



# **Od laboratorium do zdrowego sadzeniaka Przełom w badaniach wirusów jakościowych ziemniaka**

Krzysztof Treder

Instytut Hodowli i Aklimatyzacji Roślin – PIB,  
Oddział w Boninie, Pracownia Diagnostyki  
Molekularnej i Biochemii, 76-009 BONIN



Konferencja

**„Strategia PIORiN na lata 2022-2027. Innowacje wspierające polską gospodarkę.”**

Warszawa, 16 listopada 2021 r.

# Projekt FITOEXPORT - Zwiększenie konkurencyjności polskich towarów roślinnych na rynkach międzynarodowych poprzez podniesienie ich jakości i bezpieczeństwa fitosanitarnego



Narodowe Centrum  
Badań i Rozwoju

Nr Umowy o wykonanie i finansowanie Projektu: **Gospostrateg1/385957/5/NCBR/2018**

- Projekt finansowany w ramach I konkursu strategicznego programu GOSPOSTRATEG - *Spółeczny i gospodarczy rozwój Polski w warunkach globalizujących się rynków*
- Kierownik Projektu: dr **Janina Butrymowicz**, CL GIORiN w Toruniu
- Lider Projektu: Główny Inspektorat Ochrony Roślin i Nasiennictwa (GIORiN)
- Partnerzy: Uniwersytet Warszawski, Instytut Lotnictwa, IHAR-PIB, IOR-PIB.
- IHAR-PIB, Oddział w Boninie – Zadanie 3 oraz podzadanie 6.3



Państwowa Inspekcja  
Ochrony Roślin i Nasiennictwa



UNIWERSYTET  
WARSZAWSKI



instytutlotnictwa  
warszawa, rok założenia 1926



## 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



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



Główny wykonawca:  
dr **Agata Kaczmarek**



mgr inż. **Anna Pawłowska**



st. technik  
**Maria Fedczak**

mgr inż. **Mateusz Mielczarek**

mgr inż. **Milena Sagan**

technik  
**Alicja Przewłoka**



Narodowe Centrum  
Badań i Rozwoju



## 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 Centralnego Laboratorium GIORiN w Toruniu

Kierownik projektu: dr Janina Butrymowicz

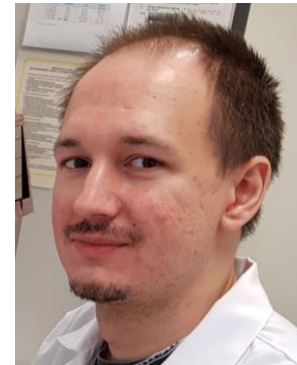
Wirusolodzy z Centralnego Laboratorium GIORiN w Toruniu:



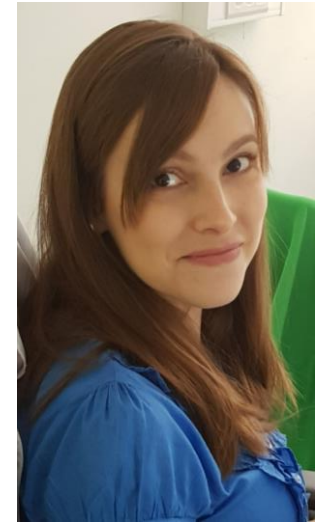
Kierownik zespołu:  
mgr **Justyna Pięcińska**



mgr **Anna Rosińska**



mgr **Marek Woźny**



mgr **Agnieszka Mocka**



Narodowe Centrum  
Badań i Rozwoju



Państwowa Inspekcja  
Ochrony Roślin i Nasiennictwa



FITOEXPORT

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



# Laboratoria PIORiN

Urzędowa ocena weryfikacyjna sadzeniaków ziemniaka

- 12 laboratoriów wykonujących badanie
- około 2500 prób rocznie
- około 350 tysięcy bulw do przebadania w sezonie
- badanie za pomocą próby oczkowej i testu ELISA
- wysokie koszty szklarni
  - odnowienie infrastruktury szklarniowej Inspekcji - jednorazowy koszt ponad 30 mln
  - wysokie koszty utrzymania szklarni (ekonomiczne i środowiskowe)



Narodowe Centrum  
Badań i Rozwoju



Państwowa Inspekcja  
Ochrony Roślin i Nasiennictwa



FITOEXPORT  
GIORIN, UW, ILOT, I HAR-PIB, IOR-PIB



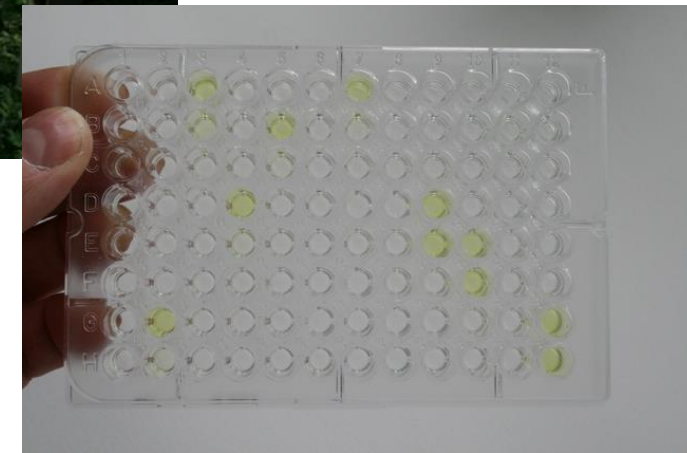
# Próba oczkowa i test ELISA

## Zalety:

- metoda sprawdzona
- wiarygodna
- czuła

## Wady:

- Wieloetapowa i długotrwała
- Uprawa roślin w szklarni
- koszty ogrzewania i doświetlania
- Koszty remontu szklarni



Fot.: dr hab. Sławomir Wróbel

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

## Cel:

- opracowanie molekularnej metody multipleksowego wykrywania wirusów i wiroida bezpośrednio w ekstraktach z bulw ziemniaka
- skrócenie czasu wykonania oceny weryfikacyjnej
- docelowo: obniżenie kosztów oceny weryfikacyjnej

# Kamienie milowe:

- 1. Dobór metody izolacji RNA z bulw – 3 miesiąc.**  
Zrealizowane w planowanym terminie.
- 2. Optymalizacja warunków multiplex RT-qPCR – 6 miesiąc.**  
Zrealizowane w 10 miesiącu realizacji projektu.
- 3. Optymalizacja warunków uniplex RT-LAMP – 12 miesiąc.**  
Zrealizowano w terminie dla 6 z 7 patogenow.
- 4. Ocena czy możliwe jest opracowanie multipleks RT-LAMP – 14 miesiąc.**  
Zrealizowane w 18 miesiącu realizacji projektu.
- 5. Porównanie skuteczności testów multipleks RT-qPCR i unipleks lub multipleks RT-LAMP – 18 miesiąc.**  
Zrealizowane w 20 miesiącu realizacji projektu.



Narodowe Centrum  
Badań i Rozwoju



Państwowa Inspekcja  
Ochrony Roślin i Nasiennictwa

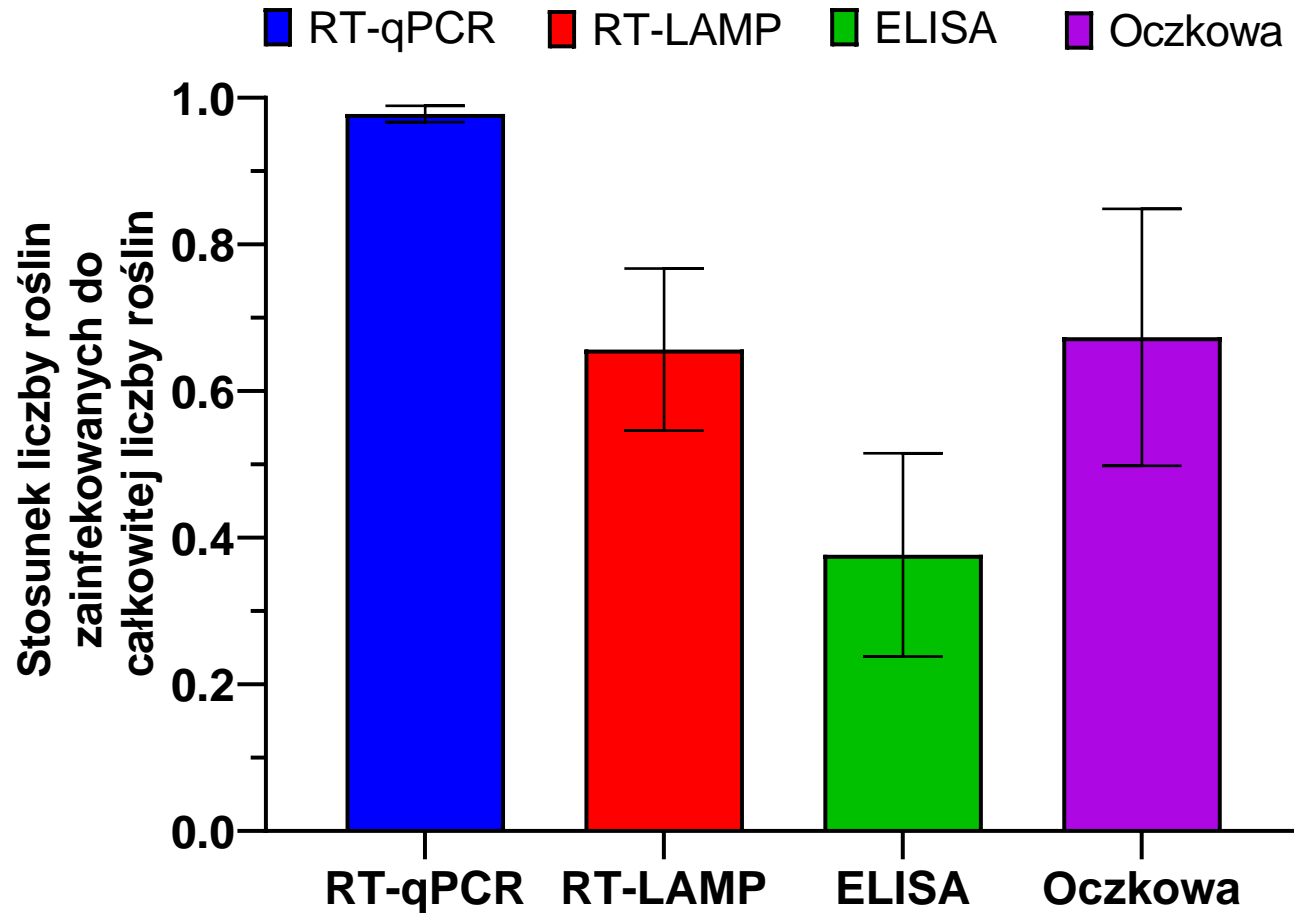


FITOEXPORT  
GIORIN, UW, ILOT, IHAR-PIB, IOR-PIB





# Skuteczność opracowanych metod w ocenie weryfikacyjnej sadzeniaków



Słupki przedstawiają stosunek uzyskany przez podzielenie liczby wyników pozytywnych przez całkowitą liczbę badanych bulw.



Narodowe Centrum  
Badań i Rozwoju



# Etapy opracowanej metody multipleks RT-qPCR:

1. Pobranie ok 50 mg tkanki z bulwy do 2 ml probówek lub studzienek płytki o 96 dołkach, 2 ml każdy
2. Jednoczesna homogenizacja prób na homogenizatorze (3 min dla 48/96/4x a nawet 6x 96 prób)
3. Izolacja RNA za pomocą robota KingFisher (1h dla 96 prób jednocześnie)
4. Wykrywanie wirusów i wiroida w 2 reakcjach multiplex RT-qPCR: jednej dla wirusów Y, L i M i drugiej dla wirusów S, A, X i wiroida PSTVD. (1,5h dla 96 lub 386 prób)
5. Jednocześnie wykrywane jest mRNA genu referencyjnego – oksydazy cytochromowej (COX)



Narodowe Centrum  
Badań i Rozwoju



Państwowa Inspekcja  
Ochrony Roślin i Nasiennictwa



F I T O E X P O R T  
GIORIN, UW, ILOT, IHAR-PIB, IOR-PIB



# Mierzalne efekty realizacji Zadania 3:

- Liczba patogenów dla których opracowana została metoda - **7**.
- Liczba opracowywanych metod: **2** (RT-qPCR, RT-LAMP).
- Liczba metod porównywanych - **3** (próby oczkowe zakończone testem ELISA, RT-qPCR, RT-LAMP).
- Liczba metod przygotowanych do wdrożenia w PIORIN - **1**.

# Ocena możliwości wdrożenia wyników realizacji zadania

- Gotowa do wdrożenia zautomatyzowana metoda izolacji RNA z bulw i z liści ziemniaka. **Zalecana. Wdrożona w CL w Toruniu.**
- Gotowy do wdrożenia test multiplex RT-qPCR na 7 patogenów (w postaci 2 reakcji – tetra i tripleksowej). **Zalecany. Wdrożony w CL w Toruniu.**
- Gotowe do wdrożenia testy unipleksowe RT-LAMP na wirusy Y, L, M, S, A, X oraz na wiroid PSTVd. Testy LAMP można wykorzystać w razie wątpliwości, jako dodatkowe potwierdzenie obecności spornego patogena.



Narodowe Centrum  
Badań i Rozwoju



Państwowa Inspekcja  
Ochrony Roślin i Nasiennictwa



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



# Aparatura konieczna do wdrożenia metody w laboratoriach PIORiN

- Homogenizator do jednoczesnej homogenizacji fragmentów pobranych z 200 bulw
- Robot do jednoczesnej izolacji kwasów nukleinowych z 96 prób



Narodowe Centrum  
Badań i Rozwoju



Państwowa Inspekcja  
Ochrony Roślin i Nasiennictwa

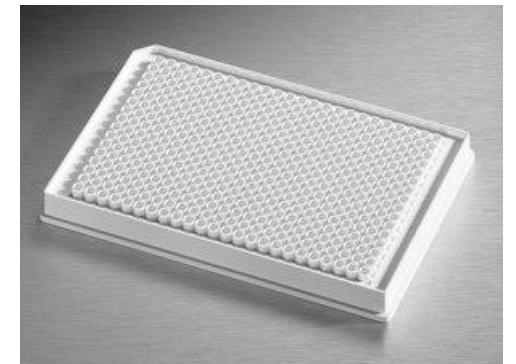
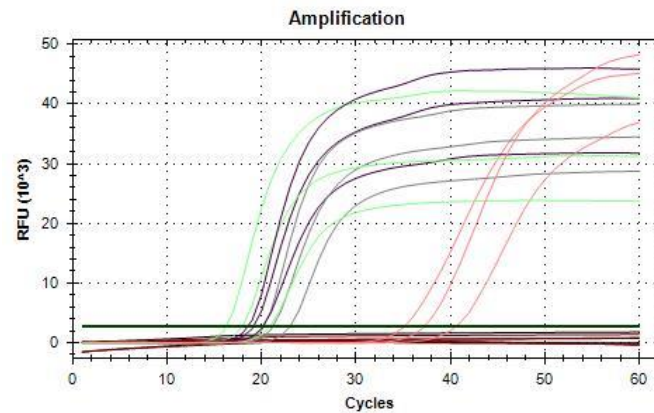


FITOEXPORT  
GIORIN, UW, ILOT, IHAR-PIB, IOR-PIB



# Aparatura konieczna do wdrożenia metody w laboratoriach PIORiN

- Stacja pipetująca do składanie reakcji RT-qPCR na płytach 384-dołkowych
- Termocykler czasu rzeczywistego



# Dlaczego przełom ?

- Czas wykonania 1 próby – skrócenie z 5-6 tygodni do 2-3 dni
- Okres wykonywania oceny weryfikacyjnej sadzeniaków w laboratoriach
  - obecnie – sierpień- marzec
  - przy automatyzacji procesu badawczego – skrócenie do 2-3 miesięcy

# Dlaczego przełom ?

- Długofalowo - obniżenie kosztów badań
  - Szacunkowy jednorazowy koszt doposażenia jednego laboratorium – ok 800 000 zł
  - Możliwość ograniczenia liczby laboratoriów wykonujących certyfikację
  - Koszt odnowienia infrastruktury szklarniowej GIORiN – ponad 30 mln zł



Narodowe Centrum  
Badań i Rozwoju



Państwowa Inspekcja  
Ochrony Roślin i Nasiennictwa



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





# Dlaczego przełom ?

- Obniżenie pracochłonności badań – dzięki automatyzacji będą wymagały mniejszej liczby specjalistycznego personelu
- Opracowana metoda
  - wpisuje się w najnowsze trendy w diagnostyce laboratoryjnej
  - wykorzystuje najnowocześniejsze rozwiązania technologiczne
  - jest zgodna ze standardami międzynarodowymi
- Zakupiona aparatura będzie wykorzystana w laboratoriach GIORiN do wielu innych badań

Dziękuję za  
uwagę



Państwowa Inspekcja  
Ochrony Roślin i Nasiennictwa



Narodowe Centrum  
Badań i Rozwoju



FITOEXPORT

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

