



Opracowanie czułych metod wykrywania najważniejszych wirusów ziemniaka

Zespół wykonawców projektu:

kierownik projektu

- dr hab. Krzysztof Treder, k.treder@ihar.edu.pl

Wykonawcy:

- mgr inż. Anna Pawłowska (2014-2016, 2018-2020)
- mgr inż. Bogumiła Zacharzewska (2014-2015, 2017)
- mgr inż. Joanna Chołuj (2014-2016)
- mgr inż. Marta Dybner (2015 – marzec 2016)
- mgr inż. Mateusz Mielczarek (wrzesień 2016 – luty 2020)
- dr Agata Kaczmarek (luty 2019 – marzec 2020)
- mgr inż. Dorota Michałowska (2015)
- dr inż. Agnieszka Przewodowska (2014)
- dr hab. inż. Włodzimierz Przewodowski (2014)
- st technik Maria Fedczak (2014-2020)

Miejsce realizacji projektu:

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



Okres realizacji: 2014-2020

Nr w planach IHAR-PIB: 4-3-00-7-01

Cel główny projektu:

Opracowanie czułych metod wykrywania najważniejszych patogenów wirusowych (PVY, PVM, PLRV) w bulwach, kiełkach i liściach ziemniaka, dedykowanych do realizacji różnych celów badawczych

Cel główny realizowano w ramach szczegółowych tematów badawczych:

1. Opracowanie i optymalizacja nowych metod wykrywania wirusów
2. Ocena wpływu odporności odmian ziemniaka na skuteczność wykrywania wirusów w bulwach
3. Badania nad wykrywaniem wirusów w bulwach i kiełkach ziemniaka
4. Adaptacja i optymalizacja metod molekularnych do wykrywania wirusów w roślinach *in vitro*
5. Opracowanie testów diagnostycznych do szybkiego wykrywania wirusów w warunkach polowych

Osiągnięto wszystkie założone cele projektu

Materiały i metody

Temat badawczy 1. Syntezowano nanocząsteczki magnetyczne, koniugowano z IgG oraz kupiono komercyjne nanomateriały i mikro płytki filtracyjne ze złożami jonowymiennymi. Optymalizowano wiązanie przeciwciał i zagęszczanie wirusów z soku ziemniaka na nanocząstkach magnetycznych oraz wiązanie i elucję cząstek wirusowych na złożach jonowymiennych. Porównywano czułość opracowanych metod z testem ELISA.

Temat badawczy 2. Zdrowe bulwy odmian o różnym stopniu odporności na wirusy PVY, PLRV i PVM wysadzano na polu w obecności infektorów. Po zbiorze wykrywano wirusy w bulwach. Jako badanie kontrolne, określające rzeczywiste porażenie badanych bulw wykonywano próbę oczkową. Identyczne badanie zlecono do wykonania na mniejszej liczbie odmian trzem niezależnym laboratoriom diagnozującym ziemniaki.

Temat badawczy 3. Porównano wykrywanie wirusów PVY, PLRV i PVM w kiełkach za pomocą testu ELISA z próbą oczkową w doświadczeniu własnym oraz zleconym trzem laboratoriom. W doświadczeniu własnym porównano również skuteczność wykrywania wirusów w bulwach, kiełkach i w próbie oczkowej za pomocą testów molekularnych (RT-qPCR, RT-LAMP) z testem ELISA.

Temat badawczy 4. Opracowano własne startery do wykrywania PVY, PLRV i PVM. Porównano ich skuteczność ze starterami literaturowymi. Optymalizowano izolację RNA z roślin *in vitro* oraz warunki reakcji RT-PCR i RT-qPCR oraz. Za pomocą optymalnej procedury badano zasoby Banku Genów Ziemniaka.

Temat badawczy 5. Projektowano startery oraz optymalizowano warunki wykrywania wirusów za pomocą izotermicznego testu LAMP. Optymalizowano izolację RNA i przygotowanie soku do wykrywania bez izolacji. Porównano czułość i szybkość wykrywania wirusów za pomocą testu RT-LAMP oraz testów paskowych.

Opracowanie i optymalizacja nowych metod wykrywania wirusów

Nanocząsteczki magnetyczne

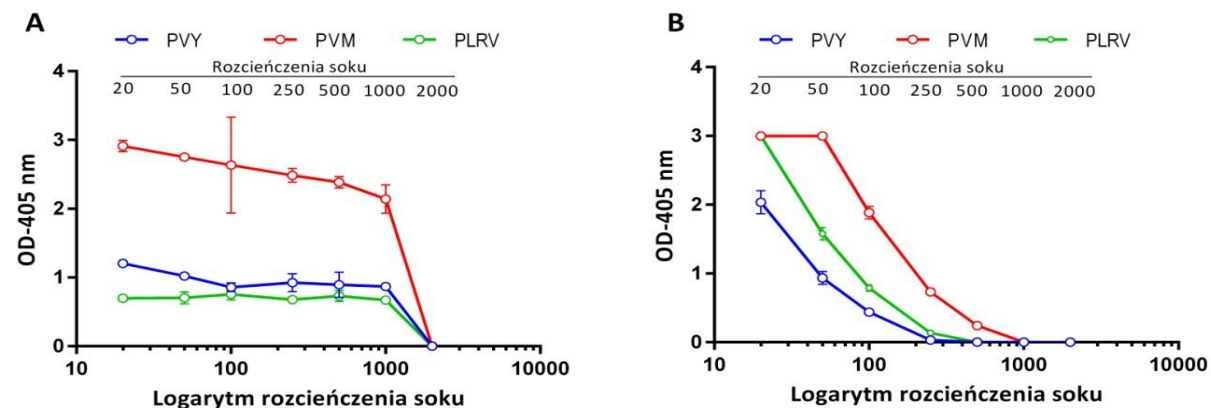
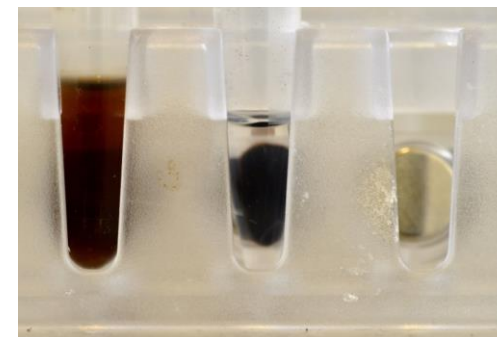
- opracowano procedurę zagęszczania i wykrywania wirusów za pomocą magnetycznego testu ELISA.
- wytworzono mikrosfery o dobrych właściwościach magnetycznych i dyspersyjnych lecz o niskiej pojemności wiązania przeciwciał
- wyższą czułość wykrywania wirusów uzyskano stosując komercyjne mikrosfery magnetyczne
- magnetyczny wariant ELISA z wykorzystaniem komercyjnych mikrosfer posiada czułość wyższą od standardowego testu ELISA.
- Test magnetyczny na mikrosferach komercyjnych pozwala na wykrycie PVY i PLRV z czułością 10-krotnie wyższą niż test DAS-ELISA. Czuość testu magnetycznego dla PVM jest 2-krotnie wyższa w porównaniu z DAS-ELISA (Rys. 1.).

Test filtracyjny na mikroplótkach ze złożem jonowymiennym

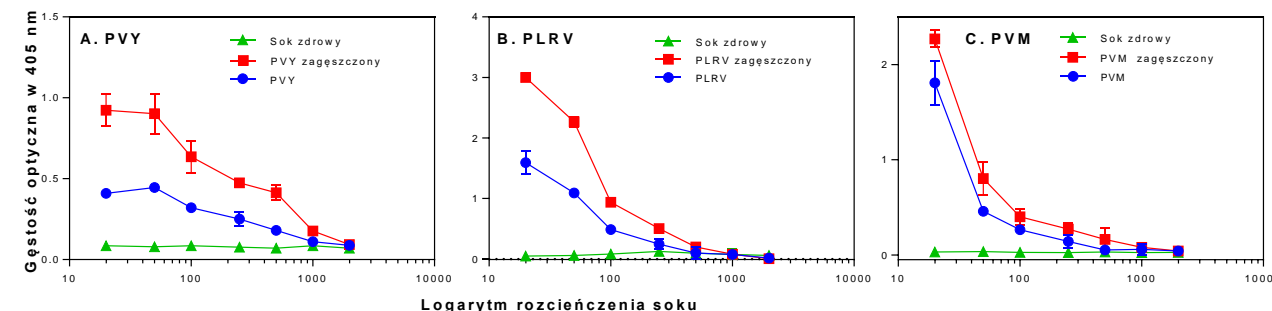
- Wirusy PVY, PLRV i PVM wiązały się do membrany Q lepiej niż do membrany S.
- Optymalne wiązanie wirusów do membrany Q zachodzi w pH 5,5.
- Zagęszczanie wirusów na membranie Q zwiększa około dwukrotnie czułość ich wykrywania za pomocą testu ELISA w porównaniu do tych samych prób niezagęszczanych (Rys. 2).
- Niewielki wzrost czułości testu może wynikać z tego, że pH optymalne dla wiązania wirusów do membrany Q nie pokrywa się z pH optymalnych dla stabilności cząstek wirusowych.

Wnioski

- test magnetyczny stanowi czułą alternatywę dla DAS-ELISA i ma duży potencjał aplikacyjny
- test filtracyjny może znaleźć zastosowanie w badaniach nad biologią wirusów lecz nie nadaje się do diagnostyki na dużą skalę



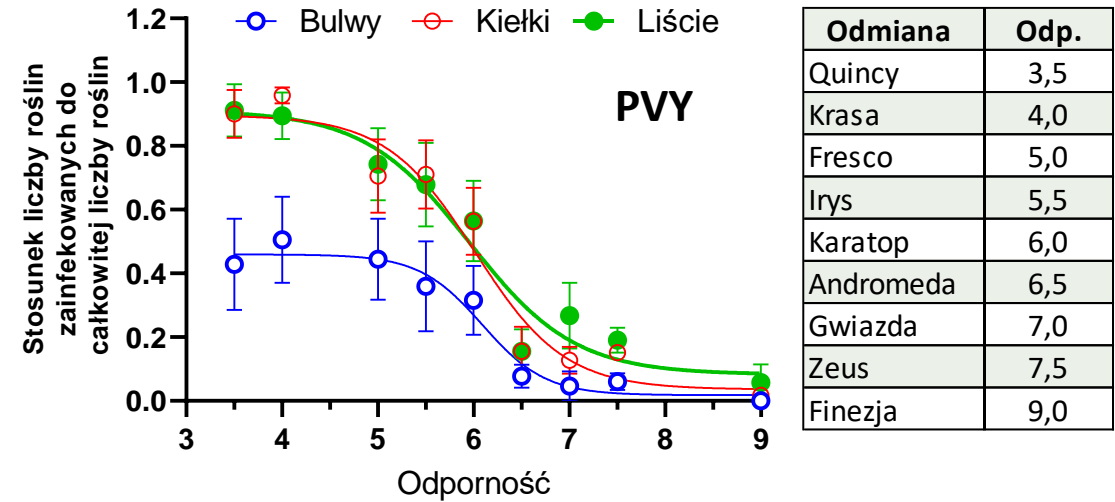
Rys. 1 Porównanie czułości wykrywania wirusów PVY, PVM i PLRV za pomocą magnetycznego wariantu ELISA (A) i standardowego testu DAS-ELISA (B). Wartości absorbancji w 405 nm odczytane po 1h inkubacji z substratem – OD-405 nm. Słupki błędów oznaczają odchylenie standardowe.



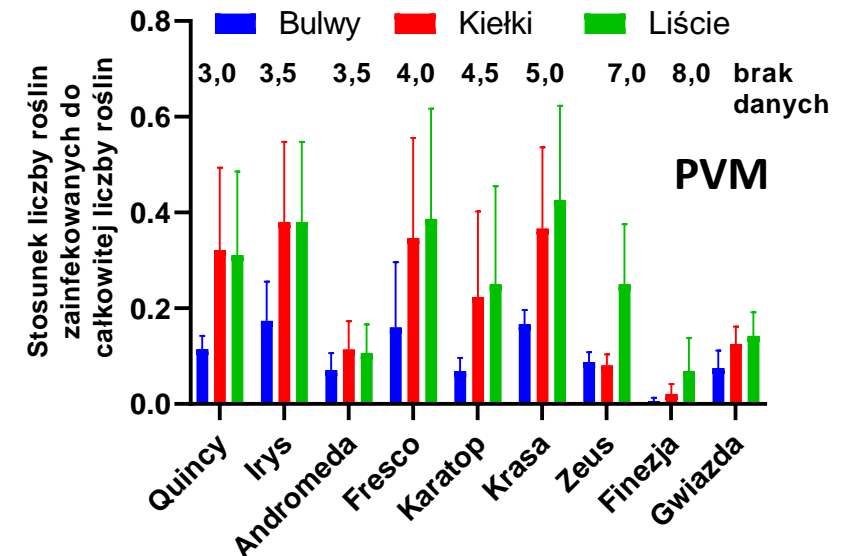
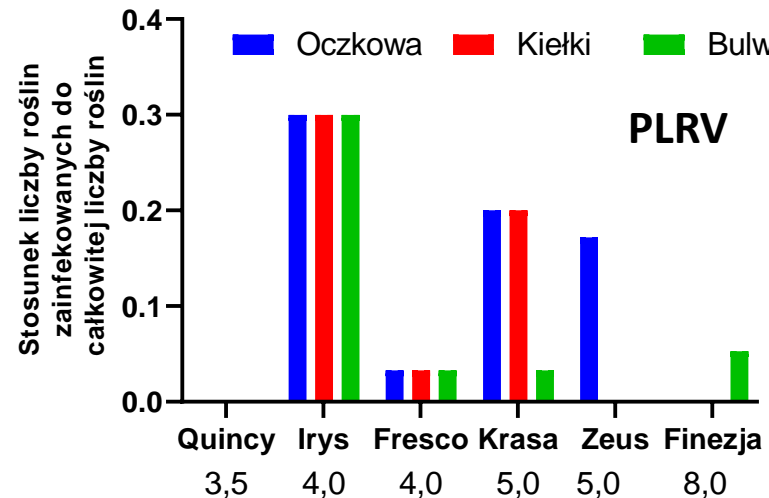
Rys. 2. Wpływ zagęszczania wirusów na membranie Q na czułość wykrywania w teście ELISA. Niezagęszczane rozcieńczenia soku w buforze ekstrakcyjnym o pH 5,5 – linie niebieskie. Próby zagęszczane na membranie Q – linie czerwone. Sok ze zdrowych roślin – linie zielone.

Ocena wpływu odporności odmian ziemniaka na skuteczność wykrywania wirusów w bulwach

- Zależność poziomu porażenia odmian wirusem Y od odporności odmian ma przebieg sigmoidalny.
- Z równania funkcji opisującej tę zależność można interpolować odporność odmian lub rodów na podstawie ich porażenia, określonego za pomocą próby oczkowej lub badania kielków.
- Wzrost odporności odmian negatywnie wpływa na wykrywalność PVY w bulwach.
- W latach 2014-2020 porażenie PVY było wysokie.
- Dla PVM i PLRV nie obserwowano podobnej zależności, jednak porażenie tymi wirusami było za małe by wyciągać jakiegokolwiek wnioski.
- W latach 2014-2020 pomimo wysadzania infektorów porażenie PLRV i PVM było bardzo niskie.



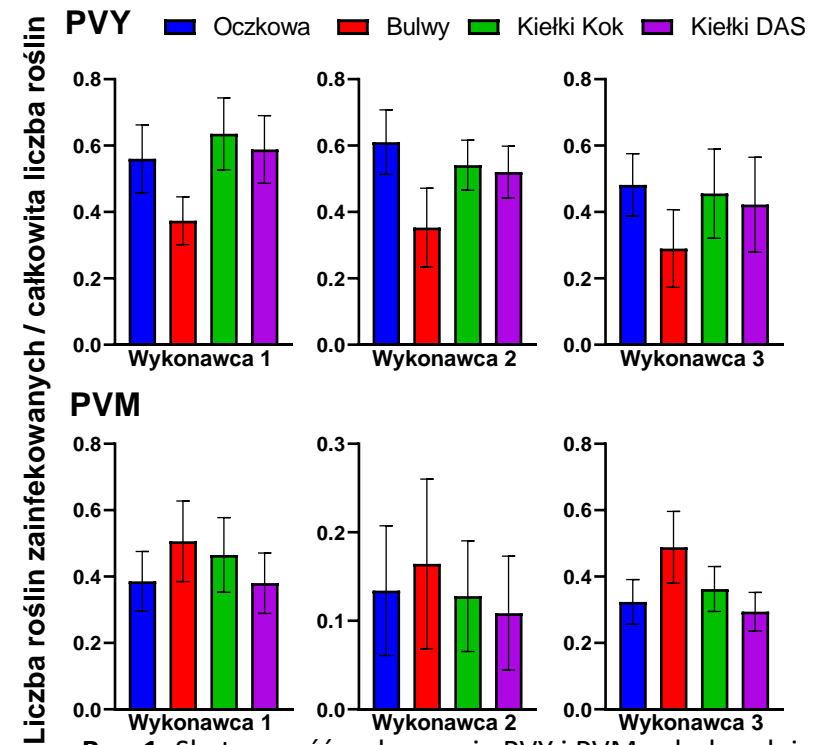
Rys. 1. Wpływ odporności odmian na wykrywalność PVY w bulwach. Liście – próba oczkowa. Uśrednione wyniki z lat 2014-2020. Odchylenia wskazują błąd standardowy.



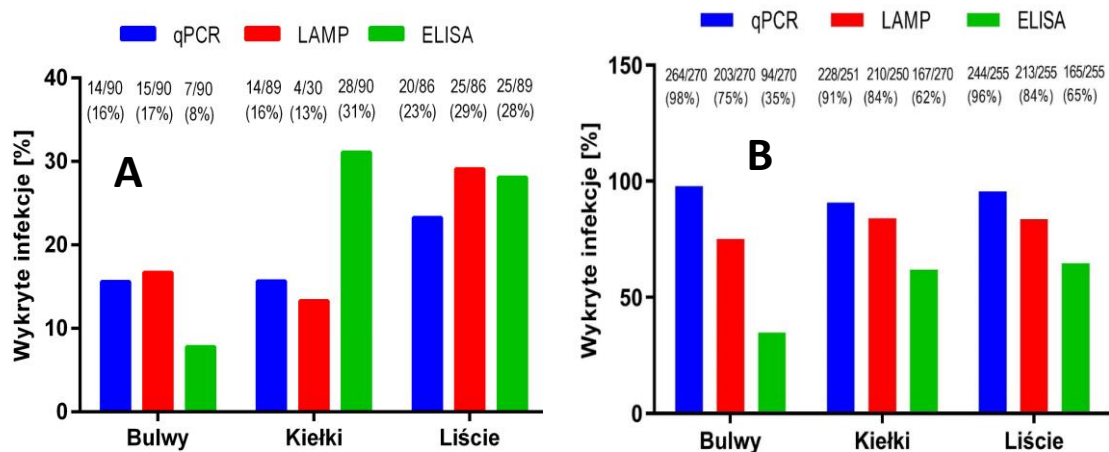
Rys. 2. Wpływ odporności odmian na wykrywalność PVY w bulwach. Uśrednione wyniki z lat 2014-2020. Odchylenia wskazują błąd standardowy.

Badania nad wykrywaniem wirusów w bulwach i kielkach ziemniaka

- W latach 2014-2020 porażenie wirusem PVY było wysokie, średnia z lat u wszystkich wykonawców wynosi ponad 50%. Porażenie PVM było mniejsze, szczególnie u Wykonawcy 2. Wirus PLRV praktycznie nie występował w badanym okresie na polach wykonawców.
- W bulwach za pomocą testu ELISA wszyscy wykonawcy wykrywali istotnie mniejszą liczbę porażen wirusem PVY niż za pomocą próby oczkowej.
- Badanie kielków zarówno za pomocą testu Koktajl-ELISA jak i DAS-ELISA pozwalało na wiarygodną ocenę porażenia bulw wirusem PVY, wyniki tych testów nie różnią się od uzyskanych za pomocą próby oczkowej.
- W przypadku wirusa PVM badanie bulw jest równie wiarygodne jak próba oczkowa czy badanie kielków. Podobny wynik w przeszłości uzyskano dla PLRV.



Rys. 1. Skuteczność wykrywania PVY i PVM w bulwach i w kielkach. Uśrednione wyniki z lat 2014-2020. Odchylenia wskazują błąd standardowy.

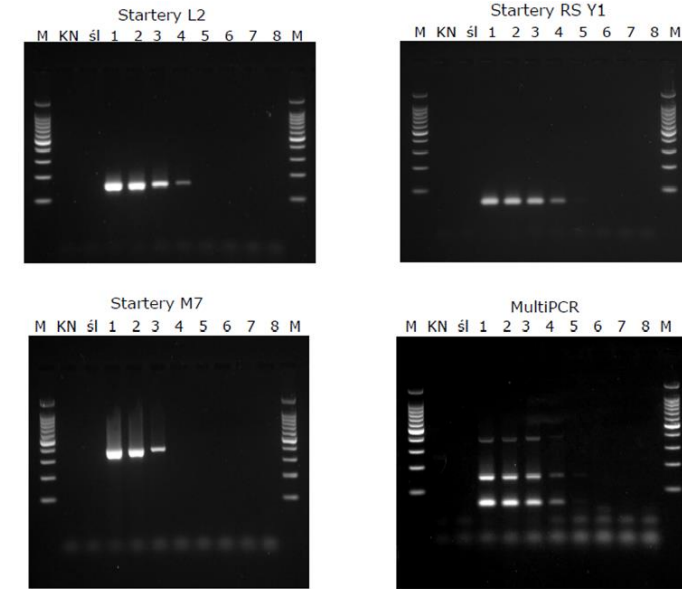


Rys. 2. Porównanie skuteczności wykrywania wirusa Y ziemniaka w bulwach, kielkach i w roślinach uzyskanych w próbie oczkowej (liście) za pomocą testu ELISA, testu RT-PCR w czasie rzeczywistym (qPCR) oraz testu RT LAMP. Nad słupkami obrazującymi procent roślin pozytywnie zdiagnozowanych przez dany test podano liczbę wykryć w stosunku do całkowitej liczby badanych roślin i w nawiasie procent chorych. Izolacja RNA za pomocą krzemionki – A, izolacja RNA za pomocą zestawu kolumnkowego A&A Biotechnology - B.

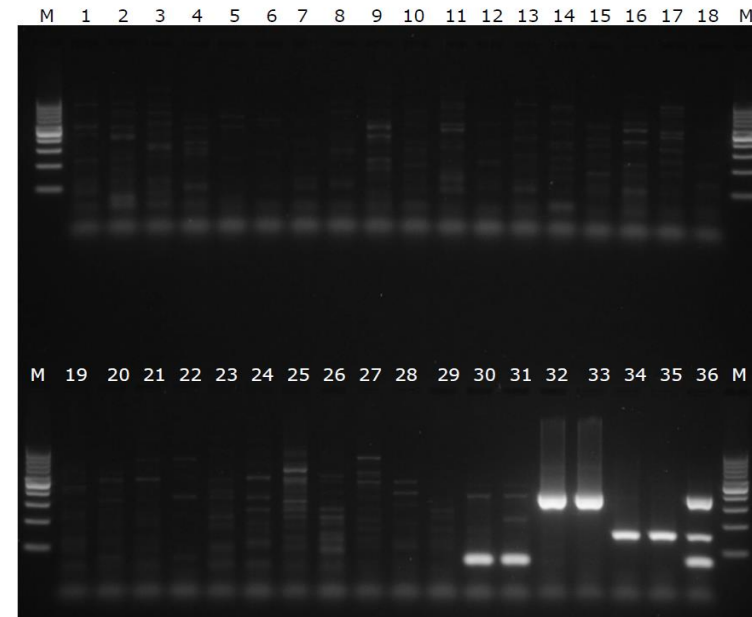
- Skuteczność testu RT-qPCR zależy od wybranej metody izolacji RNA.
- W połączeniu z optymalną metodą izolacji RNA RT-qPCR wykrywa więcej porażen PVY w bulwach, kielkach i w roślinach uzyskanych za pomocą próby oczkowej niż test RT-LAMP, czy test ELISA.

Adaptacja i optymalizacja metod molekularnych do wykrywania wirusów w roślinach *in vitro*

- Optymalizowano metody izolacji RNA z roślin *in vitro* oraz warunki reakcji RT-PCR. Izolacja RNA na krzemionce (Zacharzewska i in., 2014) umożliwiła wykrywanie PVY w roślinach *in vitro* z taką samą skutecznością jak procedura wykorzystująca komercyjny zestaw do izolacji RNA. Dzięki temu obniżono koszt analizy. Zastosowanie cząstek magnetycznych do izolacji RNA pozwoliło na skrócenie czasu analizy.
- Opracowano test tripleks RT-PCR do jednoczesnego wykrywania PVY, PVM i PLRV. Dla dwóch ostatnich wirusów opracowano własne pary starterów.
- Czułość wykrywania wirusów PVY i PLRV w reakcji uniplex-PCR była taka sama jak multiplex-PCR (100 pg/reakcję), natomiast czułość wykrywania wirusa PVM była mniejsza niż multiplex-PCR i pozwalała wykryć wirus w reakcji zawierającej 1 ng całkowitego RNA.
- Za pomocą opracowanego testu RT-PCR przebadano kolekcję bazową polskich odmian ziemniaka i wykazano, że jest wolna od wirusów.
- W celu dalszego uproszczenia badania zasobów genowych Banku Genów Ziemniaka opracowano test RT-qPCR w czasie rzeczywistym do wykrywania PVY i PLRV w reakcji multipleksowej i PVM w reakcji pojedynczej.



Rys. 1. Porównanie czułości uniplex RT-PCR dla poszczególnych par starterów (L2, RS Y1, M7) oraz multiplex PCR. KN – RNA wyizolowane ze zdrowych roślin, śl- woda zamiast RNA, ścieżka 1- KP RNA porażonej rośliny, ścieżki 2-8 10-krotne seryjne rozcieńczenia od 10 ng do 10 fg RNA w reakcji. M – marker Nova100 bp DNA (Novazym), między 100-1000 pz co 100 pz, powyżej 1000 pz – jeden prążek o wielkości 1500 pz.



Rys. 2. Wykrywanie wirusów PVY, PVM i PLRV za pomocą multiplex RT-PCR w genotypach ziemniaka z Banku Genów. M- marker Nova 100 bp DNA (Novazym) 100-1000 pz co 100 pz; ścieżki 1-29 badane próby *in vitro*; 30 - 31 genotypy z banku z PVY; 32-33 genotypy z PVM; 34-35 genotypy z PLRV, 36 - kontrola pozytywna zawierająca PVY, PVM, PLRV. Badane próby zostały poddane reakcji PCR z użyciem następujących starterów: L2, M7 i RSY1.

Opracowanie testów diagnostycznych do szybkiego wykrywania wirusów w warunkach polowych

- Opracowano szybki test Y4 RT-LAMP do wykrywania PVY (Treder i in. 2018).
- Test wykrywa wirus z czułością 1000-krotnie większą niż testy paskowe i test ELISA oraz 10-krotnie większą niż RT-PCR.
- Duża szybkość wykonania testu RT-LAMP świadczy, że można go adaptować do warunków polowych.
- Za pomocą testu Y4 RT-LAMP można różnicować populację PVY pod względem typu białka płaszczka na grupy serologiczne O i N.
- Opracowano również szybkie testy RT-LAMP do wykrywania PLRV i PVM
- Wykazano, że test fluorescencyjny RT-LAMP wykrywa PVY, PVM i PLRV bezpośrednio w rozcieńczonych sokach z co najmniej taką samą czułością jak w preparatach RNA izolowanych z tych soków.
- Test na sokach pozwalał na wykrycie wirusa w ciągu 5-20 minut.

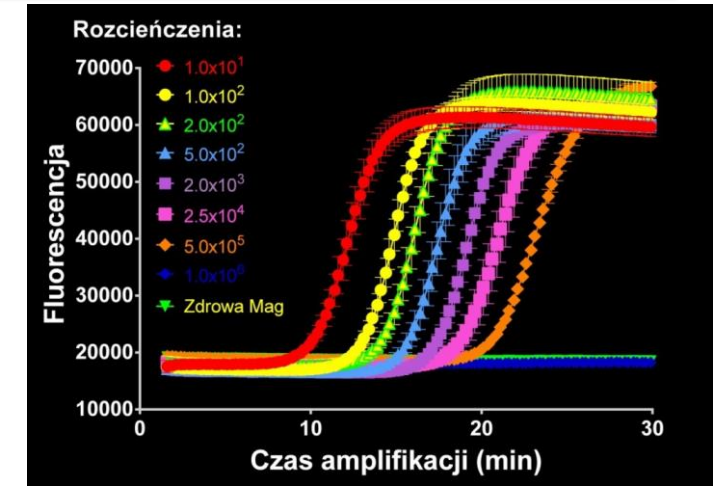
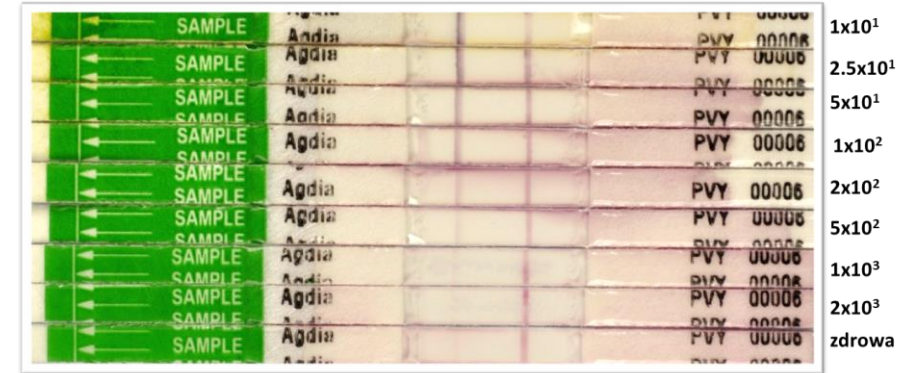
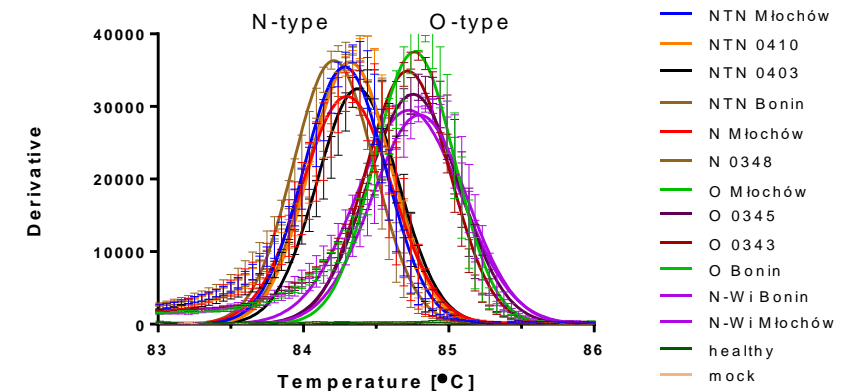


Tabela 1. Czułość wykrywania PVM i PLRV za pomocą opracowanych starterów (PVM) oraz starterów literaturowych (Almasi PLRV) za pomocą RT-LAMP wykorzystującym w miejsce RNA sok jako matrycę do amplifikacji. Rozcieńczenia soku wolnego od wirusów – KN. Rozcieńczenia soku z danym wirusem – KP. Czas po którym stwierdzano wynik pozytywny obliczono dzieląc liczbę cykli (Cq) przez dwa, ponieważ jeden cykl zajmował 30 sekund. Specyficzność produktu oceniano wyznaczając temperaturę topnienia (Tm).

Startery	Almasi PLRV				PVM			
	KN		KP		KN		KP	
rozć soku	Czas (min)	Tm (°C)	Czas (min)	Tm (°C)	Czas (min)	Tm	Czas (min)	Tm (°C)
100x	-	-	-	-	-	-	-	-
200x	-	-	26,13	90	-	-	19,71	90
500x	-	-	27,24	90,5	-	-	20,49	90
1000x	-	-	28,29	90,5	-	-	22,68	90
10000x	-	-	36,37	90	-	-	26,68	90
100000x	-	-	-	-	-	-	27	90
1 mln	-	-	-	-	-	-	-	-
2 mln	-	-	-	-	-	-	-	-
Ślepa	-	-	-	-	-	-	-	-
KP RNA	-	-	12,07	90	-	-	18,17	89



Podsumowanie

- Opracowano magnetyczny test ELISA w oparciu o mikrosfery magnetytowe, który umożliwia zagęszczanie cząstek wirusa z większych objętości soku i jego czułą detekcję
- Wykazano, że wraz ze wzrostem odporności odmian ziemniaka na PVY spada wykrywalność wirusa w bulwach. Zależność poziomu porażenia PVY od odporności odmian ma przebieg sigmoidalny.
- Stosując wzorcowe odmiany ziemniaka stworzono model, za pomocą którego można szacować poziom odporności odmian na PVY, dla których nie był on określony.
- Wykazano, że wykrywanie PVY i PVM za pomocą badania kiełków jest równie skuteczne jak próba oczkowa. Zastąpienie próby oczkowej testowaniem kiełków eliminuje koszty szklarni i skraca czas certyfikacji bulw o ok 3-4 tygodnie (czas wzrostu roślin w szklarni).
- Wykazano, że przy zastosowaniu odpowiedniej metody izolacji RNA z bulw test RT-qPCR pozwala na wykrywanie PVY w bulwach co najmniej równie wiarygodne jak próba oczkowa.
- Opracowano test multipleks RT-PCR oraz test RT-PCR w czasie rzeczywistym do wykrywania PVY, PVM i PLRV w roślinach in vitro i przebadano za pomocą tych metod kolekcję bazową polskim odmian ziemniaka w Banku Genów Ziemniaka, potwierdzając, że jest wolna od wirusów.
- Opracowano szybkie testy izotermiczne RT-LAMP do wykrywania PVY, PVM i PLRV. Opracowane testy były tysiąc razy bardziej czułe niż testy paskowe przy podobnym czasie wykonania.
- Wyniki uzyskane w ramach realizacji projektu umożliwiły przeprowadzenie przewodu habilitacyjnego kierownikowi projektu.

Doniesienia konferencyjne (6 referatów, 11 posterów):

1. Zacharzewska B., Przewodowska A., Treder K. 2014. Wpływ sposobu izolacji RNA na czułość wykrywania wirusa Y ziemniaka za pomocą RT-PCR. [W:] Nasiennictwo i ochrona ziemniaka. Konf. nauk.-szkol. Dźwirzyno, 15 16.05. IHAR ZNiOZ Bonin: 63-64. Poster.
2. Treder K., Zacharzewska B. 2014. Optymalizacja wykrywania wirusów ziemniaka za pomocą RT-PCR. [W:] Nasiennictwo i ochrona ziemniaka. Konf. nauk.-szkol. Dźwirzyno, 15 16.05. IHAR ZNiOZ Bonin: 36-37. Referat.
3. Przewodowska A., Zacharzewska B., Treder K. 2014. Izotermiczna technika LAMP w diagnostyce wirusów ziemniaka. [W:] Nasiennictwo i ochrona ziemniaka. Konf. nauk.-szkol. Dźwirzyno, 15 16.05. IHAR ZNiOZ Bonin: 22-23. Referat.
4. Chołuj J., Zacharzewska B., Treder K. 2015. Adaptacja izotermicznego testu RT-LAMP do oceny porażenia bulw wirusem Y ziemniaka. [W:] XII Ogólnopolska Konferencja Naukowa, Nauka dla Hodowli i nasiennictwa roślin uprawnych. Streszczenia referatów i posterów. Zakopane, 2-6.02. IHAR-PIB: 171-173. Poster.
5. Zacharzewska B., Chołuj J., Treder K. Opracowanie izotermicznego testu RT LAMP do wykrywania wirusów ziemniaka. [W:] XII Ogólnopolska Konferencja Naukowa, Nauka dla Hodowli i nasiennictwa roślin uprawnych. Streszczenia referatów i posterów. Zakopane, 2-6.02. IHAR-PIB: 217-218. Poster.
6. Treder K., Zacharzewska B., Chołuj J. 2015. Zastosowanie izotermicznej amplifikacji kwasów nukleinowych w diagnostyce wirusa Y ziemniaka. [W:] XII Ogólnopolska Konferencja Naukowa, Nauka dla Hodowli i nasiennictwa roślin uprawnych. Streszczenia referatów i posterów. Zakopane, 2-6.02. IHAR-PIB: 65-68. Referat.
7. Treder K., Zacharzewska B., Chołuj J. 2015. Wykrywanie wirusa Y ziemniaka za pomocą izotermicznej amplifikacji kwasów nukleinowych. [W:] Nasiennictwo i ochrona ziemniaka. Konf. nauk.-szkol. Dźwirzyno, 13-15.05. IHAR ZNiOZ Bonin: 50-51. Referat.
8. Treder K., Chołuj J., Pawłowska A., Dybner M., 2016. Wykrywanie wirusa Y w bulwach i kielkach ziemniaka. [W:] Nasiennictwo i ochrona ziemniaka. Konf. nauk.-szkol. Dźwirzyno, 11-13.05. IHAR ZNiOZ Bonin: 45-46. Referat.
9. Chołuj J., Zacharzewska B., Treder K. 2016. Izotermiczna amplifikacja kwasów nukleinowych, jako szybki test wykrywania wirusów ziemniaka na przykładzie wirusa PVY. [W:] Nasiennictwo i ochrona ziemniaka. Konf. nauk.-szkol. Dźwirzyno, 11-13.05. IHAR ZNiOZ Bonin: 46-47. Referat.
10. Zacharzewska B., Treder K. 2016. Opracowanie testu RT-PCR do wykrywania wirusa M ziemniaka [W:] Nasiennictwo i ochrona ziemniaka. Konf. nauk.-szkol. Dźwirzyno, 11-13.05. IHAR ZNiOZ Bonin: 71-72. Poster.
11. Treder K., Chołuj J., Zacharzewska B., Mielczarek M. 2017. New sensitive assay for the detection of potato leafroll virus by conventional and real-time reverse transcription polymerase chain reaction. (W:) EAPR 20th Triennial Conference, Versailles, 9-10 July. Potato facing global challenges. Keynote lectures and abstracts, P052, p. 227. Poster.
12. Treder K., Chołuj J., Zacharzewska B., Rakotondrafara A., Babujee L. 2017. Sensitive detection of potato virus Y and differentiation of O and N types by reverse transcription loop-mediated isothermal amplification. (W:) EAPR 20th Triennial Conference, Versailles, 9-10 July. Potato facing global challenges. Keynote lectures and abstracts, P052, p. 223. Poster.
13. Treder K., Mielczarek M., Zacharzewska B. 2018. Detection of potato viruses by reverse transcription loop-mediated isothermal amplification. Plant Biology Europe, June 18-21, Copenhagen, Denmark. Abstr. No. 413. Wyniki z lat 2016 (str. 13-15) i 2017 (str. 1-14). Poster.
14. Treder K., Zacharzewska B., Mielczarek M., Chołuj J. 2018. Development of multiplex RT-PCR and real-time RT-PCR assays to detect three potato viruses. Plant Biology Europe, June 18-21, Copenhagen, Denmark. Abstr. No.: 412. Wyniki z lat 2016 (str. 11-13) i 2017 (str. 9-11). Poster.
15. Treder K., Pawłowska A., Kaczmarek A., Mielczarek M. 2019. Ion exchange membrane chromatography and gel filtration as tools to investigate plant RNA viruses. RNA 2019. The 24th Annual Meeting of the RNA Society. June 11 - 16, 2019 ICE Kraków Congress Centre, Kraków, Poland. PROGRAM & ABSTRACTS, Poster 864.
16. Mielczarek M., Pawłowska A., Kaczmarek A., Treder K. 2019. Colorimetric detection of potato virus Y by Loop-mediated isothermal amplification of nucleic acids (LAMP) as an example of a development point-of-care test for potato viruses. Eurobiotech 2019, Kraków, Poland, 23-25 September 2019. Book of abstracts: Poster P5.3, p. 25.
17. Pawłowska A., Mielczarek M. 2019. Detection of the crucial potato viruses in different potato tissues by immunological and molecular methods. Eurobiotech 2019, Kraków, Poland, 23-25 September 2019. Book of abstracts: Poster P5.4, p. 25.

Publikacje

1. Zacharzewska B., Przewodowska A., Treder K. 2014. The adaptation of silica capture RT-PCR for the detection of Potato Virus Y. Am. J. Potato Res., 91: 525–531. Publikacja oryginalna. **MEiN: 70 pkt. IF: 1,085.**
2. Przewodowska A., Zacharzewska B., Chołuj J., Treder K. 2015. A one-step, real-time reverse transcription loop-mediated isothermal amplification assay to detect Potato virus Y. American Journal of Potato Research, 92: 303-311. Publikacja oryginalna. **MEiN: 70 pkt. IF: 1,085.**
3. Treder K. Metody wykrywania obecności wirusów ziemniaka. 2015. Ziemniak Polski, 4: 18-23. Publikacja przeglądowa. **MEiN: 5 pkt.**
4. Treder K., Zacharzewska B. 2017. Opracowanie nowych starterów do wykrywania wirusa M ziemniaka (Potato virus M, PVM) za pomocą testu RT-PCR. Ziemniak Polski, 3: 32-35. Publikacja oryginalna. **MEiN: 5 pkt.**
5. Treder K., Chołuj J., Zacharzewska B., Mielczarek M. 2017. Detection of potato virus Y (PVY) by reverse-transcription loop-mediated nucleic acid amplification (RT-LAMP). Plant Breeding and Seed Science, 75: 77-85. Publikacja oryginalna. **MEiN: 20 pkt.**
6. 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. Publikacja oryginalna. **MEiN: 70 pkt. IF: 2,176.**