

Nasiennictwo i odmianoznawstwo



Narodowe Centrum
Badań i Rozwoju



Państwowa Inspekcja
Ochrony Roślin i Nasiennictwa



FITOEXPORT

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



OD LABORATORIUM DO ZDROWEGO SADZENIAKA – RAPORT Z REALIZACJI PROJEKTU FITOEXPORT W ODDZIALE IHAR-PIB W BONINIE

FROM THE LABORATORY TO HEALTHY SEED TUBERS – REPORT ON THE IMPLEMENTATION OF THE PROJECT FITOEXPORT IN THE BONIN RESEARCH CENTER OF IHAR-PIB

dr hab. Krzysztof Treder¹ ORCID: 0000-0002-8764-0574,

dr Agata Kaczmarek² ORCID: 0000-0002-7463-5821, dr Janina Butrymowicz³

¹IHAR-PIB Oddział w Boninie, Pracownia Diagnostyki Molekularnej i Biochemii

²IHAR-PIB Oddział w Boninie, Pracownia Nasiennictwa Ziemniaka

³Centralne Laboratorium GIORiN, ul. Żwirki i Wigury 73, 87-100 Toruń

e-mail: k.treder@ihar.edu.pl

Streszczenie

Oddział IHAR-PIB w Boninie jest członkiem konsorcjum realizującego projekt FITOEXPORT finansowany przez NCBiR w ramach programu GOSPOSTRATEG. Zadanie wykonywane w Boninie ma na celu opracowanie i wdrożenie w laboratoriach PIORiN multipleksowego testu RT-PCR w czasie rzeczywistym do wykrywania wirusów Y, L, M, S, A, X oraz wiroida PSTVd. Taki test opracowano w fazie badawczej projektu, a obecnie trwają prace nad jego adaptacją do wykrywania patogenów na masową skalę w celu usprawnienia urzędowej certyfikacji sadzeniaków ziemniaka przez PIORiN.

Słowa kluczowe: certyfikacja sadzeniaków, multipleks RT-qPCR, wirusy ziemniaka

Abstract

IHAR-PIB Branch in Bonin is a consortium member implementing the FITOEXPORT project financed under the 1st GOSPOSTRATEG competition by NCBiR. The task performed in Bonin is aimed at developing and implementing a multiplex RT-PCR test in real-time for the detection of Y, L, M, S, A, X viruses and PSTVd viroid in the laboratories of PIORiN. Such an assay was developed in research phase of the project, and implementation work is currently underway in Phase B to adapt the assay for large-scale pathogen detection. After implementation, the test will improve the official certification of seed potatoes by PIORiN.

Keywords: potato viruses, RT-qPCR multiplex, seed potato certification



Instytut Hodowli i Aklimatyzacji Roślin – Państwowy Instytut Badawczy (IHAR-PIB) jest członkiem konsorcjum realizującego projekt o akronimie „FITOEXPORT” pt. „Zwiększenie konkurencyjności polskich towarów roślinnych na rynkach międzynarodowych poprzez podniesienie ich jakości i bezpieczeństwa fitosanitarnego”. Jest on finansowany przez Narodowe Centrum Badań i Rozwoju w ramach programu GOSPOSTRATEG. Planowany okres wykonania projektu obejmuje lata 2019-2021. Liderem projektu jest Główny Inspektorat Ochrony Roślin i Nasiennictwa (GIORiN), a kierownikiem projektu ze strony Lidera jest dr Janina Butrymowicz z Centralnego Laboratorium GIORiN. Oprócz Lidera konsorcjum tworzy czterech partnerów: Uniwersytet Warszawski (UW), Sieć Badawcza Łukasiewicz – Instytut Lotnictwa (ILOt), IHAR-PIB oraz Instytut Ochrony Roślin – PIB (IOR-PIB). Całkowita wartość kosztów kwalifikowanych projektu to 11 022 546 zł, z czego dofinansowanie przez NCBiR wynosi 9 569 266 zł. Różnicę między tymi kwotami wnosi Lider projektu jako wkład własny.

Celem nadrzędnym projektu jest umożliwienie wprowadzenia polskich produktów roślinnych na nowe rynki zbytu i podniesienie ich konkurencyjności poprzez skuteczne reagowanie na wymagania importowe nowych odbiorców oraz usprawnienie kontroli realizowanych przez Państwową Inspekcję Ochrony Roślin i Nasiennictwa (PIORiN), z zastosowaniem nowoczesnych metod inspekcji, lustracji upraw i badań laboratoryjnych. Cel ten jest realizowany w dwóch fazach: A i B. Faza A (badawcza) zakończyła się z końcem sierpnia 2021, po czym nastąpiła faza B – przygotowanie do wdrożenia w PIORiN konkretnych rozwiązań, wypracowanych w ramach pięciu szczegółowych zadań w fazie badawczej (tab. 1).



Rys. 1. Logotyp projektu FITOEXPORT i jednostki finansującej (NCBiR) oraz skład konsorcjum realizującego projekt

Oddział IHAR-PIB w Boninie realizuje zadanie, którego celem jest opracowanie i wdrożenie w laboratoriach PIORiN molekularnego testu do wykrywania w jednej próbce bulw ziemniaka w dwóch równoległych wykonywanych reakcjach sześciu wirusów (Y, L, M, S, A, X) oraz wiroida wrzecionowatości bulw (PSTVd). Wymienione patogeny mają genomy zbudowane z kwasu rybonukleowego (RNA).

Głównymi wykonawcami zadania są dr hab. Krzysztof Treder i dr Agata Kaczmarek. Część prac wykonywali mgr inż. Mateusz Mielczarek i mgr inż. Anna Pawłowska oraz starszy technik Maria Fedczak. Ze strony Centralnego Laboratorium GIORiN w Toruniu badania wdrożeniowe wykonują mgr Anna Rosińska, mgr Agnieszka Mocka i mgr Marek Woźny pod kierownictwem mgr Justyny Pięcińskiej.



Narodowe Centrum
Badań i Rozwoju



Państwowa Inspekcja
Ochrony Roślin i Nasiennictwa



FITOEXPORT

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



Cechą wspólną wirusów i wiroida jest to, że mają genomy zbudowane z kwasu rybonukleinowego (RNA), dzięki czemu do ich wykrywania za pomocą RT-qPCR można wykorzystać tę samą procedurę przygotowania prób i izolacji całkowitego RNA. Bulwy ziemniaka zawierają skrobię, polifenole i enzymy redoks negatywnie wpływające na wydajność i jakość izolacji RNA oraz hamu-

jące polimerazę w reakcji RT-PCR. W ramach fazy A opracowano wydajną procedurę izolacji, skutkującą preparatami RNA o wysokiej jakości spektrofotometrycznej. Uzyskane RNA były lepszej jakości niż izolowane za pomocą cenionych na świecie komercyjnych zestawów. Jednocześnie koszt izolacji był kilka razy niższy (Kaczmarek i in. 2019ab).

Tabela 1

Zadania realizowane przez poszczególnych partnerów

Nr zadania w fazie A	Nr zadania w fazie B	Tytuł zadania	Konsorcjant	Kierownik zadania
-	6	Przygotowanie PIORiN do wdrożenia strategii innowacyjności i zastosowania nowoczesnych narzędzi w realizacji zadań kontrolnych	Lider projektu – GIORiN	kierownik projektu – dr Janina Butrymowicz
1	6.1	Opracowanie doskonałego modelu działania Państwowej Inspekcji Ochrony Roślin i Nasiennictwa opartego na absorpcji innowacji	UW	dr Tomasz Rosiak
2	6.2	Wykorzystanie nowoczesnych technologii teledetekcyjnych na potrzeby nadzoru nad produkcją rolniczą	Ilot	mgr inż. Hubert Skoneczny
3	6.3	Zastosowanie molekularnego testu do jednoczesnego wykrywania wirusów ziemniaka Y, L, M, S, X, A oraz wiroida wrzecionowatości bulw (PSTVd) bezpośrednio w bulwach ziemniaka	IHAR-PIB Oddział w Boninie	dr hab. Krzysztof Treder
4	6.4	Opracowanie multipleksowego testu qPCR pozwalającego na jednoczesne wykrycie w badanym materiale siewnym wielu modyfikacji genetycznych	IHAR-PIB w Radzikowie	dr Sławomir Sowa
5	6.5	Zastosowanie innowacyjnego podejścia (tj. analizy chemometrycznej) do badań jakości środków ochrony roślin, minimalizującego ryzyko stosowania sfałszowanych pestycydów	IOR-PIB	dr Marlena Płonka, mgr Patrycja Marczevska



Narodowe Centrum
Badań i Rozwoju



Państwowa Inspekcja
Ochrony Roślin i Nasiennictwa



FITOEXPORT

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



Podjęto prace nad multipleksową wersją odwrotnej transkrypcji i łańcuchowej reakcji polimerazy w czasie rzeczywistym (multipleks RT-qPCR). Aby skutecznie wykrywać siedem patogenów w jednym teście, optymalizowano warunki tego testu. W tym celu wyselekcjonowano spośród kilku genów metabolizmu podstawowego gen oksydazy cytochromowej (COX), którego ekspresja była stabilna, nie zmieniała się w bulwach chorych w porównaniu z bulwami zdrowymi (Kaczmarek, Treder 2020). Wykrycie mRNA tego genu w badanej próbce oraz w próbach zdrowych i zdrowych kontrolach negatywnych będzie dowodzić, że izolacja RNA oraz test RT-qPCR działają prawidłowo. Ponadto, jeżeli zajdzie taka potrzeba, będzie można w stosunku do niego wyznaczyć poziom ekspresji RNA badanych patogenów ziemniaka.

W celu specyficznego wykrywania badanych patogenów opracowano szereg starterów i sond fluorescencyjnych oraz sprawdzono opisywane w źródłach literaturowych. Spośród nich wybrano te, które pozwalały na powtarzalne wykrywanie patogenów z wysoką czułością w teście multipleksowym. Efektem badań była procedura, w ramach której równolegle wykonywano z jednego preparatu RNA trzy reakcje multipleks RT-qPCR, w jednej wykrywano PVY, PLRV, PVM plus COX, w drugiej PVA, PVS, PSTVd plus COX, w trzeciej – PVM (Kaczmarek i in. 2021). Test w opisanej postaci był gotowy jesienią 2020 r. do wdrożenia w laboratoriach PIORiN w fazie B projektu. Taki format testu był efektem problemów napotkanych w trakcie projektowania sondy fluorescencyjnej do wykrywania PVM.

O ile stosunkowo szybko opracowano startery efektywnie wykrywające ten wirus, o tyle wszystkie opracowane sondy albo nie działały, albo nie były specyficzne i dawały sygnał fluorescencyjny również w obecności

PVY w próbce, pomimo prawie całkowitego braku podobieństwa sekwencji starterów i sondy do sekwencji genomu PVY (Kaczmarek i in. 2021). Prace nad projektowaniem starterów z sondą do wykrywania PVM kontynuowano w fazie B projektu i w roku bieżącym zakończyły się one sukcesem. Trwają obecnie prace nad ponowną adaptacją do wykrywania na dużą skalę uproszczonej wersji testu multipleks RT-qPCR, wykrywającego siedem patogenów RNA w dwóch reakcjach wykonywanych dla jednej badanej próby.

W fazie A badano również możliwość wykrywania patogenów za pomocą izotermicznego testu RT-LAMP. Do wykrywania PVA i PLRV stosowano literaturowy zestaw starterów, dla PVY – startery własne opracowane przed rozpoczęciem projektu (Treder i in. 2018). Dla PSTVd opracowano startery własne, które okazały się bardziej skuteczne niż startery opracowane wcześniej przez innych badaczy. Dla pozostałych patogenów opracowano własne zestawy starterów, ponieważ w literaturze światowej nie było wtedy publikacji opisujących ich wykrywanie testem RT-LAMP. W reakcjach pojedynczych badane patogeny były wykrywane przez RT-LAMP z dużą czułością, jednak niższą niż w teście RT-qPCR (Mielczarek i in. 2021).

Metoda wykrywania planowana do wdrożenia w PIORiN musi być metodą multipleksową, która będzie wykrywać cztery patogeny w pierwszej mieszaninie reakcyjnej oraz trzy patogeny i gen referencyjny w drugiej. Dlatego projektowano również sondy do wykrywania fluorescencyjnego badanych wirusów testem LAMP. Działającą sondę udało się uzyskać tylko dla PVY. Sukces w opracowaniu sond dla innym wirusów przełożyłby się na możliwość wykrywania kilku wirusów w jednej reakcji RT-LAMP.



W teście LAMP stosuje się trzy pary starterów do wykrywania jednego wirusa. Ponadto koncentracja starterów w reakcji jest stosunkowo wysoka. Dlatego przed projektowaniem kolejnych wersji sond zbadano, czy dodanie do mieszaniny reakcyjnej więcej niż jednego zestawu starterów nie wpłynie hamująco na przebieg reakcji. Okazało się, że w obecności starterów na inne wirusy hamowaniu uległa reakcja wykrywająca PVY. Z uwagi na ten wynik nie kontynuowano prac nad testem multipleks LAMP.

W ramach fazy A wykonano również doświadczenie polowe, w którym przygotowano bulwy ziemniaka uzyskane z roślin zainfekowanych przez mszyce (porażenie pierwotne) wirusem Y. Porażenie tych bulw oceniano za pomocą RT-qPCR, RT-LAMP i DAS-ELISA. Z badanych bulw wycięto również oczka i wykonano próbę oczkową. Najwięcej przypadków porażenia wykryto za pomocą RT-qPCR, najmniej za pomocą DAS-ELISA. W próbie oczkowej oraz teście RT-LAMP wykryto podobną liczbę bulw porażonych PVY. Była ona ok. 20% mniejsza od wykrytej testem RT-qPCR i o mniej więcej tyle samo większa od liczby wykrytej za pomocą DAS-ELISA (Mielczarek i in. 2021).

Na podstawie wyników uzyskanych w trakcie realizacji fazy A za metodę rekomendowaną do wdrożenia w laboratoriach w fazie B projektu uznano multipleks RT-qPCR. Obecnie trwają prace wdrożeniowe we współpracy z Centralnym Laboratorium GIORiN w Toruniu. Ich celem jest dostosowanie opracowanej metody do prowadzenia badań na dużą skalę. W laboratoriach PIORiN prowadzących laboratoryjną ocenę weryfikacyjną sadzeniaków ziemniaka ocenia się w próbie oczkowej i teście ELISA rocznie ok. stu tysięcy bulw. By osiągnąć wymagany poziom przepustowości laboratorium i dokonać oceny sadzeniaków w możliwie krótkim przedziale czasowym, satysfakcjonującym przedsiębiorców produkujących

sadzeniaki, konieczne jest zautomatyzowanie całego procesu od homogenizacji prób, poprzez izolację RNA, po składanie reakcji RT-qPCR. W przypadku laboratoriów PIORiN, masowo badających bulwy ziemniaka, optymalne będzie zastosowanie robotów do homogenizacji prób, izolacji RNA i składania reakcji, pozwalających na stworzenie trzech niezależnych linii technologicznych, przetwarzających kilkaset prób równocześnie.

Sam RT-qPCR powinien być prowadzony równocześnie na co najmniej trzech termocyklerych z blokami na płytce 384-dotkowe. Należy nadmienić, że w taki właśnie sposób są zaopatrzone laboratoria odpowiednich służb fitosanitarnych w krajach badających ziemniaki za pomocą RT-qPCR (np. Niderlandy czy Wielka Brytania). Taki zautomatyzowany proces jest optymalizowany w pracach prowadzonych w bieżącym roku w oddziale IHAR-PIB w Boninie oraz w Centralnym Laboratorium GIORiN w Toruniu. Ponadto trwają prace, których celem jest doprowadzenie uzyskanych dotąd wyników do stanu pozwalającego na ich opublikowanie w specjalistycznych czasopismach naukowych. Prowadzi się również szkolenia pracowników laboratoriów Inspekcji, w których pilotażowo zostaną wdrożone opracowane metody. Szkolenia te planowane były na jesień roku 2020, jednak z powodu pandemii zostały przesunięte na rok bieżący.

Podsumowując, w ramach projektu FITOEXPORT zespół badawczy z oddziału IHAR-PIB w Boninie opracował multipleksowy test RT-qPCR do jednoczesnego wykrywania w dwóch równoległych reakcjach siedmiu patogenów o genomach zbudowanych z RNA w jednej bulwie lub próbce pobranej z bulw. Obecnie trwają intensywne przygotowania do wdrożenia metody w laboratoriach PIORiN, w których aktywny udział bierze również zespół wirusologów z Centralnego Laboratorium GIORiN.



Narodowe Centrum
Badań i Rozwoju



Państwowa Inspekcja
Ochrony Roślin i Nasiennictwa



FITOEXPORT

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



Podziękowania

Autorzy pragną podziękować mgr inż. Dorocie Michałowskiej za przygotowanie roślin *in vitro* z kolekcji *in vitro* wirusów ziemniaka – źródeł wirusów, mgr inż. Milenie Sagan za pomoc w izolacji RNA i wykonywaniu RT-qPCR oraz Alicji Przewłóce – za pomoc techniczną w utrzymaniu roślin i badaniu ich testem ELISA. Badania finansowane są przez Narodowe Centrum Badań i Rozwoju w ramach projektu FITOEXPORT, nr umowy Gospostrateg1/385957/5/NCBR/2018.

Literatura

- Kaczmarek A. M., Pawłowska A., Jadach-Żebrowska I., Mielczarek M., Treder K. 2019a.** Wpływ metody izolacji RNA na wykrywanie wirusa ziemniaka Y (PVY) bezpośrednio w bulwach. [W:] Nasiennictwo i ochrona ziemniaka. 52. konf. nauk.-szkol. Dźwirzyno, 22-24 maja 2019. IHAR-PIB Oddz. Bonin: 34;
- Kaczmarek A. M., Pawłowska A., Jadach-Żebrowska I., Mielczarek M., Treder K. 2019b.** Impact of the method of RNA isolation on the detection of potato virus Y (PVY) directly in tubers. [W:] The 17th triennial meeting of the Virology Section of the European Association of Potato Research (EAPR) combined with 10th annual meeting of PVY-wide organization. Laulasmaa, Estonia, June 18-21, 2019. Programme and abstract book: 41. Poster;
- Kaczmarek A., Jadach-Żebrowska I., Pawłowska A., Mielczarek M., Treder K. 2019.** Development of multiplex real-time RT-PCR for simultaneous detection of potato viruses and potato tuber spindle viroid in potato seed tubers. [W:] Eurobiotech, 7th Central European Congress of Life Sciences, 23-25 September 2019, Krakow. Abstract book: 25. Poster No P5.2;
- Kaczmarek A., Treder K. 2020.** Wpływ infekcji wirusem Y ziemniaka na stabilność ekspresji genów referencyjnych w bulwach ziemniaka. [W:] Międzynarodowy Rok Zdrowia Roślin. 60. Sesja Nauk. IOR-PIB. Streszcz. Poznań, 11-13 lutego 2020. IOR-PIB Poznań: 113;
- Kaczmarek A., Pawłowska A., Mielczarek M., Treder K. 2021.** Opracowanie metody opartej o RT-qPCR do wykrywania siedmiu patogenów o genomach RNA bezpośrednio w bulwach ziemniaka. [W:] Nowe strategie ochrony roślin. Konf. ochr. rośl. 61. Sesja Nauk. IOR-PIB. Streszcz. Poznań, 10-12 lutego 2021. IOR-PIB Poznań: 8;
- Mielczarek M., Kaczmarek A., Pawłowska A., Treder K. 2021.** Opracowanie metody wykrywania wiroida wrzecionowatości bulw ziemniaka oraz najważniejszych wirusów infekujących rośliny ziemniaka za pomocą izotermicznego testu łączącego odwrotną transkrypcję z amplifikacją kwasów nukleinowych za pośrednictwem pętli (RT-LAMP). [W:] Nowe strategie ochrony roślin. Konf. ochr. rośl. 61. Sesja Nauk. IOR-PIB. Streszcz. Poznań, 10-12 lutego 2021. IOR-PIB Poznań: 36;
- Treder K., Chołuj J., Zacharzewska B., Babujee L., Mielczarek M., Burzyński A., Rakotondrafara A. 2018.** Optimization of a magnetic capture RT-LAMP assay for fast and real-time detection of potato virus Y and differentiation of N and O serotypes. – Arch. Virol. 163: 447-458;
- Treder K., Mielczarek M., Pawłowska A., Kaczmarek A., Jadach-Żebrowska I. 2019.** Reverse-transcription loop-mediated isothermal amplification as an innovative tool for the detection of RNA-pathogens infecting potato plants. [W:] Eurobiotech, 7th Central European Congress of Life Sciences, 23-25 September 2019, Krakow. Abstract book: 24. Talk No L5.2.

