podobny, co świadczy o tym, że w uzyskanych preparatach poza RNA nie było mierzalnych zanieczyszczeń zaburzających wynik uzyskiwany daną metodą.

Wyniki pomiarów świadczą o tym, że automatyzacja homogenizacji prób i izolacji RNA przez stosowanie homogenizatora kulkowego oraz robota King Fisher pozwala na uzyskanie preparatów RNA o podobnej czystości spektrofotometrycznej i koncentracji jak za pomocą metody kolumnkowej czy metody manualnej z buforem CTAB. Jednocześnie poziom degradacji RNA w uzyskanych za pomocą robota King Fisher preparatach był wyraźnie mniejszy niż w preparatach przygotowanych pozostałymi porównywanymi metodami. Świadczy to o tym, że automatyzacja izolacji RNA ma pozytywny wpływ na jakość uzyskanych preparatów (rys. 2).

Zespół wirusologów z GIORiN w Toruniu we współpracy z oddziałem IHAR-PIB w Boninie podjął prace nad wdrożeniem zautomatyzowanej metody w laboratoriach PIORiN. Automatyzowano wszystkie etapy

izolacji RNA i jego amplifikacji. Do etapu homogenizacji próbek pobranych z bulw wybrano homogenizator kulkowy Geno/Grinder firmy SPEX. Umożliwia on homogenizację próbek w buforze homogenizacyjnym za pomocą stalowych kulek w mikro-płytkach 96-dołkowych o pojemności 2 ml w jednym dołku (płytki DW), zamykanych matą uszczelniającą. Takich płytek do Geno/Grindera można wstawić sześć, co oznacza że można homogenizować 576 próbek (6 x 96) jednocześnie w ciągu kilku minut.

Na kolejnym etapie płytki z homogenatami są inkubowane w 56°C. Płytki DW są wirowane w celu uzyskania klarownych lizatów tkankowych. Lizaty są przekładane do czystych płytek DW. Te z kolei są wstawiane do robota King Fisher Flex, umożliwiającego izolację RNA z 96 prób jednocześnie. Uzyskane preparaty RNA trafiają do stacji pipetującej epMotion® 5070 firmy Eppendorf, która przekłada RNA z płytek 96-dołkowych do płytek 384-dołkowych do PCR i dodaje do nich mieszaninę do amplifikacji. Po złożeniu reakcji PCR płytki są wstawiane do termocyklera Roche LightCycler® 480, w którym zachodzi amplifikacja oraz detekcja poszczególnych patogenów przez pomiar przyrostu fluorescencji w czasie rzeczywistym.

Prace optymalizacyjne obejmowały dobór programów i ustawienia poszczególnych urządzeń, siły wirowania mikro-płytek i innych parametrów poszczególnych aparatów istotnych dla procesów izolacji i detekcji patogenów. Zespół oddziału IHAR-PIB w Boninie prace w fazie A prowadził na termocyklerze CFX96 Touch Real-Time PCR Detection System firmy BioRad. Natomiast w wyposażeniu Centralnego Laboratorium GIORiN znajdują się aparaty LightCycler® 480 System firmy Roche. Urządzenia obu firm różnią się parametrami technicznymi dotyczącymi rozdzielczości wykrywania różnych barwników fluorescencyjnych.



Narodowe Centrum  
Badań i Rozwoju



Państwowa Inspekcja  
Ochrony Roślin i Nasiennictwa



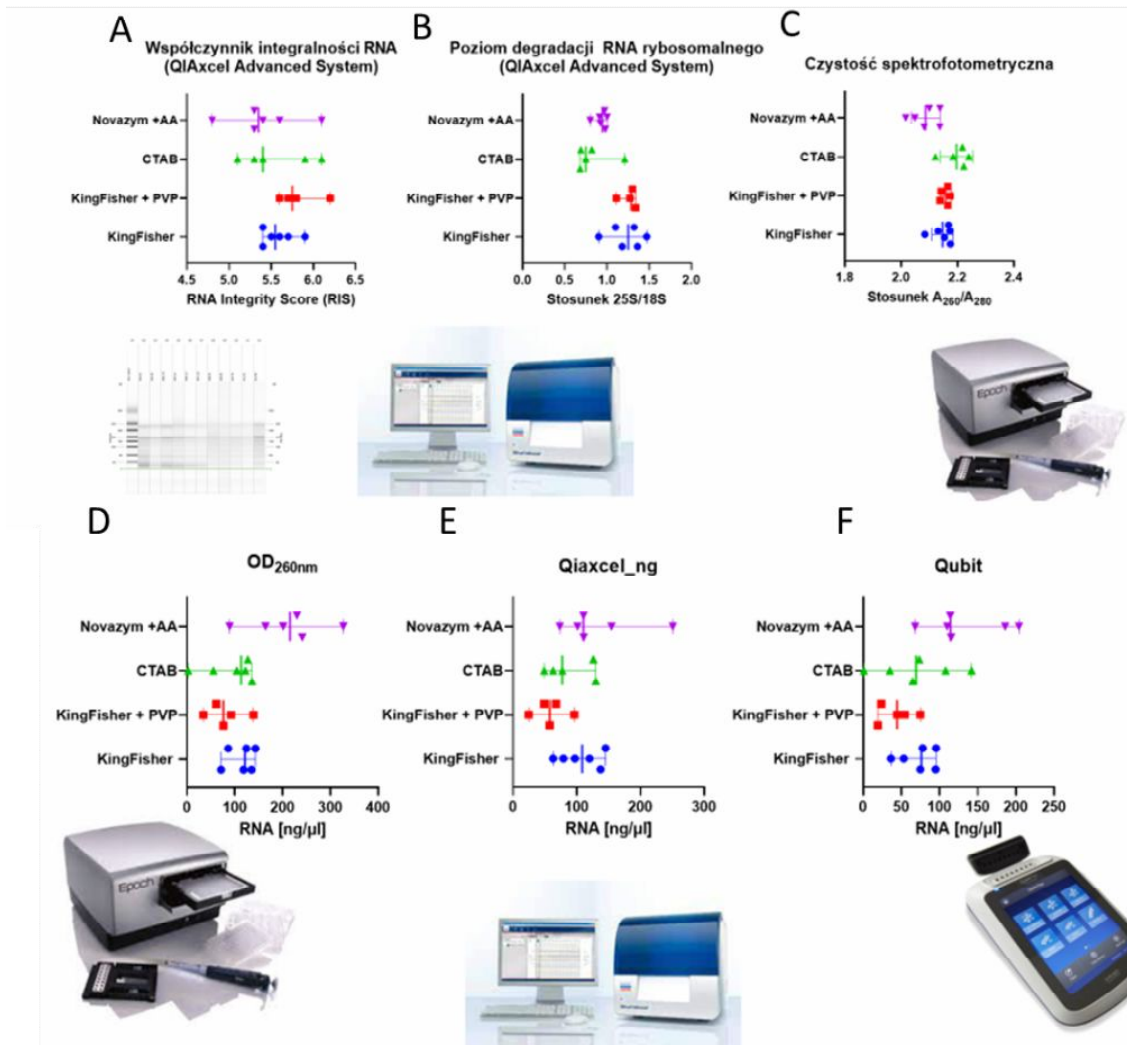
FITOEXPORT

GIORIN, UW, ILOT, IHAR, PIB, IOR, PIB



W związku z powyższym konieczna była również optymalizacja sond fluorescencyjnych dobranych do multimetody w fazie A pod kątem właściwej kompensacji kolorów, pozwalającej na specyficzną detekcję produktów amplifikacji w aparacie firmy Roche.

Dodatkowo, termocykler LightCycler® 480 umożliwia wykonanie reakcji PCR w trybie Fast, co pozwala na skrócenie etapu amplifikacji i detekcji o połowę (do ok. pół godziny) w stosunku do reakcji wykonywanej w normalnym trybie.



Rys. 2. Analiza jakości preparatów RNA z bulw ziemniaka uzyskanych różnymi metodami

Novazym+AA – metoda kolumnkowa, CTAB – metoda ręczna, KingFisher+PVP oraz KingFisher – warianty metody zautomatyzowanej. Współczynnik integralności RNA (A) oraz poziom degradacji RNA rybosomalnego (B) oznaczone za pomocą systemu do elektroforezy kapilarnej QIAxcel Advanced System (Qiagen). Czystość spektrofotometryczna preparatów RNA oznaczona na spektrofotometrze mikro płytkowym Epoch (Biotek) – C. Koncentracja RNA w izolowanych preparatach oznaczona poprzez pomiar absorbancji w 260 nm na spektrofotometrze Epoch – D, wyznaczona za pomocą systemu do elektroforezy kapilarnej QIAxcel Advanced System – E, oraz za pomocą pomiaru fluorescencji na fluorymetrze Qubit Flex (ThermoFisher Scientific) – F



Narodowe Centrum  
Badań i Rozwoju



Państwowa Inspekcja  
Ochrony Roślin i Nasiennictwa



FITOEXPORT

GIORIN, UW, ILOT, IHAR-PIB, IOR-PIB



Pracownicy laboratoriów GIORiN zapoznali się z opracowaną w ramach projektu multimetodą wykrywania patogenów, zarówno w wariacie wykorzystującym kolumnkową izolację RNA (z fazy A projektu), jak również z wykorzystaniem automatyzowanej linii do przygotowania prób, izolacji RNA i składania reakcji, w serii szkoleń, z których pierwsze było przeprowadzone w oddziale IHAR-PIB w Boninie dla dwójga pracowników zespołu wirusologicznego z CL GIORiN w Toruniu. Zostali oni zapoznani z różnymi opracowanymi w ramach projektu metodami izolacji RNA z bulw oraz z procedurą testu multipleks RT-qPCR. Kolejne szkolenie przeprowadzono również w Boninie – dla pracowników oddziałów Centralnego Laboratorium GIORiN, w których będzie wykonywana ocena weryfikacyjna sadzeniaków ziemniaka opracowaną w ramach projektu metodą.

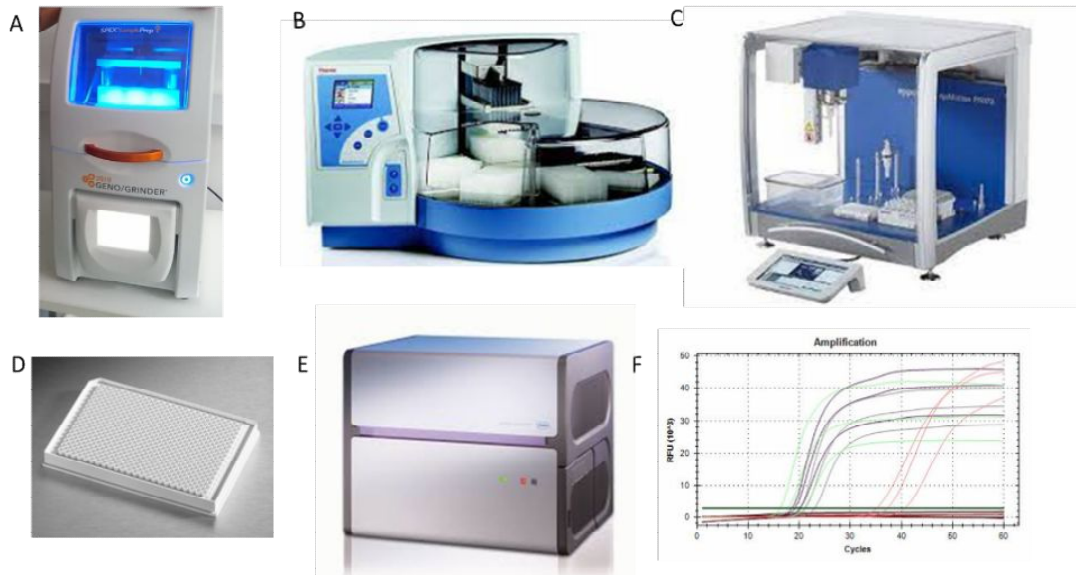
Ponieważ oddział IHAR-PIB w Boninie dysponuje aparaturą innych firm niż PIORiN, kolejne dwa szkolenia odbyły się w Referencyjnym Laboratorium Fitosanitaryjnym (RLF) GIORiN w Toruniu, gdzie pracownicy CL GIORiN zapoznali się z wariantem metody dostosowanym do tych urządzeń. RLF GIORiN oraz oddział IHAR-PIB w Boninie wykonały badania pilotażowe opracowanej metody w porównaniu ze stosowanymi obecnie próbkami oczkowymi. Wyniki pilotażu wskazują na to, że opracowana multimetoda ma dwu-trzykrotnie większą od próby oczkowej skuteczność wykrywania wirusów w bulwach ziemniaka.

Jednocześnie prowadzono dalsze prace nad ułatwieniem wykonania metody oraz obniżeniem jej kosztu. Cena komercyjnego zestawu MagMAX do izolacji RNA z 1000 bulw na robocie King Fisher wynosi obecnie 8400 zł brutto (czyli koszt odczynnika dla jednej bulwy to 8,4 zł). W celu obniżenia kosztów izolacji podjęto badania nad możli-

wością zastosowania własnoręcznie przygotowywanych odczynników do izolacji RNA na robocie King Fisher. Badano ręcznie przygotowany odczynnik TRIZOL oraz bufor z odczynnikami CTAB jako bufor do homogenizacji prób z bulw. Ponieważ TRIZOL zawiera sole guanidyny, nie wymaga stosowania etanolu do wiązania RNA z kulkami magnetycznymi. Do homogenatów przygotowanych w buforze CTAB dodawano etanol w celu stworzenia środowiska chaotropowego, w którym RNA wiąże się do kulek magnetycznych.

Zarówno TRIZOL, jak i bufor CTAB umożliwiły uzyskanie funkcjonalnych preparatów RNA, które można było wykrywać za pomocą RT-PCR w czasie rzeczywistym. Jednak czystość preparatów uzyskanych z zastosowaniem buforu CTAB była wyższa, a uzyskane w RT-PCR wartości C<sub>q</sub> bardziej powtarzalne niż za pomocą odczynnika TRIZOL. Ponadto preparaty otrzymane za pomocą odczynnika TRIZOL były mlecznobiałe, co świadczy o tym, że zawierają dużą ilość zanieczyszczeń. Optymalnym buforem do izolacji magnetycznej na robocie King Fisher był bufor CTAB.

Standardowa procedura izolacji RNA na robocie King Fisher obejmuje 30-minutowe usuwanie DNA z preparatów za pomocą DNazy I, przez co jedna izolacja trwa ok. godziny. Badano, czy eliminacja tego etapu wpływa niekorzystnie na jakość preparatów RNA. Uzyskane bez stosowania tego etapu preparaty miały wysoką czystość spektrofotometryczną, typową dla RNA (średnio stosunek ekstynkcji 260/280 nm wynosił ok. 2,2). Wydajność izolacji była również podobna do uzyskiwanej w efekcie pełnej izolacji. Cały proces izolacji na robocie King Fisher został skrócony do 20 min, co trzykrotnie zwiększa liczbę prób, które można izolować w ciągu jednej godziny.



Rys. 3. Linia technologiczna do wykrywania wirusów jakościowych ziemniaka i wiroida w laboratoriach PIORiN

Homogenizator GenoGrinder (Spex) – A, robot KingFisher Flex (ThermoFisher Scientific) do jednoczesnej izolacji RNA z 96 bulw – B, stacja pipetująca epMotion® 5070 (Eppendorf) do składania reakcji RT-qPCR na płytach 384-dółkowych – C, płytka 384-dółkowa – D, termocykler czasu rzeczywistego LightCycler® 480 System – E, wizualizacja wyników wykrywania wirusów testem RT-PCR w czasie rzeczywistym – F

Podsumowując, w fazie B projektu zautomatyzowano i dostosowano do potrzeb PIORiN multimetodę wykrywania siedmiu patogenów ziemniaka o genomach zbudowanych z RNA. Przeprowadzono szkolenia personelu w zakresie opracowanych rozwiązań i wykonano pilotaże oraz dodatkowe badania, których efektem będzie krótszy czas wykonania (czyli większa przepustowość) oraz niższy od zakładanego koszt wykrywania patogenów w laboratoriach PIORiN.

### Podziękowania

Autorzy pragną podziękować paniom Marii Fedczak i Alicji Przewłóce za doskonałą pomoc techniczną. Badania były wykonane w ramach projektu FITOEXPORT pt. „Zwiększenie konkurencyjności polskich towarów roślinnych na rynkach międzynarodowych poprzez podniesienie ich jakości i bezpie-

czeństwa fitosanitarnego” i dofinansowane przez Narodowe Centrum Badań i Rozwoju ze środków programu GOSPOSTRATEG. (Nr Umowy o wykonanie i finansowanie projektu: Gospostrateg1/385957/ 5/NCBR/2018. Okres realizacji: 01.01.2019 r. – 31.03.2022 r.)

### Literatura

1. Treder K., Kaczmarek A., Butrymowicz J. 2021. Od laboratorium do zdrowego sadzeniaka – raport z realizacji projektu FITOEXPORT w Oddziale IHAR-PIB w Boninie. – Ziemiak Pol. 3: 3-8; 2. Treder K., Kaczmarek A., Sagan M., Mocka A., Woźny M., Rosińska A., Pięcińska J., Butrymowicz J. 2022. Zastosowanie metody multiplex real-time PCR szansą na usprawnienie oceny weryfikacyjnej sadzeniaków ziemniaka w świetle wyników projektu FITOEXPORT. [W:] Konferencja Ochrony Roślin. 62. Sesja Nauk. IOR-PIB. Streszczenia. „Europejski Zielony Ład a przyszłość ochrony roślin”, Poznań, 16-18 lutego 2022: 29-30

