
AUTOREFERAT

PRZEDSTAWIAJĄCY OPIS DOROBKU I OSIĄGNIĘĆ NAUKOWYCH

dr Krzysztof Treder

Pracownia Diagnostyki Molekularnej
i Biochemii, Oddział w Boninie
Instytut Hodowli i Aklimatyzacji Roślin
- Państwowy Instytut Badawczy w Radzikowie
Bonin 3, 76-009 Bonin
Tel.: 094 342 30 31 w. 207
e-mail: k.treder@ihar.edu.pl

Bonin, 2018

1. Imię i Nazwisko: Krzysztof Treder

2. Posiadane dyplomy i stopnie naukowe:

05.07.1995. Uniwersytet Mikołaja Kopernika w Toruniu, Wydział Biologii i Nauk o Ziemi, Zakład Biochemii.

Tytuł magistra biologii ze specjalizacją w biologii molekularnej.

Praca magisterska pod opieką dr Antoniego Leźnickiego (promotor: prof. dr hab. Jadwiga Gniot-Szulżycka) pt.: „*Badania nad heterogennością molekularną arylosulfataz B z narządów szczura*”.

12.07.2002. Instytut Hodowli i Aklimatyzacji Roślin, Radzików

Stopień naukowy doktora nauk rolniczych w zakresie agronomii.

Praca doktorska pod kierunkiem promotora dr hab. Jerzego Lewosza, pt.: „*Wpływ proteolitycznej modyfikacji cząstek wirusa liściozwoju ziemniaka w roślinie na jego własności i wykrywalność*”. Recenzenci: prof. dr hab. Danuta M. Hulanicka, prof. dr hab. Henryk Pospieszny.

3. Informacje o dotychczasowym zatrudnieniu w jednostkach naukowych:

01.01.2008 – obecnie	Kierownik Pracowni Diagnostyki Molekularnej i Biochemii (PDMiB), Oddział w Boninie, Instytut Hodowli i Aklimatyzacji Roślin – Państwowy Instytut Badawczy (IHAR-PIB).
01.11.2002 – obecnie	Adiunkt w PDMiB, Oddział w Boninie, IHAR-PIB.
01.10.1998 – 31.10.2002	Asystent w PDMiB, Oddział w Boninie, IHAR-PIB.
29.10.1996 – 30.09.1998	Technolog w PDMiB, Oddział w Boninie, IHAR-PIB.
01.02.1996 – 28.10.1996	Asystent w Zakładzie Mikrobiologii, Wydział Biologii i Nauk o Ziemi, Uniwersytet Mikołaja Kopernika w Toruniu.
01.09.1995 – 31.01.1996	Stażysta w Zakładzie Diagnostyki Molekularnej i Biochemii, Instytut Ziemniaka (obecnie PDMiB, Oddział w Boninie, IHAR-PIB)

4. Wskazanie przedstawionego do oceny osiągnięcia naukowego, wynikającego z art. 16 ust. 2 ustawy z dnia 14 marca 2003r. o stopniach naukowych i tytule naukowym oraz o stopniach i tytule w zakresie sztuki (Dz. U. 2016 r. poz. 882 ze zm. w Dz. U. z 2016 r. poz. 1311.):

a) Tytuł osiągnięcia naukowego:

Osiągnięcie naukowe stanowi jednotematyczny cykl czterech publikacji pod tytułem:

„Diagnostyka molekularna wirusa Y ziemniaka z jednoczesnym różnicowaniem na genotypy odpowiadające serotypom O i N wirusa”

b) Publikacje wchodzące w skład osiągnięcia naukowego:

- H1.** 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. **IF₂₀₁₄**=1,204; **MNiSW₂₀₁₄** = 25 pkt. *Udział własny 75%*.
- H2.** 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. *Am. J. Potato. Res.*, 92: 303-311. **IF₂₀₁₅** = 1,159; **MNiSW₂₀₁₅** = 25 pkt. *Udział własny 70%*.
- H3.** **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. **MNiSW₂₀₁₆** = 11. *Udział własny 85%*.
- H4.** **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. *Archives of Virology*, 163: 447-458. **IF₂₀₁₇** = 2,160; **MNiSW₂₀₁₅** = 20 pkt. *Udział własny 55%*.

Sumaryczny Impact Factor publikacji wchodzących w skład osiągnięcia naukowego wg listy Journal Citation Reports (JCR), zgodnie z rokiem opublikowania dla publikacji H1 i H2 oraz z roku 2017 dla publikacji H4 (z uwagi na brak danych za rok 2018) wynosi **4,523**. Publikacja H3 nie znajduje się na liście JCR, w związku z czym nie posiada wartości IF. Suma punktów za publikacje wchodzące w skład osiągnięcia naukowego, według wykazu czasopism naukowych zgodnie z rokiem opublikowania dla publikacji H1 i H2 oraz z roku 2016 dla publikacji H3 i 2015 dla publikacji H4 (z uwagi na brak danych z lat późniejszych) wynosi **81 pkt.**

Wkład wnioskodawcy w wyżej wymienione prace opisano w **Załączniku 4**. Oświadczenia współautorów, określające wkład każdego z nich w powstanie publikacji, są zamieszczone w **Załączniku 6**. Kopie prac naukowych stanowiących osiągnięcie naukowe dołączono w **Załączniku 5**.

c) Omówienie celu naukowego ww. prac i osiągniętych wyników wraz z omówieniem ich ewentualnego wykorzystania.

Wstęp

Ziemniak jest jedną z czterech, obok kukurydzy, ryżu i pszenicy, najważniejszych roślin rolniczych na świecie (Devaux i in. 2014). Jego znaczenie stale rośnie, szczególnie w Azji i w Afryce, gdzie w ostatniej dekadzie dwukrotnie zwiększyła się powierzchnia uprawy, a pierwsze dwa miejsca wśród największych producentów zajęły Chiny i Indie (FAO 2017). Wzrost popularności ziemniaka w wielu rejonach świata wiąże się z jego najwyższą wśród wszystkich roślin wartością energetyczną w stosunku do powierzchni uprawy oraz wysoką wartością odżywczą. Z uwagi na te walory Organizacja Narodów Zjednoczonych do spraw Wyżywienia i Rolnictwa uznała ziemniak za roślinę strategiczną, pozwalającą na realizację dwóch (I i VII) Milenijnych Celów Rozwoju. Celem I jest wyeliminowanie skrajnego ubóstwa i głodu, a celem VII – stosowanie zrównoważonych metod gospodarowania zasobami naturalnymi (FAO 2009, Devaux i in. 2014).

Polska jest jednym z największych producentów ziemniaków w Europie i zajmuje siódme miejsce w świecie (FAOSTAT 2017). Jest też ważnym eksporterem przetworów ziemniaczanych. Ziemniak jest uprawą rozmnażaną w sposób wegetatywny. Produkcja nasienna, mająca kluczowe znaczenie w produkcji ziemniaka, w Polsce pokrywa mniej niż 10% krajowego zapotrzebowania na sadzeniaki. Duży wpływ na jakość sadzeniaków, a co za tym idzie – opłacalność ich produkcji, ma porażenie wirusami ziemniaka, wśród których najważniejsze są: wirus Y ziemniaka (PVY; Potato virus Y), wirus M ziemniaka (PVM; Potato virus M) i wirus liściozwoju ziemniaka (PLRV; Potato leafroll virus). Mniejsze znaczenie w kontekście ekonomicznym mają wirusy: S ziemniaka (PVS; Potato virus S), X ziemniaka (PVX; Potato virus X) oraz A ziemniaka (PVA; Potato virus A). Produkcja nasienna podlega szczegółowym regulacjom prawnym, a przedsiębiorstwa nasienne są urzędowo kontrolowane przez Państwową Inspekcję Ochrony Roślin i Nasiennictwa (PIORiN). Od lat elementem obowiązkowego schematu kontroli są badania laboratoryjne sadzeniaków na obecność PVY, PVM i PLRV. Od roku 2015 do listy obowiązkowo badanych wirusów dołączono PVS, PVX i PVA.

Zdrowotność sadzeniaków jest oceniana przez laboratoria Wojewódzkich Inspektoratów Ochrony Roślin i Nasiennictwa (WIORiN). Badania wykonywane są za pomocą tzw. próby oczkowej, która stanowi połączenie testu biologicznego z immunologicznym. Próba oczkowa polega na wycięciu fragmentów bulw z pojedynczymi oczkami, chemicznym przerwaniu ich spoczynku, podkiełkowaniu w 21°C w ciemności, a następnie wysadzeniu w

szklarni i wykonaniu testu DAS-ELISA (ang. double-antibody sandwich enzyme-linked immunosorbent assay) wg Clark i Adams (1977) z użyciem soku z próbek liści pobranych z 4-6 tyg. roślin. Każdy z wirusów diagnozuje się za pomocą specyficznego zestawu przeciwciał. Wykrywanie wirusów metodą ELISA prowadzone jest metodą pośrednią z roślin, a nie bezpośrednią z bulw, ze względu na znaczący wzrost koncentracji cząstek wirusa w roślinach, co zwiększa szansę na wykrycie testem ELISA wirusów o bardzo niskiej koncentracji w bulwach.

Opisana procedura identyfikacji wirusa w bulwach ziemniaka jest dobrze opracowana, czuła, wiarygodna i skuteczna. Jest jednak kosztowna i czasochłonna. Wynik uzyskuje się po upływie kilku tygodni, a nawet kilku miesięcy od przesłania bulw do analizy. Rocznie laboratoria WIORiN oceniają w Polsce ok. 2500 prób sadzeniaków, przy czym należy zaznaczyć, że jedna próba to 100 lub 200 bulw, zależnie od klasy sadzeniaka. Oznacza to, że liczba ocenianych bulw mieści się w przedziale od 250 000 do 500 000 sztuk rocznie. Pochodzące z oczek rośliny do badań uprawia się w sezonie jesienno-zimowym, po zbiorze ziemniaków, w szklarniach, które muszą być ogrzewane do odpowiedniej temperatury oraz odpowiednio doświetlane, co podnosi koszty oceny.

Dlatego też od ponad 30 lat trwają próby opracowania metody pozwalającej na wykrywanie wirusów bezpośrednio w ekstraktach z bulw. Podejmowano nieskuteczne próby dostosowania testu DAS-ELISA do tego celu, ponieważ nie był on wystarczająco czuły i generował wyniki fałszywie pozytywne (Hill i Jackson 1984). Głównymi przyczynami kłopotów z wykrywaniem wirusów w ekstraktach z bulw za pomocą DAS-ELISA były: niższa niż w innych organach koncentracja wirusa, nierównomierne rozmieszczenie cząstek wirusa zarówno w obrębie bulwy jak i w różnych bulwach pochodzących z tej samej rośliny, wysoka częstość występowania reakcji niespecyficzych w obrębie prób z roślin zdrowych oraz występowanie enzymatycznych i nieenzymatycznych reakcji redox powodujących ciemnienie soku (Hill i Jackson 1984; Tamada i Harrison 1980; Treder i in. 2009b). W latach 80. ubiegłego wieku podejmowano próby wykorzystania do diagnostyki wirusów metod molekularnych, pozwalających na wykrycie i analizę kwasów nukleinowych, z których zbudowane są genomy wirusów. Większość wirusów roślinnych posiada genomy zbudowane z kwasu rybonukleinowego (RNA). Początkowo stosowano metody oparte na hybrydyzacji kwasów nukleinowych. Opracowana na początku lat 80. XX wieku metoda łańcuchowej reakcji polimerazy (ang. Polymerase Chain Reaction, PCR) zrewolucjonizowała nauki biologiczne i przemysł biotechnologiczny, włącznie z diagnostyką patogenów roślinnych. Można za jej pomocą namnażać specyficzne fragmenty DNA. W połączeniu z reakcją odwrotnej transkrypcji

RNA do cDNA (ang. reverse transcription, RT), jako test RT-PCR, pozwala na czułą i specyficzną detekcję wirusów w tkankach ziemniaka. Już na początku lat 90. XX wieku wykazano, że w przeciwieństwie do DAS-ELISA, RT-PCR umożliwia wykrywanie PVY (Barker i in. 1993) i PLRV (Spiegel, Martin 1993) w bulwach w stanie spoczynku. W ciągu ostatnich 20 lat opracowano wiele procedur wykrywania najważniejszych wirusów ziemniaka w liściach i bulwach (np.: Singh 1999ab, Crosslin i Hamlin 2011, Hühnlein i in. 2013, **H1**). Test RT-PCR w czasie rzeczywistym (real-time RT-PCR, RT-qPCR) pozwala na wykrywanie wirusów z większą czułością oraz umożliwia ilościową analizę wirusa w badanej próbce (Mumford i in. 2006, Boonham i in. 2008). W metodzie tej fluorescencja kompleksu barwników z namnażanym cDNA lub fluorescencja specyficznej sondy molekularnej mierzona jest podczas trwania reakcji PCR. Z uwagi na łatwą adaptację do automatyzacji, wysoką specyficzność i czułość, bezpośrednią detekcję oraz możliwość multipleksowego wykrywania RT-PCR w czasie rzeczywistym wydaje się idealnym następcą DAS ELISA w diagnostyce wirusów ziemniaka. Jednak ze względu na wysokie koszty wdrożenia, stosowanie tej metody w testach na dużą skalę jest ciągle nieopłacalne.

Wykrywanie wirusów ziemniaka w bulwach wymaga szczegółowej optymalizacji wszystkich etapów testu. Istotne są takie parametry, jak: miejsce pobrania prób (Treder i in. 2009), skład buforu ekstrakcyjnego oraz dobór metody izolacji RNA (**H1**). Dla odmian ziemniaka o wyższej zawartości polifenoli konieczne jest też optymalizowanie składników reakcji RT oraz PCR (Singh 1999b). Metody RT-PCR nie znalazły dotychczas zastosowania w diagnostyce na dużą skalę. Próby praktycznej aplikacji RT-PCR w czasie rzeczywistym i RT-PCR wykazały, że czułość wykrywania PVY w bulwach ziemniaka była niższa niż diagnostyka bazująca na próbce oczkowej (Barker i in. 1993, Fox i in. 2005, Bolotova i in. 2009). Duża rozbieżność czułości testów w publikacjach prezentujących badania laboratoryjne i polowe wynika m.in. z różnic w stosowanych metodach izolacji RNA z bulw, jakości tego RNA (Boonham i in. 2008) i braku standardowych metod przygotowania preparatów RNA z bulw w testach na dużą skalę.

Pomimo niewątpliwych zalet, wadą testów opartych na reakcji PCR jest relatywnie wysoki koszt aparatury, szczególnie dla wariantów umożliwiających śledzenie reakcji w czasie rzeczywistym. Sam RT-PCR jest również droższy od testu PCR, z uwagi na koszt izolacji RNA oraz odwrotnej transkryptazy – enzymu „przepisującego” RNA na jednoniciowe cDNA. Opracowanie, standaryzacja i wdrożenie testu wiążą się z ponoszeniem wysokich kosztów. Dlatego w ciągu ostatniej dekady poszukiwano alternatywnych metod amplifikacji kwasów nukleinowych, niewymagających cyklicznych zmian temperatury. Opracowano szereg metod

amplifikacji DNA i RNA zachodzących w warunkach izotermicznych. Metody izotermiczne nie wymagają stosowania kosztownej aparatury do przeprowadzenia reakcji. Charakteryzują się wyższym tempem i większą wydajnością amplifikacji kwasów nukleinowych niż technika PCR, umożliwiając wykonanie testu w ciągu 15-60 minut przy zachowaniu lub nawet przekroczeniu czułości testu PCR.

Pośród wielu metod izotermicznych najbardziej obiecująca wydaje się amplifikacja kwasów nukleinowych za pośrednictwem pętli (ang.: Loop-mediated isothermal amplification – LAMP) (Notomi i in. 2015). W metodzie tej stosuje się cztery lub sześć starterów wiążących się specyficznymi (hybrydującymi) do 6-8 regionów DNA. Startery można podzielić na wewnętrzne, zewnętrzne i zapętlające. Do wewnętrznych zaliczamy FIP (ang. Forward Inner Primer) oraz BIP (ang. Backward Inner Primer). Startery wewnętrzne zbudowane są z dwóch segmentów: 5'-końcowego (F1c w FIP, B1c w BIP) oraz 3'-końcowego (F2 w FIP, B2 w BIP). Segment 3'-końcowy hybryduje do komplementarnej sekwencji w matrycowym DNA (F2c, B2c) podczas gdy segment 5'-końcowy jest komplementarny do regionu leżącego bezpośrednio za sekwencją 3'-końcowego segmentu startera w nowo tworzonej nici (F1, B1). Dzięki temu powstający pierwotny produkt reakcji tworzy jednoniciowe pętle na obu końcach. Startery zewnętrzne F3 (ang.: Forward) i B3 (ang.: Backward) są komplementarne do regionów DNA okalających fragment amplifikowany przez startery wewnętrzne. Startery te są krótsze, a ich koncentracja w reakcji jest niższa po to, by wolniej od FIP i BIP hybrydowały do matrycy. Ich rola polega na inicjowaniu zastępowania jednej z nici w dwuniciowym (dupleksie) DNA przez nić potomną. Dzięki temu powstające w trakcie polimeryzacji nici DNA są uwalniane z dupleksu i mogą stanowić matryce dla kolejnych nici potomnych. Omówione pary starterów są w stanie samodzielnie promować amplifikację docelowego regionu DNA w reakcji LAMP przez odpowiednie polimerazy. W celu zwiększenia szybkości i czułości reakcji można dodatkowo stosować komplementarne dla regionów pętli startery zapętlające LoopF i LoopR. LAMP wykonywany jest w 60-65°C, a startery projektowane są dla regionów DNA, które w tej temperaturze oscylują pomiędzy stanem dwuniciowym i jednoniciowym. Umożliwia to przyłączenie starterów do nici docelowych bez etapu denaturacji termicznej dwuniciowego DNA. Powstawanie nici potomnych katalizuje DNA zależna polimeraza posiadająca zdolność do wymiany w duplesie DNA nici komplementarnej na nowo syntetyzowaną (ang. strand displacement activity). Enzym rozpoczyna proces wydłużania przez dołączenie nukleotydu do 3-końcowej grupy hydroksylowej startera, a następnie dodaje kolejne nukleotydy wydłużając w ten sposób (polimeryzując) nić potomną. Każdy wprowadzany nukleotyd jest komplementarny do nukleotydu w matrycowej nici DNA. Metoda LAMP pozwala na szybką i niezwykle wydajną amplifikację DNA. Reakcja w optymalnych warunkach zachodzi w ciągu

5-30 minut. W pierwszej fazie reakcji powstaje produkt podstawowy LAMP zakończony z obu stron pętłami. Następnie tworzą się coraz dłuższe fragmenty dwuniciowego DNA zbudowane ze wzrastającej liczby powtórzeń produktu podstawowego. Podobnie jak w przypadku PCR, produkt amplifikacji LAMP można wykrywać za pomocą elektroforezy w żelu agarozowym i barwienia żelu za pomocą roztworu z barwnikiem, który silnie fluoryzuje po związaniu z DNA. Z uwagi na mechanizm LAMP, w wybarwionym żelu widoczna jest drabinka prążków utworzonych przez różniące się wielkością powtórzenia produktu podstawowego. Ponieważ namnożone DNA w trakcie nakładania na żel często zanieczyszcza laboratoria, zalecane są metody wykrywania, w których nie trzeba otwierać próbek reakcyjnych. Koncentracja DNA produkowanego podczas reakcji LAMP jest tak duża, że pochodzący z wbudowywanych do potomnej nici nukleotydów pirofosforan wraz z magnezem tworzy nierozpuszczalną sól. Jest ona widoczna gołym okiem jako zmętnienie w próbach pozytywnych (Mori i in. 2001). Wraz ze wzrostem koncentracji produktu amplifikacji w czasie reakcji obniża się stężenie magnezu w roztworze, co wykorzystano do opracowania fluorescencyjnego testu LAMP, w którym do reakcji dodaje się fluorescencyjny barwnik – kalceinę oraz jony manganu, które wygaszają fluorescencję kalceiny. Mangan, podobnie jak magnez, tworzy w trakcie reakcji nierozpuszczalną sól z pirofosforanem. Dzięki temu w trakcie reakcji następuje wzrost poziomu fluorescencji kalceiny (Tomita i in. 2008), który można monitorować w czasie rzeczywistym. Mniej kosztowny wariant testu polega na wizualnej obserwacji zielonej fluorescencji kalceiny w próbach pozytywnych, wzbudzonej światłem niebieskim po zakończeniu reakcji LAMP. W świetle widzialnym próby pozytywne wykazują również zielone zabarwienie, ale różnica w kolorze prób negatywnych i pozytywnych nie jest jednoznaczna. Inny popularny sposób detekcji polega na dodaniu do prób błękitu hydroksynaftolowego (HNB), który wraz ze spadkiem stężenia jonów magnezu zmienia kolor z fioletowego lub ciemnoniebieskiego na jasnoniebieski (Goto i in. 2009). Do wizualnego wykrywania produktów LAMP stosowano również zieleń malachitową (Lucchi i in. 2016), fiolet krystaliczny (Miyamoto i in. 2015), czy barwniki będące wskaźnikami pH (Tanner i in. 2015). Ta szeroka paleta metod umożliwiających wizualną detekcję produktów amplifikacji sprawia, że LAMP nadaje się do opracowania szybkich testów polowych do identyfikacji patogenów bezpośrednio w terenie. W celu zwiększenia czułości metody oraz umożliwienia wykonania analiz ilościowych, opracowano wiele wariantów LAMP, w których wykorzystuje się urządzenia pozwalające na pomiar zmętnienia i zmiany barwy/fluorescencji prób, zarówno po zakończeniu reakcji jak i w czasie rzeczywistym. Analiza ilościowa pozwala nie tylko na stwierdzenie obecności docelowej sekwencji DNA czy RNA, lecz także na oznaczenie ich koncentracji w badanej próbce. Obecnie dominują fluorescencyjne warianty LAMP, w których wykorzystuje się zarówno kalceinę jak i

barwniki fluorescencyjne stosowane w reakcji PCR czasu rzeczywistego (SybrGreen, EvaGreen czy fluorofory z rodziny Syto), a detekcja zachodzi w czasie rzeczywistym z wykorzystaniem termocyklera z detektorem fluorescencji (Oscorbin i in. 2016). Z uwagi na całkowicie inną niż w PCR zasadę amplifikacji DNA, nie można w reakcji LAMP stosować sond fluorescencyjnych opracowanych dla PCR czasu rzeczywistego. Dlatego w ostatnich latach opracowano sondy fluorescencyjne do LAMP działające poprzez wbudowanie znakowanego fluorescencyjnie oligonuklotydu bezpośrednio w produkt LAMP. Zastosowanie takich sond molekularnych pozwala na wykrywanie produktu LAMP w czasie rzeczywistym i jego analizę ilościową (Kubota i in. 2011, Tanner i in. 2012, Gadkar i in. 2018).

Cel badań

Celem badań było opracowanie molekularnej metody diagnostycznej do identyfikacji patogenów wirusowych ziemniaka, która znajdzie szerokie zastosowanie w testach na dużą skalę. Organizmem modelowym w podjętych badaniach był najważniejszy patogen wirusowy ziemniaka, jakim jest obecnie wirus Y (PVY). Diagnostyka immunologiczna i molekularna PVY jest znacznie trudniejsza w porównaniu do innych wirusów. PVY jest typowym „quasi-gatunkiem”. Charakteryzuje się szybkim tempem ewolucji, wynikającym z wysokiej częstotliwości mutacji punktowych oraz częstych zdarzeń rekombinacji pomiędzy genomami różnych szczepów (Glais i in. 2002, Nie i Singh 2003ab, Lorenzen i in. 2006ab, Schubert i in. 2007, Ogawa i in. 2008, Hu i in. 2009a, Karasev i in. 2011, Cuevas i in. 2012, Visser i in. 2012). Obecnie znanych jest co najmniej dziewięć szczepów, w tym „starych” szczepów nerekombinacyjnych (PVY^C, PVY^O, PVY^N) oraz nowych szczepów rekombinacyjnych (PVY^E, PVY^Z, PVY^{NTN}, PVY^{N:O}, PVY^{N-Wi}, PVY^{NA-N} i PVY-NE11), różniących się biologicznie, serologicznie i molekularnie (Karasev i Gray 2013). W badaniach zmian w strukturze populacji wirusa Y w Polsce stwierdzono zmianę frekwencji występowania szczepów. W latach 80 tych XX w. szczep PVY^O stanowił 90% populacji, co przez sześć kolejnych lat uległo zmianie, szczep PVY^{N-Wi} był wykrywany w 90% przypadków. Szczep PVY^{NTN} wykryto po raz pierwszy w Polsce w 1994 r, a frekwencja jego występowania systematycznie rosła (Zimnoch-Guzowska i in. 2013). Obecnie największy udział w populacji mają dwa szczepy wirusa Y – NTN i N-Wi (Yin i in. 2012). Izolaty PVY^{N-Wi}, mogą wywoływać łagodne, trudne do wykrycia objawy na popularnych odmianach ziemniaków lub występują bezobjawowo. Natomiast izolaty wirusa z grupy PVY^{NTN} często powodują występowanie nekroz na bulwach, przyczyniając się do dyskwalifikacji plonu. Na podatnych odmianach ziemniaka nekrozy i zniekształcenia bulw mogą wywoływać w odpowiednich warunkach również inne szczepy PVY. Większość szczepów PVY indukujących nekrozy bulw jest

rozpoznawana przez przeciwciała monoklonalne specyficznym reagujące z białkiem płaszcza PVY^N. Szczepy, które nie wywołują lub wywołują rzadko objawy na bulwach są rozpoznawane przez przeciwciała monoklonalne specyficzne dla PVY^O. Dlatego w diagnostyce wirusa ważne jest nie tylko jego wykrycie, ale również określenie jego serotypu.

Omówienie wyników

W ramach prezentowanego osiągnięcia naukowego podjęto badania zmierzające do opracowania skutecznej i niekosztownej metody izolacji RNA z bulw ziemniaka na krzemionce (**H1**) i jej uproszczeniem poprzez zastosowanie cząstek magnetycznych w miejsce krzemionki (**H4**), opracowaniem i walidacją starterów do identyfikacji PVY za pomocą testu RT-PCR (**H1**), adaptacją izotermicznego testu RT-LAMP do wykrywania PVY (**H2**), opracowaniem powtarzalnej i łatwej do wykonania procedury identyfikacji PVY za pomocą RT-LAMP (**H3**) oraz opracowaniem czułego wariantu testu RT-LAMP do jednoczesnego wykrywania i różnicowania genotypów PVY odpowiadających serotypom O i N wirusa (**H4**). Omawiane badania wykonano w ramach programu Postęp Biologiczny w Produkcji Roślinnej, finansowanego przez Ministerstwo Rolnictwa i Rozwoju Wsi w latach 2008-2013 oraz 2014-2020.

Wiarygodne wykrywanie wirusów w tkankach ziemniaka metodami molekularnymi wymaga pozyskania preparatów RNA wysokiej jakości. Tkanki ziemniaka są bogate w polisacharydy, polifenole oraz enzymy katalizujące reakcje redox. W kontakcie z tlenem w homogenatach z tkanek ziemniaka dochodzi do intensywnego uwalniania wolnych rodników oraz enzymatycznego i nieenzymatycznego utleniania makrocząstek, w tym RNA.

Szczególnie trudnym źródłem RNA są bulwy. Rozmieszczenie wirusa w tkance bulwy nie jest równomierne (Hill i Jackson 1984; Tamada i Harrison 1980). W związku z tym, część stożków wzrostu bulwy (oczek) może być wolna od wirusa. W efekcie próby pobrane z takich oczek zostaną uznane za zdrowe, niezależnie od tego czy badanie wykonane będzie testem ELISA czy RT-PCR. Można ten problem rozwiązać stosując do wykrywania wirusów przystolonowy fragment bulwy, ponieważ jest to miejsce, w którym cząstki wirusa kumulują podczas spływania z części nadziemnej do bulw. Ponadto, w badaniach własnych wykazano, że koncentracja PVY i PLRV w tkance przystolonowej była wyższa niż w innych częściach bulwy niezależnie od tego, czy bulwy badano bezpośrednio po zbiorze, czy po ich kilkumiesięcznym przechowywaniu (Treder i in. 2009b).

Wysoka zawartość skrobi w bulwach sprawia, że uzyskanie preparatów RNA do przeprowadzenia reakcji RT-PCR nie jest łatwe, przy czym zdecydowana większość

komercyjnych zestawów do izolacji RNA nie zapewnia uzyskania preparatów RNA dobrej jakości (Treder, wyniki niepublikowane). Jakościowo dobre preparaty RNA można uzyskać stosując metody manualne, obejmujące złożoną procedurę ekstrakcji i trawienie DNAzą (Singh i in. 2002) lub wykorzystujące odczynniki zawierające sole guanidyny i fenol (Chomczyński i Sacchi 1987), dostępne komercyjnie np. jako Trizol (Invitrogen). Trudno jednak takie metody stosować do testów na dużą skalę. W związku z powyższym podjęto prace nad adaptacją metody wykorzystującej krzemionkę i sole guanidyny do izolacji DNA/RNA z liści ziemniaka (Boom i in. 1990, Malinowski 1997) w procedurze wykrywania PVY (**H1**). Na potrzeby tej pracy zaprojektowano parę starterów, rozpoznającą *in silico* wszystkie genotypy PVY dostępne w banku genów NCBI. Wykazano, że dobór metody izolacji RNA ma istotny wpływ na czułość wykrywania PVY. Metoda izolacji na krzemionce umożliwiła uzyskanie preparatów RNA o lepszym stosunku jakości do kosztu izolacji od uzyskanych za pomocą zestawów komercyjnych. Czułość wykrywania PVY testem RT-PCR z wykorzystaniem preparatów RNA izolowanych na krzemionce (jako matrycy) była wyższa od czułości wykrywania PVY w preparatach izolowanych za pomocą większości przetestowanych zestawów komercyjnych. Jednocześnie nakład pracy i czas izolacji RNA na krzemionce i za pomocą zestawów komercyjnych były porównywalne (**H1**). Za pomocą tej samej metody, dobrej jakości preparaty RNA uzyskano również z bulw ziemniaka (**H4**). Uzyskane preparaty pozwalały na wykrywanie PVY w bulwach testem izotermicznym RT-LAMP oraz testem RT-PCR w czasie rzeczywistym z taką samą czułością w warunkach laboratoryjnych (**H4**). Mechanizm wiązania kwasów nukleinowych do krzemionki w obecności soli guanidyny polega na powstawaniu wiązań wodorowych pomiędzy grupami wodorotlenowymi znajdującymi się na powierzchni krzemionki a zdenaturowanym kwasem nukleinowym. Grupy wodorotlenowe znajdują się również na powierzchni cząstek magnetycznych wytwarzanych przez precypitację soli żelaza. W celu dalszej optymalizacji procedury wykrywania PVY, tego rodzaju cząstki magnetyczne wykorzystano do izolacji RNA z tkanek ziemniaka, zastępując nimi krzemionkę i zachowując układ buforów stosowany w metodzie krzemionkowej. Jednocześnie etapy wirowania zastąpiono zbieraniem cząstek magnetycznych na statywie magnetycznym. Ponadto, w skróconym wariacie izolacji RNA na cząstkach magnetycznych pominięto kilka etapów płukania mikrosfer, zalecanych w oryginalnej procedurze krzemionkowej. Uzyskano taką samą czułość wykrywania PVY w preparatach RNA izolowanych za pomocą omawianych metod. Czas izolacji w skróconej metodzie magnetycznej wynosił ok. 20 minut w porównaniu do 60 minut w metodzie krzemionkowej (**H4**).

Dalsze prace prowadzone w ramach osiągnięcia naukowego skupione były na opracowaniu izotermicznego testu RT-LAMP do czułego wykrywania PVY. Z uwagi na

mniejszą niż PCR wrażliwość na inhibitory amplifikacji (Kaneko i in. 2007), test LAMP jest szczególnie przydatny do wykrywania RNA w tkankach ziemniaka. Polimerazy stosowane w LAMP posiadają zdolność do odwrotnej transkrypcji, więc wykrywanie RNA nie wymaga dodania odwrotnej transkryptazy, jednak obecność tego enzymu w mieszaninie reakcyjnej skraca czas i ma pozytywny wpływ na czułość detekcji. Tego typu test RT-LAMP opracowano dla PSTVd (Lenarčič i in. 2012), wirusa liściozwoju ziemniaka (PLRV) (Almasi i in. 2012) oraz wirusa Y ziemniaka (PVY) (Nie 2005, Almasi i in. 2013, Hasiów-Jaroszewska i in. 2015, **H2-H4**). Test opracowany dla PSTVd posiadał 10-krotnie większą czułość detekcji w porównaniu z testem RT-PCR i pozwalał na wykrycie PSTVd zarówno w liściach jak i w bulwach. Czas wykonania testu wynosił od 15 do 25 minut, zależnie od koncentracji wiroida w próbach (Lenarčič i in. 2012). Almasi i in. (2012) opracowali immunosorbcyjny wariant testu (ang. ImmunoCapture = IC-RT-LAMP), w którym cząstki PLRV były związane na powierzchni probówek pokrytych przeciwciałami specyficznymi wobec wirusa i po odpłukaniu soku w tych samych probówkach wykonywano reakcję LAMP. Autorzy wykazali, że pozytywny wynik reakcji można było monitorować zarówno za pomocą zmętnienia prób jak i poprzez zmianę koloru różnych barwników (Almasi i in. 2012). Wariant RT-LAMP oparty o zmętnienie prób opracowano również dla PVY (Nie 2005). Hasiów-Jaroszewska i in. (2015) opracowali wizualny test RT-LAMP, w którym produkt reakcji wykrywano poprzez dodanie barwnika SybrGreen do prób po zakończeniu amplifikacji. Test, który można było wykonać w łaźni wodnej lub bloku termicznym, umożliwiał detekcję różnych szczepów PVY z czułością wyższą od RT-PCR (Hasiów-Jaroszewska i in. 2015).

W ramach osiągnięcia naukowego opracowano fluorescencyjny test RT-LAMP w czasie rzeczywistym pozwalający na ilościową detekcję PVY w ciągu 60-80 minut (uwzględniając czas izolacji RNA) z czułością 10-krotnie wyższą od RT-PCR i 1000-krotnie wyższą od DAS-ELISA i testów paskowych (**H2**). Efektem kontynuacji badań było opracowanie starterów Y4, które w porównaniu z testem opracowanym w H3 pozwoliły zwiększyć czułość RT-LAMP czasu rzeczywistego o rząd wielkości (z 0,1 do 0,01 pg całkowitego RNA w reakcji). Zaprojektowane startery umożliwiły również różnicowanie izolatów PVY pod względem genotypów białka płaszczka o serotypie N lub O (**H4**). Skuteczność wykrywania i różnicowania PVY za pomocą tych starterów weryfikowano na szeregu izolatów PVY z Europy, jak również, dzięki nawiązaniu współpracy z dr Aurelią Rakotondrafarą (Wisconsin University, Plant Pathology Department, Madison, USA), na izolatach wirusa z Ameryki Północnej. Badane izolaty reprezentowały różne szczepy genetyczne PVY. Kompletna procedura wykrywania PVY przedstawiona w publikacji **H4** obejmowała szybką (20 minut) izolację RNA z tkanek ziemniaka za pomocą nanocząstek magnetycznych oraz test RT-LAMP, pozwalający wykryć

PVY zależnie od jego koncentracji w próbce w ciągu 8-20 minut (**H4**). Wykazano, że test RT-LAMP w badaniach laboratoryjnych ma taką samą czułość jak test RT-PCR w czasie rzeczywistym. W badaniach polowych za pomocą RT-PCR w czasie rzeczywistym wykryto znacznie mniej bulw porażonych PVY niż za pomocą RT-LAMP. Jednocześnie skuteczność RT-LAMP była w tym doświadczeniu porównywalna ze skutecznością prób oczkowych (**H4**). Procedurę wykrywania PVY za pomocą starterów Y4 oraz testu RT-LAMP czasu rzeczywistego dopracowano i opublikowano w postaci szczegółowego protokołu. W tej samej publikacji podano warunki wykrywania PVY za pomocą kolorymetrycznego testu RT-LAMP, z wykorzystaniem zmiany koloru błękitu hydroksynaftolowego, który pozwala na szybką, wizualną detekcję PVY, np. w warunkach polowych (**H3**).

Podsumowanie

Cztery publikacje stanowiące moją rozprawę habilitacyjną obejmują wyniki badań nad diagnostyką molekularną wirusa Y ziemniaka z jednoczesnym różnicowaniem na genotypy odpowiadające serotypom O i N wirusa. Efektem badań są:

- opracowanie skutecznej i niekosztownej metody izolacji RNA z bulw ziemniaka na krzemionce oraz jej uproszczenie i zwiększenie czułości w porównaniu do testów komercyjnych poprzez zastosowanie cząstek magnetycznych w miejsce krzemionki (H1, H4),
- opracowanie i walidacja starterów do wykrywania PVY za pomocą testu RT-PCR (H1),
- adaptacja izotermicznego testu RT-LAMP do wykrywania PVY (H2),
- opracowaniem powtarzalnej i łatwej do wykonania procedury wykrywania PVY za pomocą RT-LAMP (H3),
- opracowaniem testu RT-LAMP o podwyższonej czułości do jednoczesnego wykrywania i różnicowania genotypów PVY odpowiadających serotypom O i N wirusa (H4).

Rezultaty badań przedstawione w tej pracy mają znaczenie poznawcze i praktyczne. Opracowane metody mogą być przydatne do diagnostyki wirusów Y ziemniaka w materiałach nasiennych.

Literatura

1. Almasi M.A., Moradi A., Nasiri J., Karami S., Nasiri M. 2012. Assessment of performance ability of three diagnostic methods for detection of potato leafroll virus (PLRV) using different visualizing systems. *Appl. Biochem. Biotechnol.*, 168: 770-84.
2. Almasi M.A., Dehabadi S.H. 2013. Colorimetric immunocapture reverse transcription Loop-mediated isothermal AmPlication assay for rapid detection of the Potato virus Y. *J. Plant. Pathol. Microbiol.*, 4: 188-193.

3. Barker H., Webster K.D., Reavy B. 1993. Detection of potato virus Y in potato tubers: a comparison of polymerase chain reaction and enzyme-linked immunosorbent assay. *Potato Res.*, 36: 13–20.
4. Bolotova Y. V., Karasev A. V., McIntosh C.S. 2009. Statistical analysis of the laboratory methods used to detect potato virus Y. *Am. J. Pot. Res.* 86: 265-271.
5. Boonham N., Glover R., Tomlinson J., Mumford R. 2008. Exploiting generic platform technologies for the detection and identification of plant pathogens. *Eur. J. Plant Pathol.*, 121: 355-363.
6. Boom R., Sol C.J., Salimans M.M., Jansen C.L., Wertheim-van Dillen P.M., van der Noordaa J. 1990. Rapid and simple method for purification of nucleic acids. *Journal Clinical Microbiology* 28: 495–503.
7. Chomczynski P., Sacchi N. 1987. Single-step method of RNA isolation by acid guanidinium thiocyanate-phenol-chloroform extraction. *Analytical Biochemistry* 162: 156–159.
8. Clark M.F., Adams A.N. 1977. Characteristics of the microplate method of enzyme-linked immunosorbent assay for the detection of plant viruses. *J. Gen. Virol.*, 34: 475-483.
9. Crosslin J., Hamlin L. 2011. Standardized RT-PCR conditions for detection and identification of eleven viruses of potato and potato spindle tuber viroid. *Am. J. Pot. Res.* 88: 333-338.
10. Cuevas J.M., Delaunay A., Visser J.C., Bellstedt D.U., Jacquot E., Elena S.F. 2012. Phylogeography and molecular evolution of Potato virus Y. *PLoS ONE* 7(5): e37853., doi: 10.1371/journal.pone.0037853.
11. Devaux A, Kromann P., Ortiz O. 2014. Potatoes for sustainable global food security. *Potato Res.*, 57:185–199.
12. Flegg C. L., Clark M. F. 1979. The detection of Apple chlorotic leaf spot virus by a modified procedure of enzyme-linked immunosorbent assay. *Ann. Appl. Biol.* 91: 61-65.
13. Fox A., Evans F., Browning I. 2005. Direct tuber testing for potato Y potyvirus by real-time RT-PCR and ELISA: reliable options for post-harvest testing? *Bull. OEPP.*, 35: 93-97.
14. Gadkar V.J., Goldfarb D.M., Gantt S., Tilley P.A.G. 2018. Real-time detection and monitoring of loop mediated amplification (LAMP) reaction using self-quenching and de-quenching fluorogenic probes. *Sci. Rep.*, 3;8(1):5548. doi: 10.1038/s41598-018-23930-1.
15. Glais L., Tribodet M., Kerlan C., Rheu R. 2002. Genomic variability in Potato potyvirus Y (PVY): evidence that PVY(N)W and PVY(NTN) variants are single to multiple recombinants between PVY(O) and PVY(N) isolates. *Arch. Virol.*, 147: 363–378.
16. Goto M., Honda E., Ogura A., Nomoto A., Hanaki K. 2009. Colorimetric detection of loop-mediated isothermal amplification reaction by using hydroxynaphthol blue. *Biotechniques* 46:167-172.
17. Hasiów-Jaroszewska B, Stachecka J, Minicka J, Sowiński M, Borodynko N. 2015. Variability of Potato virus Y in tomato crops in Poland and development of a reverse-transcription loop-mediated isothermal amplification method for virus detection. *Phytopathology*, 105:1270-1276.
18. Hill S.A., Jackson E.A. 1984. An investigation of the reliability of ELISA as a practical test for detecting potato leaf roll virus and potato virus Y in tubers. *Plant Pathology* 33: 21-26.
19. Hu, X., Karasev, A. V., Brown, C. J., and Lorenzen, J. H. 2009a. Sequence characteristics of Potato virus Y recombinants. *J. Gen. Virol.* 90:3033-3041.
20. Hühnlein, A., Drechsler, N., Steinbach, P., Thieme, P., Schubert, J. 2013. Comparison of three methods for the detection of potato virus Y in seed potato certification. *J. Plant Dis. Protect.*, 120: 57-69.
21. Kaneko H., Kawana T., Fukushima E., Suzutani T. 2007. Tolerance of loop-mediated-isothermal amplification to a culture medium and biological substances. *J. Biochem. Biophys. Methods*, 70: 499-501.
22. Karasev A.V., Gray S.M. 2013. Continuous and emerging challenges of Potato virus Y in potato. *Annu. Rev. Phytopathol.*, 51: 571–586.

23. Karasev A.V., Hu X., Brown C.J., Kerlan C., Nikolaeva O.V., Crosslin J., Gray S.M. 2011. Genetic diversity of the ordinary strain of Potato virus Y (PVY) and origin of recombinant PVY strains. *Phytopathology*, 101: 778–785.
24. Kubota R., Alvarez A.M., Su W., Jenkins D.M. 2011. FRET-based assimilating probe for sequence-specific real-time monitoring of loop-mediated isothermal amplification (LAMP). *Biol. Eng. Trans.*, 4: 81–100.
25. Lenarčič R., Morisset D., Mehle N., Ravnikar M. 2012. Fast real-time detection of potato spindle tuber viroid by RT-LAMP. *Plant Pathology* 62: 1147-1156.
26. Lorenzen J.H., Meacham T., Berger P.H., Shiel P.J., Crosslin J.M., Hamm P.B., Kopp K. 2006a. Whole genome characterization of Potato virus Y isolates collected in the western USA and their comparison to isolates from Europe and Canada. *Arch. Virol.*, 151: 1055–1074.
27. Lorenzen J.H., Piche L.M., Gudmestad N.C., Meacham T., Schiel P. 2006b. A multiplex PCR assay to characterize Potato virus Y isolates and identify strain mixtures. *Plant Dis.* 90: 935–940.
28. Lucchi N.W., Ljolje D., Silva-Flannery L., Udhayakumar V. 2016. Use of malachite green-loop mediated isothermal amplification for detection of Plasmodium spp. parasites. *PLoS One*. 2016 Mar 11;11(3):e0151437.
29. Malinowski T. 1997. Silica capture-reverse transcription-polymerase chain reaction (SC-RT-PCR): application for the detection of several plant viruses. *Diagnosis and Identification of Plant Pathogens* 11: 445-448.
30. Miyamoto S., Sano S., Takahashi K., Jikihara T. 2015. Method for colorimetric detection of double-stranded nucleic acid using leuco triphenylmethane dyes. *Anal. Biochem.*, 473: 28-33.
31. Mori Y., Nagamine K., Tomita N., Notomi T. 2001. Detection of loop-mediated isothermal amplification reaction by turbidity derived from magnesium pyrophosphate formation. *BiochemBiophys Res Commun.*, 289: 150-154.
32. Mumford R. A., Boonham N., Tomlinson J., Barker I. 2006. Advances in molecular phytodiagnostics – new solutions for old problems. – *Eur. J. Plant Pathol.*, 116: 1-19.
33. Nie X. 2005. Reverse transcription loop-mediated isothermal amplification of DNA for detection of Potato Virus Y. *Plant Dis.*, 89: 605–610.
34. Nie X, Singh R.P. 2003a. Evolution of North American PVY NTN strain Tu660 from local PVY N by mutation rather than recombination. *Virus Genes* 26:39–47.
35. Nie X, Singh R.P. 2003b. Specific differentiation of recombinant PVYN:O and PVYNTN isolates by multiplex RT-PCR. *J. Virol. Methods*, 113: 69–77.
36. Notomi T., Mori Y., Tomita N., Kanda H. 2015. Loop-mediated isothermal amplification (LAMP): principle, features, and future prospects. *J. Microbiol.*, 53: 1–5.
37. Ogawa T., Tomitaka Y., Nakagawa A., Ohshima K. 2008. Genetic structure of a population of Potato virus Y inducing potato tuber necrotic ring spot disease in Japan; comparison with North American and European populations. *Virus Res.*, 131: 199-212.
38. Ocorbin I.P., Belousova E.A., Zakabunin A.I., Boyarskikh U.A., Filipenko M.L. 2016. Comparison of fluorescent intercalating dyes for quantitative loop-mediated isothermal amplification (qLAMP). *Biotechniques*, 61 :20-25.
39. Schubert J., Fomitcheva V., Sztangret-Wiśniewska J. 2007. Differentiation of Potato virus Y strains using improved sets of diagnostic PCR-primers. *J. Virol. Methods*, 140: 66–74.
40. Singh R. P. 1999a. A solvent-free, rapid and simple virus RNA release method for potato leafroll virus detection in aphids and plants by reverse transcription polymerase chain reaction. *J. Virol. Meth.*, 83: 27-33.
41. Singh R. P. 1999b. Development of the molecular methods for potato virus and viroid detection and prevention. *Genome* 42: 592-604.
42. Singh R.P., Nie X., Singh M., Coffin R., Duplessis P. 2002. Sodium sulphite inhibition of potato and cherry polyphenolics in nucleic acid extraction for virus detection by RT-PCR. *J. Virol. Methods*, 99: 123– 131.

43. Spiegel S., Martin R. R. 1993. Improved detection of potato leafroll virus in dormant potato tubers and microtubers by the polymerase chain reaction and ELISA. *Ann. Appl. Biol.* 122: 493-500.
44. Tanner N.A., Zhang Y., Evans T.C. 2012. Simultaneous multiple target detection in real-time loop-mediated isothermal amplification. *Biotechniques*, 53: 81–89.
45. Tanner N.A., Zhang Y., Evans T.C. 2015. Visual detection of isothermal nucleic acid amplification using pH-sensitive dyes. *Biotechniques*, 58: 59-68.
46. Tamada T., Harrison B.D. 1980. Factors affecting the detection of potato leafroll virus in potato foliage by enzyme-linked immunosorbent assay. *Ann. Appl. Biol.* 95: 209-219.
47. Tamada T., Harrison B.D. 1980. Application of enzyme-linked immunosorbent assay to the detection of potato leaf roll virus in potato tubers. *Ann. Appl. Biol.* 96: 67-78.
48. Treder K., Pilecki T., Łycuś P. 2009a. Wykrywanie wirusów ziemniaczanych bezpośrednio w ekstraktach z bulw – porównanie testu ELISA z immuno-captured RT PCR. *Prog. Plant Prot./Post. Ochr. Roślin*, 49: 740-745.
49. Treder K., Przewodowski W., Barnyk A. 2009b. Factors influencing detection of Potato leafroll virus and Potato virus Y in potato tuber extracts. *Plant Breeding and Seed Science* 59: 65-74.
50. Tomita N., Mori Y., Kanda H., Notomi T. 2008. Loop-mediated isothermal amplification (LAMP) of gene sequences and simple visual detection of products. *Nat. Protoc.*, 3: 877-882.
51. Visser J.C., Bellstedt D.U., Pirie M.D. 2012. The recent recombinant evolution of a major crop pathogen, Potato virus Y. *PLoS ONE*: 7(11): e50631. doi:10.1371/journal.pone.0050631.
52. Van den Heuvel J. F. J. M., Peters D. 1989. Improved detection of potato leafroll virus in plant material and in aphids. *Phytopathology* 79: 963-967.
53. Yin Z., Chrzanowska M., Michalak K., Zagórska H., Zimnoch-Guzowska E. 2012. Recombinations of PVY strains predominate among isolates from potato crop in Poland. *J. Plant Prot. Res.*, 52: 214-219.
54. Zacharzewska B., Treder K. 2014. Test ELISA jego modyfikacje. *Ziemn. Pol.* 1: 14-16.
55. Zimnoch-Guzowska E., Yin Z., Chrzanowska M., Flis B. 2013. Sources and effectiveness of potato PVY resistance in IHAR's breeding research. *Am. J. Potato Res.*, 90: 21-27.

5. Omówienie pozostałych osiągnięć naukowo - badawczych.

W latach 1994-1995 uczestniczyłem, jako magistrant, w badaniach nad arylosulfatazami prowadzonych przez dr Antoniego Leźnickiego w Zakładzie Biochemii, Wydział Biologii i Nauk o Ziemi, UMK w Toruniu. Promotorem mojej pracy magisterskiej była Pani prof. dr hab. Jadwiga Gniot-Szulżycka, jednak bezpośrednim opiekunem był dr Antoni Leźnicki. W ramach pracy magisterskiej opracowałem metodę izolacji sulfatazy arylowej typu B z narządów szczura za pomocą chromatografii jonowymiennej, chromatografii powinowactwa oraz filtracji żelowej. Uzyskane preparaty charakteryzowałem pod względem ich właściwości biochemicznych za pomocą elektroforezy poliakrylamidowej w warunkach redukujących i denaturujących, elektroforezy natywnej, ogniskowania chromatograficznego oraz ogniskowania izoelektrycznego. W literaturze dominował wówczas pogląd, że za heterogenność form molekularnych arylosulfatazy B odpowiada różna zawartość kwasu sjałowego i/lub ufosforylowanych form mannozowych, obecnych w części cukrowej tej glikoproteiny. Wykazałem, że hipoteza ta jest fałszywa, ponieważ traktowanie enzymu glikozydazami usuwającymi wyżej wymienione reszty cukrowe nie miało wpływu na liczbę

izozymów obserwowanych po ogniskowaniu izoelektrycznym. Wyniki opisałem w pracy magisterskiej, którą obroniłem w lipcu 1995 r.

W okresie od 1 września 1995 roku do 31 stycznia 1996 roku pracowałem jako stażysta w kierowanym przez dr hab. Jerzego Lewosza Zakładzie Diagnostyki Molekularnej i Biochemii (ZDMiB) w Boninie, wchodzącym w skład Instytutu Ziemniaka (a od października 1997 do chwili obecnej Oddziału w Boninie Instytutu Hodowli i Aklimatyzacji Roślin - PIB). W tym okresie zapoznałem się ze sposobami infekowania roślin wirusami, procedurami izolacji wirusów ziemniaka z zainfekowanych roślin, metodami oceny czystości preparatów wirusowych i wykorzystaniem uzyskanych preparatów do immunizacji królików w celu wytworzenia przeciwciał specyficznych dla wirusa. Poznałem również metody pobierania krwi, pozyskiwania surowicy, izolacji z niej preparatu przeciwciał (immunoglobulin typu G - IgG), koniugacji przeciwciał z enzymem - alkaliczną fosfatazą, określania miana oraz specyficzności surowicy i przeciwciał. Uzyskane przeze mnie przeciwciała specyficzne wobec wirusa liściozwoju ziemniaka (ang. *Potato leafroll virus*, skrót: PLRV) przesyłane były do wchodzącej w skład ZDMiB Pracowni Serologii w Gdańsku (Instytut Ziemniaka) kierowanej przez prof. dr hab. Zbigniewa Mierzwę, gdzie wytwarzano z nich komercyjne zestawy do wykrywania PLRV za pomocą testu DAS-ELISA. Charakteryzując uzyskane preparaty PLRV za pomocą elektroforezy w warunkach denaturujących oraz techniką western blot stwierdziłem, że w czystych preparatach wirusa, poza spodziewanymi białkami o masach 23 kDa (białko płaszcz) oraz 56 kDa (tzw. białko readtrough), obecne było białko o masie 17 kDa, które silnie reagowało z przeciwciałami specyficznymi wobec PLRV [1]. Wyniki tych badań były referowane na Sympozjum Sekcji Wirusologicznej Polskiego Towarzystwa Fitopatologicznego przez dr hab. Jerzego Lewosza.

KONFERENCJA

1. Lewosz J., Treder K. 1996. Immunoreaktywność białek cząsteczki wirusa liściozwoju ziemniaka. Sympozjum Sekcji wirusologicznej P.T. Fitopatologicznego, Warszawa SGGW, 26-27. 09. 1996.

Od 1 lutego 1996 roku do listopada 1996 roku pracowałem na stanowisku asystenta w kierowanym przez prof. dr hab. Edmunda Strzelczyka Zakładzie Mikrobiologii na Wydziale Biologii i Nauk o Ziemi, UMK w Toruniu. W tym okresie zapoznałem się z metodami izolacji bakterii ze środowiska do czystych kultur, oznaczania koncentracji bakterii w zawiesinach, biologicznymi i analitycznymi metodami oznaczania koncentracji witamin oraz wytwarzanych przez mikroorganizmy symbiotyczne substancji korzystnych dla rozwoju roślin. W związku z zaistniałymi problemami z identyfikacją niektórych badanych gatunków bakterii zaproponowałem, by identyfikację mikrobiologiczną uzupełnić o profile białkowe wykonane za pomocą elektroforezy w żelu poliakrylamidowym. Wstępne badania wykonałem we

współpracy z dr Henrykiem Różyckim. Ich wynik potwierdził przydatność profili białkowych jako dodatkowego kryterium w identyfikacji bakterii. W związku ze zmianą pracy nie brałem udziału w kontynuacji tych badań.

W listopadzie 1996 roku ponownie podjąłem pracę w ZDMiB (Instytut Ziemniaka w Boninie) na stanowisku technologa. W tym okresie kontynuowałem wytwarzanie przeciwciał króliczych do wykrywania PLRV testem DAS-ELISA. Jednocześnie prowadziłem badania, które stały się podstawą mojej pracy doktorskiej i zostaną pokrótce omówione poniżej.

Ważnym zagadnieniem w mojej pracy doktorskiej były badania nad przyczyną pojawiania się w preparatach PLRV dodatkowego białka o masie 17 kDa [1, 2]. Stosując szereg inhibitorów proteaz wykazałem, że białko to może powstawać w wyniku proteolitycznej modyfikacji białek obecnych w płaszczu wirusa przez proteazę roślinną hamowaną przez pepstatynę – inhibitor proteaz asparaginowych. Część tych prac wykonałem w Scottish Crop Research Institute, w laboratorium wirusologicznym kierowanym przez prof. Michaela Mayo. Za pomocą wytworzonych przez niego przeciwciał monoklonalnych specyficznych wobec różnych regionów białka p90 wirusa wykazałem, że dodatkowe białka obecne w preparatach PLRV powstawały w wyniku proteolitycznej modyfikacji białka p90, które jest prekursorem białka p56 (tzw. białko „readthrough”). Białko to stanowi obok głównego białka płaszcza (p23) komponent płaszcza wirusa odpowiedzialny za przenoszenie wirusa przez mszyce. Stosując jako układ modelowy ekstrakt z cząstkami wirusa, proteazę asparaginową - katepsynę D oraz jej inhibitor - pepstatynę wykazałem, że hamowanie działania proteazy zmieniało własności immunologiczne cząstek wirusa, przez co był on słabiej rozpoznawany przez przeciwciała poliklonalne. Stwierdziłem też, że w obecności pepstatyny wydajność izolacji PLRV wzrastała ponad 3-krotnie. Jednak tak uzyskane preparaty nie były przenoszone przez mszyce, co świadczyło o istotnym wpływie proteazy asparaginowej na właściwości biologiczne PLRV [4, 5, 7, 9].

W ramach prac nad usprawnieniem diagnostyki PLRV podjąłem próbę optymalizacji testu koktajl-ELISA do wykrywania PLRV w liściach i adaptacji do wykrywania tego wirusa w bulwach ziemniaka. Stwierdziłem wyższą czułość tej metody, w porównaniu z DAS-ELISA, w wykrywaniu PLRV w ekstraktach z bulw i liści. Czułość testu dodatkowo zwiększało zastosowanie układu odczynników amplifikujących sygnał generowany przez alkaliczną fosfatazę. Skuteczność testu koktajl-ELISA w ocenie porażenia bulw była porównywalna ze skutecznością prób oczkowych [6, 11].

W celu usprawnienia produkcji swoistych przeciwciał, optymalizowałem poszczególne etapy tego procesu włączając w to zarówno sposób pozyskiwania czystego preparatu wirusa

jak i sposób immunizacji królików oraz oczyszczania przeciwciał. Aby usprawnić produkcję antygeny do immunizacji królików za pomocą RT-PCR uzyskałem cDNA genu białka płaszczka wirusa i wprowadziłem je do plazmidu ekspresyjnego, którym następnie transformowałem bakterie *E. coli* [3, 10]. Po selekcji kolonii utrzymujących stabilnie wprowadzony konstrukt, indukowałem ekspresję białka płaszczka PLRV w zawiesinowej hodowli bakterii za pomocą izopropyl- β -D-1-tiogalaktopiranozydu. Opracowałem procedurę izolacji rekombinowanego białka płaszczka za pomocą immunochromatografii. W tym celu aktywowałem mikrosfery poliakrylamidowe (żel P-100, BioRad) za pomocą aldehydu glutarowego i wiązałem na nim przeciwciała specyficzne wobec PLRV. Po wypełnieniu kolumny chromatograficznej, uzyskany żel wykorzystałem do jednoetapowego oczyszczania rekombinowanego białka płaszczka z lizatu bakterii. Rekombinowanym białkiem immunizowałem króliki uzyskując przeciwciała o wysokim mianie i bardzo dobrej specyficzności [8, 10].

Wyniki badań nad modyfikacją proteolityczną PLRV i jej wpływem na właściwości wirusa, nad optymalizacją wykrywania PLRV w liściach i bulwach oraz nad klonowaniem białka płaszczka PLRV i jego wykorzystaniem do wytwarzania przeciwciał zostały szczegółowo przedstawione w mojej pracy doktorskiej, którą obroniłem w 2002 r. Praca ta została wyróżniona przez Radę Naukową IHAR, a rok później otrzymałem nagrodę Prezesa Rady Ministrów za rozprawę doktorskie. Wyniki były również prezentowane na konferencjach naukowych. Omówione wyżej badania i staż w laboratorium prof. M. Mayo finansowane były z dwuletniego grantu promotorskiego, przyznanego przez KBN mojemu promotorowi – dr hab. Jerzemu Lewoszowi w roku 2000.

KONFERENCJE

2. Treder K., Lewosz J., Sekrecka D. 1998. Isolation of 17, 23, 56 kD proteins from potato leaf roll virus particles and their employment as antigens. [In:] The 10th EAPR Virology Section Meeting, Baden, Austria, 5-10th July, abstracts: 69-70. Współautor referatu.
3. Treder K., Lewosz J. 1999. Zastosowanie techniki PCR do klonowania genu białka płaszczka wirusa liściozwoju ziemniaka (PLRV). [W:] I Krajowy Kongres Biotechnologii, Wrocław, 20-25 września, abstrakty: 20. Poster.
4. Treder K., Lewosz J. 1999. Modification of the properties of PLRV particles by endogenous plant proteinases. [In:] 14th Triennial Conference of the European Association for Potato Research, Sorrento, Italy, 2-7 May, abstracts.: 557-558. Referat.
5. Treder K., Lewosz J. 2000. Wpływ proteaz na wykrywalność wirusa liściozwoju ziemniaka w soku z bulw ziemniaka. XXXVI Zjazd PTBioch., Poznań. Poster.
6. Treder K., Lewosz J. 2000. Detection of PLRV and PVY in dormant potato tubers by cocktail and amplified ELISA assay. [W:] Report of the joint meeting of the Potato Section of EUCARPIA and the Section Breeding and varietal assessment of the EAPR, 3-7 July, 2000, Warsaw, Poland. Potato Research, 43: 424. Poster.
7. Treder K., Lewosz J. 2001. Wpływ proteaz asparaginowych na własności wirusa liściozwoju ziemniaka (PLRV). [W:] XXXVII Zjazd PTBioch., Toruń 10-14.09., Streszczenia: 337. Poster.

8. Treder K., Lewosz J. 2001. Production of antibodies against potato leafroll virus using coat protein expressed in *Escherichia coli* as an antigen. The 11th EAPR Virology Section Meeting, Havlickov Brod, Trest, Czech Republic, 7-13 October. Współautor referatu.

ROZDZIAŁY W PUBLIKACJACH ZBIOROWYCH

9. Treder K., Lewosz J. 1999. Isolation of 17, 23 and 56 KD proteins from potato leafroll particles and some evidence for their proteolytic modification. [In:] Proceedings of the 10th EAPR Virology Section Meeting, Baden, Austria, 5-10th July 1998, pp 175-180.
10. Treder K., Lewosz J. 2001. Production of antibodies against potato leafroll virus using coat protein as an antigen. [In:] Proceedings of the 11th EAPR Virology Section Meeting, Havlickov Brod – Trest, Czech Republic, 7-13th October 2001, pp 62-64.

PUBLIKACJE

11. Treder K., Lewosz J. 2000. Zastosowanie metod molekularnych do wykrywania wirusa liściozwoju ziemniaka (PLRV). Prog. Plant Prot./Post. Ochr. Roślin, 40: 177-187.

PROJEKT

- 2000-2001. P06A 031 18. Projekt badawczy promotorski finansowany przez KBN pt.: "Wpływ proteolitycznej modyfikacji cząstek wirusa liściozwoju ziemniaka w roślinie na jego własności i wykrywalność". Główny wykonawca.

Poza omówionymi wyżej pracami, które weszły w skład mojej pracy doktorskiej, brałem aktywny udział w innych badaniach realizowanych przez dr hab. Jerzego Lewosza. Część zapoczątkowanej przez niego tematyki badawczej jest realizowana w PDMiB po dzień dzisiejszy i zostanie omówiona poniżej.

Pod koniec lat pięćdziesiątych ubiegłego wieku dr hab. Jerzy Lewosz, prowadząc badania nad *Phytophthora infestans* – sprawcą zarazy ziemniaka zaobserwował, że niektóre zarodnie tego patogenu rozpadają się uwalniając komórki bakteryjne, które zidentyfikował jako *Pseudomonas fluorescens*. Kolonie tej bakterii i płyn z hodowli zawiesinowych silnie hamowały wzrost szeregu grzybowych i bakteryjnych patogenów ziemniaka [13]. Mój udział w kontynuacji tych badań polegał na oczyszczeniu antybiotyków produkowanych przez *P. fluorescens* z wykorzystaniem różnych wariantów wysokosprawnej chromatografii cieczowej (HPLC). Dzięki uprzejmości prof. Gorana Sandberga (Plant Science Center, Umea, Szwecja), identyfikacja antybiotyków była wykonana przez jego doktoranta – Mariusza Kowalczyka, któremu pomagałem w analizie składu przygotowanych przeze mnie preparatów za pomocą chromatografii gazowej i spektrometrii mas. W badanych preparatach za aktywność antybiotyczną odpowiadały 1-karboksyfenazyne i hemipiocyjanina [12, 14]. Wyniki tych badań były prezentowane na dwóch konferencjach międzynarodowych i jednej krajowej.

KONFERENCJE

12. Lewosz J., Kowalczyk M., Treder K., Hołubowska M., 2001. Purification and properties of antibiotic substances produced by fluorescent strain of *Pseudomonas*. [In:] Pathology Section Meeting of EAPR, Poznań, 10-15 07. IHAR Oddz. Bonin: 43-44. Referat.
13. Lewosz J., Hołubowska M., Treder K. 2001. Antibiosis/parasitism performed by fluorescent strain of *Pseudomonas* isolated from sporangia of *Phytophthora infestans*. Konferencja IHAR-CEEM Warszawa, 9-14. 06. Poster.

14. Lewosz J., Hołubowska M., Kowalczyk M., Treder K. 2001. Charakterystyka antybiotyków wytwarzanych przez szczep *Pseudomonas* antagonizujący wobec patogenów roślin. [W:] XXXVII Zjazd PTBioch., Toruń 10-14.09. Streszczenia: 173. Poster.

Brałem również aktywny udział w pracach, które dr hab. Jerzy Lewosz prowadził nad różnicowaniem i identyfikacją odmian ziemniaka przy pomocy metod biochemicznych i technik biologii molekularnej. Już w latach siedemdziesiątych ubiegłego wieku zaobserwowałem, że pozostające w stanie spoczynku bulwy różnych odmian ziemniaka charakteryzują się unikalnym składem białek, dzięki czemu za pomocą elektroforezy natywnej można identyfikować poszczególne odmiany. Stwierdziłem również, że do ich różnicowania można wykorzystać jedną z głównych frakcji białek bulw – inhibitory proteaz. Mój udział w kontynuacji tej części badań polegał na wykonaniu różnicowania około stu odmian ziemniaka w oparciu o rozdział elektroforetyczny inhibitorów trypsyny izolowanych za pomocą chromatografii powinowactwa z bulw badanych odmian [15, 16, 18]. Te same odmiany różnicowaliśmy również za pomocą techniki SSR-PCR (ang. Simple Sequence Repeat PCR) wykorzystującej startery z powtórzeniami AC i AG. Moja rola w tej części badań polegała na optymalizacji izolacji DNA z tkanek ziemniaka oraz warunków reakcji PCR [15]. Ten kierunek badawczy był kontynuowany przeze mnie w latach późniejszych. Efektem tych prac była optymalizacja różnicowania odmian ziemniaka za pomocą elektroforezy natywnej białek bulw ziemniaka oraz adaptacja techniki ISAP-PCR (ang. Inter SINE Amplified Polymorfism) wykorzystującej do różnicowania polimorfizm krótkich, rozproszonych elementów jądrowych (ang. Short Interspersed Nuclear Elements – SINE) [17, 19].

KONFERENCJE

15. Pilecka A., Lewosz J., Treder K., 2001. Utilization of molecular markers for characterization of potato germplasm resource. [In:] Konferencja EUCARPIA, Poznań 16-20.05.2001. UAM: 47-50. Poster.
16. Przewodowski W., Lewosz J., Treder K., Pilecki T., Barnyk A. 2006, Identyfikacja odmian ziemniaka metodami biochemicznymi. [W:] Nasiennictwo i ochrona ziemniaka. Konf. nauk.-szkol., Kołobrzeg, 30-31.03., IHAR ZNiOZ Bonin: 96. Poster.
17. Pawłowska A., Chołuj J., Treder K. 2016. Ocena jednorodności odmian ziemniaka za pomocą elektroforezy natywnej i molekularnego testu ISAP. [W:] Nasiennictwo i ochrona ziemniaka. Konf. nauk.-szkol. Dźwirzyno, 11-13.05. IHAR ZNiOZ Bonin: 47-48. Współautor referatu.

PUBLIKACJE

18. Przewodowski W., Lewosz J., Treder K., Pilecki T., Barnyk A. 2007. Identyfikacja odmian ziemniaka metodą elektroforetyczną. Biul. IHAR 243: 151-157.
19. Treder K., Pawłowska A., Chołuj J. 2016. Identyfikacja odmian ziemniaka za pomocą elektroforezy natywnej białek i molekularnego testu ISAP. *Ziemniak Polski*, 4: 21-27.

W latach dziewięćdziesiątych ubiegłego wieku dr hab. Jerzy Lewosz prowadził także prace nad pozyskiwaniem peroksydaz z wycierki ziemniaczanej, która stanowi odpad przemysłu skrobiowego. Mój udział w kontynuacji tych badań polegał na wykonaniu doświadczeń wykazujących, że peroksydaza z wycierki skutecznie usuwa z mieszaniny reakcyjnej szereg

związków fenolowych. W wyniku działania enzymu badane fenole polimeryzowały, a powstały polimer wytrącał się z reakcji w postaci osadu. Niestety, peroksydaza szybko traciła aktywność [20, 21]. Oczyszczanie wody powinno być procesem ciągłym, co można osiągnąć dodając co jakiś czas świeże porcje enzymu. Innym rozwiązaniem jest immobilizacja enzymu na powierzchni złoża lub mikrosfer. Unieruchomienie cząstek enzymu zazwyczaj prowadzi do jego stabilizacji i zwiększenia trwałości. W omawianych wyżej badaniach peroksydaza była izolowana z wycierki za pomocą wysokich stężeń soli, co świadczy o tym, że jest silnie związana jonowo z wycierką. Założyłem, że do oczyszczania wody można wykorzystać wycierkę, traktując ją jako materiał z naturalnie związanym enzymem. Tę hipotezę weryfikowałem we współpracy z dr hab. Jarosławem Tyburskim (UMK w Toruniu). Jest to jeden z ważnych aspektów pracy doktorskiej Pani mgr Katarzyny Kurnik (obecnie Krzyżyńskiej), której promotorem jest dr hab. Jarosław Tyburski, a ja pełnię funkcję promotora pomocniczego. W ramach realizacji tej pracy udało się wykazać przydatność wycierki do usuwania fenoli [22-24]. Wykonana została również charakterystyka biochemiczna peroksydaz z wycierki [22, 23] i z młóta [24], które jest odpadem w produkcji piwa. Moja rola w tych badaniach polegała na współudziale w tworzeniu koncepcji badań i metodyki badawczej [22-24] oraz na identyfikacji izoform peroksydazy za pomocą elektroforezy natywnej [22].

KONFERENCJE

20. Lewosz J., K. Treder: 1999. Otrzymywanie peroksydazy z wycierki ziemniaczanej i jej wykorzystanie do usuwania związków fenolowych z wody. [W:] I Krajowy Kongres Biotechnologii, Wrocław 20-25 września, streszczenia: 264. Poster.
21. Treder K., Lewosz J.: 1999. Utilization of by-products of starch industry for biotechnological purposes. [In:] 14th Triennial Conference of the European Association for Potato Research, Sorrento, Italy, 2-7 May, abstracts.: 293-294. Współautor referatu.

PUBLIKACJE

22. Kurnik K., Treder K., Skorupa-Kłaput M., Tretyn A., Tyburski J. 2015. Removal of phenol from synthetic and industrial waste water by potato pulp peroxidases. *Water Air Soil Pollut.*, 2015; 226(8): 254.
23. Kurnik K., Treder K., Twarużek M., Grajewski A., Tretyn A., Tyburski J. 2018. Potato pulp as the peroxidase source for 2,4-dichlorophenol removal. *Waste Biomass Valor.*, 9: 1061-1071.
24. Kurnik K., Krzyżyński M., Treder K., Tretyn A., Tyburski J. 2018. Study on utilizing solid food industry waste with brewers' spent grain and potato pulp as possible peroxidase sources. *J. Food Biochem.*, 42: 12446.

Innym zagadnieniem realizowanym przez dr hab. Jerzego Lewosza były badania nad peptydami i białkami ścian komórkowych bulw ziemniaka, które posiadały zdolność do hamowania wzrostu mikroorganizmów patogennych. Głównym składnikiem wycierki ziemniaczanej są ściany komórkowe bulw. Dlatego można pozyskiwać z niej białka i peptydy o aktywności antybiotycznej. Brałem udział w badaniach, których celem było potwierdzenie obecności peptydów antybiotycznych w ekstraktach ze ścian komórkowych [28] i z wycierki

[25, 29] oraz opracowanie sposobu ich oczyszczania za pomocą szeregu metod chromatograficznych [25, 26]. Wykazałem, że polipeptydy aktywne wobec mikroorganizmów są zdolne do wiązania kwasów nukleinowych [28] i posiadają również aktywność inhibitora trypsyny [27].

KONFERENCJE

25. Lewosz J., Treder K., Pilecki T. 2005. Isolation of antimicrobial peptides from potato pulp, by-product of starch industry. [In:] The 16th Triennial Conference of the EAPR, Bilbao, Spain, July 17-22, Abstracts: 894-899. Poster.
26. Barnyk A., Przewodowski W., Lewosz J., Treder K. 2008. Purification of antimicrobial peptides from potato pulp. [In:] The Congress of Biochemistry and Cell Biology, Olsztyn, Poland, September 7-11, Abstracts, Acta Biochimica Polonica, 55 (suppl.): 114. Poster.
27. Barnyk A., Przewodowski W., Treder K. 2010. Hamowanie wzrostu bakterii *Cms* przez ziemniaczany inhibitor trypsyny. Konf. nauk.-szkol. Darłówko, 20-21 maja. IHAR ZNiOZ Bonin: 86. Poster.

PUBLIKACJE

28. Pilecka A., Lewosz J., Treder K. 2000. Charakterystyka antymikrobiologicznej aktywności niektórych polipeptydów ścian komórkowych ziemniaka. Prog. Plant Prot./Post. Ochr. Roślin, 40: 188-194.
29. Barnyk A., Przewodowski W., Treder K. 2009. Wpływ białek ziemniaka na wzrost wybranych drobnoustrojów chorobotwórczych. Prog. Plant Prot./Post. Ochr. Roślin, 49: 890-893.

Istotnym kierunkiem badawczym realizowanym przez dr hab. Jerzego Lewosza były prace nad diagnostyką i sposobami zwalczania bakterii *Clavibacter sepedonicus*, sprawcy bakteriozy pierścieniowej ziemniaka. *C. sepedonicus* klasyfikowany był w przeszłości jako podgatunek *C. michiganensis* ssp. *sepedonicus*. Jest to ważny patogen kwarantannowy ziemniaka, w którego zwalczaniu stosuje się zasadę zerowej tolerancji. W części prac prowadzonych nad molekularną diagnostyką *C. sepedonicus* moja rola polegała na optymalizacji metody izolacji DNA do wykrywania bakterii za pomocą testu PCR i optymalizacji warunków reakcji PCR. Dr hab. Jerzy Lewosz prowadził również badania nad opracowaniem nowych materiałów do zagęszczania i immunopułapkowania komórek bakterii poprzez wiązanie na różnych podłożach, między innymi na wytwarzanym przez niego koloidzie złota oraz na różnych rodzajach materiałów, które pokrywał polianiliną. Mój udział polegał na porównaniu czułości testu ELISA wykonanego na płytkach niemodyfikowanych z czułością tego testu wykonanego na płytkach pokrytych polianiliną. Dodatkową metodą stosowaną przeze mnie w tych badaniach był test PCR. Modyfikacja mikropłetek polimerem aniliny powodowała, że czułość testu ELISA była porównywalna z czułością testu PCR [30, 31]. Jednym z wielu oryginalnych pomysłów dr hab. Jerzego Lewosza było wytwarzanie przeciwciał specyficznych wobec *C. sepedonicus*, poprzez stosowanie komórek bakteryjnych pozbawionych egzopolisacharydów tworzących śluzową otoczkę bakterii. Ich obecność w antygenach stosowanych do immunizacji zwierząt była główną przyczyną niskiej specyficzności przeciwciał komercyjnych, które w dużym stopniu rozpoznawały śluzę bakteryjne, a nawet

polisacharydy roślinne, dając w efekcie wysokie tło w testach immunologicznych. Moja rola w tej części badań polegała na immunizacji królików preparatem przygotowanym przez dr hab. Jerzego Lewosza, w którego skład wchodziły komórki *C. sepedonicus* pozbawione śluzu. Uzyskane przeze mnie przeciwciała rozpoznawały specyficznie pozbawione śluzu komórki *C. sepedonicus* i nie rozpoznawały śluzu bakteryjnego. Wyniki omówionych wyżej prac z moim udziałem dr hab. Jerzy Lewosz referował na dwóch konferencjach.

KONFERENCJE

30. Lewosz J., Treder K., Barnyk-Jaskot A. 2004. Detection of bacterial plant pathogens by biosensors. [In:] International Workshop "Improvement and unification of plant disease diagnostics", Skierniewice, 30 September – 1 October, Abstracts: 20. Współautor referatu.
31. Lewosz J., Treder K., Pilecki T. 2005. Wykrywanie i identyfikacja mikroorganizmów z użyciem biosensorów. [W:] XLV Sesja Naukowa IOR, Poznań 3-4 luty, streszczenia: 93-94. Współautor referatu.

Po doktoracie prowadziłem również własne badania nad opracowaniem metody wykrywania wirusów ziemniaka (PLRV, PVM, PVS, PVX i PVY) bezpośrednio w ekstraktach z bulw. Adaptowałem do tego celu test koktajl-ELISA, opracowany wcześniej przeze mnie w ramach pracy doktorskiej do wykrywania PLRV. By dostosować test do ww. wirusów optymalizowałem skład buforów stosowanych w teście koktajl-ELISA, uzupełniając go między innymi o hydrofilowe polimery [32, 33]. W doświadczeniach stosowałem głównie rośliny modelowe, infekowane ww. wirusami w szklarni. Badanie potomnych bulw testem koktajl-ELISA i próbą oczkową wykazały, że obie metody były równie skuteczne w ocenie poziomu infekcji wirusowych w uzyskanych bulwach [32-35, 36, 37].

W tym okresie kontynuowałem produkcję przeciwciał do wykrywania PLRV, a po likwidacji Oddziału IHAR w Gdańsku i wchodzącej w jego skład Pracowni Serologii, wytwarzałem wraz z mgr. Tomaszem Pileckim zestawy ELISA do wykrywania ww. wirusów ziemniaka. Prace obejmowały poprawę jakości wytwarzanych przeciwciał poprzez opracowanie metod pozwalających na izolację preparatów wirusowych o wysokiej czystości, optymalizację składu adiuwantów dodawanych do antygenów wirusowych, metod oczyszczania przeciwciał [36] oraz koniugacji przeciwciał z alkaliczną fosfatazą. Ze sprzedaży wytwarzanych zestawów ELISA IHAR osiągał niebagatelny zysk finansowy, w wysokości około 300 tys. zł rocznie.

Omówione badania finansowane były z kierowanego przeze mnie grantu KBN nr 2P06 008 26, a otrzymane wyniki prezentowano na siedmiu konferencjach naukowych.

KONFERENCJE

32. Treder K., Lewosz J., Pilecki T., Wróbel S. 2004. Direct tuber testing for potato viruses by cocktail-ELISA. [In:] The Third Biennial All-Iowa Virology Symposium, 22-23 October 2004, Ames, Iowa, USA, Abstract's Book: 71. Poster.

33. Treder K., Pilecki T., Lewosz J. 2004. Optimization of cocktail ELISA for detection of potato viruses in tuber sap. [In:] International Workshop "Improvement and unification of plant disease diagnostics", Skierniewice, 30 September – 1 October, Abstracts: 65. Poster.
34. Treder K., Pilecki T., Lewosz J. 2005. Detection of PVY, PVM and PLRV in the sap of the dormant tubers by cocktail ELISA. [In:] The 16th Triennial Conference of the EAPR, Bilbao, Spain, July 17-22, Abstracts: 1010–1014. Poster.
35. Pilecki T., Lewosz J., Treder K., 2005. Optymalizacja testu koktajl-ELISA do wykrywania PLRV, PVM oraz PVY. [W:] Nasiennictwo i Ochrona Ziemniaka. Konf. nauk.-szkol., Kołobrzeg 10-11 marca 2005, IHAR ZNiOZ Bonin: 26-27. Poster.
36. Barnyk A., Lewosz J., Treder K., Pilecki T., Przewodowski W. 2006. Zastosowanie chromatografii tiofilnej w procesie produkcji zestawów diagnostycznych. [W:] Nasiennictwo i ochrona ziemniaka. Konf. nauk.-szkol., Kołobrzeg, 30-31.03., IHAR ZNiOZ Bonin: 95. Poster.
37. Pilecki T., Lewosz J., Treder K., Barnyk A., Przewodowski W., 2006. Wykrywanie PLRV, PVM, PVS, PVX i PVY w bulwach ziemniaka. [W:] Nasiennictwo i ochrona ziemniaka. Konf. nauk.-szkol., Kołobrzeg, 30-31.03., IHAR ZNiOZ Bonin: 98. Poster.
38. Pilecki T., Treder K., Lewosz J. 2007. Możliwość wykrywania wirusów PLRV, PVM i PVY w bulwach ziemniaka. [W:] 47 Sesja IOR, Poznań, 15-16 luty, streszczenia: 236. Poster.

PROJEKT

- 2004-2006. 2P06 008 26. Projekt badawczy finansowany przez KBN pt.: "Opracowanie procedur wykrywania wirusów PLRV, PVY, PVM, PVS, PVX, bezpośrednio w bulwach ziemniaka. Kierownik projektu.

Od końca października 2004 roku do końca grudnia 2007 roku oraz od listopada 2010 roku do lipca 2012 roku odbyłem staże podoktorskie w laboratorium kierowanym przez prof. Wyatta Allena Millera (Plant Pathology Department, Iowa State University, Ames, Iowa, USA). Mój udział w badaniach tego zespołu skupiał się głównie na badaniu roli eukariotycznego czynnika inicjującego translację 4F (eIF4F) i jego izoformy eIFiso4F w translacji białek wirusowych. U roślin czynnik eIF4F zbudowany jest z mniejszej podjednostki eIF4E i z dużego białka eIF4G, a eIFiso4F z izoform obu tych białek.

Znakomita większość eukariotycznych informacyjnych RNA posiada zarówno kap, czyli 7-metyloguanozynę przyłączoną wiązaniem 5',5'-trifosforanowym do końca 5' mRNA jak i łańcuch poli(A)n na jego 3'-końcu. Kap jest specyficznie rozpoznawany przez eukariotyczny czynnik inicjujący translację eIF4E, natomiast do ogona poli(A)n przyłącza się białko PABP (ang. poly(A)n binding protein). Oba białka oddziałują z eukariotycznym czynnikiem inicjującym translację – eIF4G, co prowadzi do powstania struktury kolistej złożonej z kompleksu mRNA i białek. Zdolność do utworzenia takiej formy przez mRNA informuje komórkowy aparat translacyjny o tym, że jest ono nieuszkodzone. Ponadto, koliste mRNA jest chronione przed degradacją i zwiększa powinowactwo czynnika eIF4G do czynnika inicjacji translacji eIF3, który bezpośrednio wiąże małą podjednostkę rybosomu. Oddziaływania białek ze sobą oraz z mRNA wzmacniają wzajemne powinowactwo wszystkich elementów i prowadzą do powstania stabilnego kompleksu inicjacyjnego. Mała podjednostka, dzięki wiązaniu eIF4E z kapem, rozpoznaje 5'-koniec mRNA i liniowo przesuwana się wzdłuż liderowej sekwencji aż

do pojawienia się kodonu AUG, położonego we właściwym kontekście sekwencyjnym (sekwencja Kozak). Wtedy przyłącza się do niej duża podjednostka, co skutkuje odłączeniem niemal wszystkich czynników inicjacji translacji od kompleksu inicjacyjnego. Rozpoczyna się faza elongacji łańcucha peptydowego. Inicjacja jest ściśle regulowanym etapem translacji i ma decydujący wpływ na szybkość, a co za tym idzie wydajność biosyntezy białka.

Rodzi się pytanie, w jaki sposób liczne wirusy roślin, które nie posiadają kapa, poli(A)n lub obu tych struktur radzą sobie z syntezą swoich białek w eukariotycznych komórkach roślinnych. Zespół prof. Wyatta Allena Millera prowadzi badania nad translacją tego typu wirusów, stosując jako model wirus żółtej karłowatości jęczmienia (ang. Barley Yellow Dwarf Virus – BYDV), który nie posiada kapa ani poli(A)n. Genomowe RNA (gRNA) tego wirusa jest jednocześnie matrycą do biosyntezy białek. W jego 3'-końcowym regionie niekodującym znajduje się element translacyjny BTE (ang. **BYDV Translation Element**), który jest modelowym przedstawicielem klasy elementów translacyjnych, określanymi jako 3'CITE (ang.: 3' **Cap-Independent Translation Element**). Jest to struktura RNA zbudowana z czterech ramion i trzech pętli, pełniąc jednocześnie funkcję kapa i poli(A)n. W okresie, w którym dołączyłem do zespołu wiadomo było, że pętla III BTE odpowiada za tworzenie struktury kolistej gRNA i subgenomowego RNA 1 (sgRNA1) wirusa poprzez bezpośrednie, długodystansowe parowanie z sekwencją znajdującą się w obrębie 5'-UTR obu tych RNA. Formowanie struktury kolistej nie wymagało udziału białek.

Odrębny region BTE obejmujący ramię z pętlą I po umieszczeniu na 5'-końcu reporterowego mRNA posiadał zdolność do pełnienia funkcji kapa, w sposób niezależny od regionu odpowiedzialnego za tworzenie struktury kulistej. Podejrzewano więc, że jest on odpowiedzialny za rekrutację małej podjednostki rybosomu poprzez bezpośrednie oddziaływanie BTE z czynnikiem eIF4E. Moją rolą była weryfikacja tej hipotezy i ustalenie stałej dysocjacji dla potencjalnej interakcji BTE z eIF4E oraz z eIFiso4E. W celu realizacji tego zadania przygotowałem znakowane radioaktywnym fosforem RNA BTE oraz czyste preparaty eksprymowanych w *E. coli* białek z pszenicy: eIF4E, eIFiso4E, eIF4G i eIFiso4G (w celu przygotowania kompleksów kontrolnych – eIF4F oraz eIFiso4F). W prowadzonych przeze mnie badaniach nie udało się potwierdzić interakcji BTE z białkami wiążącymi kap (eIF4E oraz eIFiso4E). Jednocześnie oddziaływanie BTE z eIF4F było silne, a stała dysocjacji dla kompleksu wynosiła 37 nM. Uzyskane wyniki skłoniły mnie do zbadania interakcji BTE z białkiem eIF4G. Okazało się, że wbrew oczekiwaniom BTE bezpośrednio oddziałuje z tym właśnie białkiem ($K_d = 177$ nM). Dodatkowe wiązanie przez eIF4G czynnika eIF4E, wzmacniało jego powinowactwo do BTE. Stwierdziłem też, że eIF4G dodane do ekstraktu

translacyjnego z kielków pszenicy, pozbawionego natywnych czynników eIF4F/iso4F za pomocą dwóch różnych metod (pasażowaniu ekstraktu przez sefarozę z 7-metyloguanozyną lub zablokowaniu czynników przez dodanie nadmiaru RNA BTE *in trans*) było w stanie promować translację reporterowych mRNA zawierających BTE, podczas gdy eIF4E nie posiadało takiej zdolności. Mutant delecyjny eIF4G, pozbawiony dużego fragmentu N-końcowego zawierającego miejsce wiązania eIF4E, posiadał taką samą aktywność translacyjną jak eIF4G. Zgodnie z wynikami z doświadczeń nad siłą oddziaływań, w doświadczeniach funkcjonalnych najwyższą aktywność w promowaniu translacji miał pełny czynnik eIF4F, co dodatkowo potwierdzało, że wiązanie eIF4G z eIF4E wzmacnia nie tylko powinowactwo eIF4G do BTE ale również jego aktywność w promowaniu translacji niezależnej od kapa [40].

Opracowany przeze mnie w wyżej omówionych badaniach model doświadczalny (ekstrakt translacyjny pozbawiony aktywnych czynników inicjujących translację plus czyste preparaty tych czynników) oraz zoptymalizowana metodyka badania siły wiązania elementów RNA z białkami pozwoliły innemu członkowi zespołu (dr Zhouhui Wang) na identyfikację elementu 3'CITE u wirusa ostrej mozaiki grochu (PEMV) i wykazanie, że element PTE (**PEMV Translation Element**) w przeciwieństwie do BTE, wiąże bezpośrednio czynnik eIF4E nie oddziałując z eIF4G. Brałem udział w tworzeniu koncepcji tej pracy, proponowaniu metodyki i dyskusji otrzymanych wyników badań. Przygotowałem również za pomocą ukierunkowanej mutagenyzy stosowane w tej pracy mutanty eIF4E pozbawione reszt tryptofanu, co eliminowało zdolność tego białka do wiązania kapa [41].

Wyniki wyżej wymienionych badań oraz identyfikacja elementów 3'CITE i mechanizmu ich działania przez inne zespoły naukowe u wielu wzajemnie niespokrewnionych wirusów stały się podstawą hipotezy, której jestem współautorem. Zgodnie z tą hipotezą, u szeregu wirusów roślinnych powstały niezależnie odmienne elementy translacyjne RNA, różniące się sekwencją nukleotydów i strukturą, lecz pełniące podobną funkcję – rekrutację rybosomu poprzez oddziaływanie z różnymi czynnikami inicjacyjnymi lub bezpośrednio z rybosomem. 3'CITE mogą być przekazywane pomiędzy niespokrewnionymi wirusami, o czym świadczy obecność w genomach niektórych wirusów ewolucyjnie odległych od BYDV 3'CITE o sekwencji homologicznej do BTE i podobnej strukturze przestrzennej, eksponującej obie pętle odpowiedzialne za dwie różne funkcje tego elementu. Również wirusy blisko spokrewnione mogą posiadać elementy 3'CITE o odmiennym pochodzeniu, różniące się sekwencją i mechanizmem działania [39]. Wykazaliśmy również, że różne elementy 3'CITE różnią się znacznie aktywnością do promowania niezależnej od kapa translacji, co może odpowiadać różnym mechanizmom adaptacji wirusów do odmiennych roślin-gospodarzy [42].

Efektem moich dalszych prac w zespole prof. Wyatta Allena Millera było określenie, że region białka eIF4G o długości 97 aminokwasów, rezydujący pomiędzy miejscem wiązania eIF4E a centralną domeną MIF4G, odpowiada za zdolność eIF4G do promowania niezależnej od kapa translacji i do fizycznego wiązania BTE oraz homologicznych elementów 3'CITE z niespokrewnionych z BYDV wirusów. W obrębie tego regionu zidentyfikowałem domenę wiążącą RNA o wysokiej homologii z regionem ludzkiego eIF4G I, który warunkuje wiązanie tego białka do 5'-konca mRNA i jest niezbędny do skanowania sekwencji liderowych mRNA przez małą podjednostkę rybosomu. Zidentyfikowana przeze mnie domena zawiera konserwatywne reszty glicyny, proliny i argininy u eIF4G roślin i ssaków. Uzyskane przeze mnie mutanty eIF4G pozwoliły również udowodnić, że ze strony RNA za wiązanie eIF4G odpowiedzialne są nukleotydy BTE obejmujące głównie ramię z pętlą I. Leżąca w obrębie miejsca wiązania sekwencja nukleotydów jest bardzo konserwatywna w grupie 3'CITE homologicznych z BTE [43].

PUBLIKACJE

39. Miller W.A., Wang Z., Treder K. 2007. The amazing diversity of cap-independent translation elements in the 3'-untranslated regions of plant viral RNAs. *Biochemical Society Transactions*, 35: 1629-1633.
40. Treder K., Kneller E.L.P., Allen E.M., Wang Z., Browning K.S., Miller W.A. 2008. The 3' cap-independent translation element of Barley yellow dwarf virus binds eIF4F via the eIF4G subunit to initiate translation. *RNA*, 14: 134-147.
41. Wang Z., Treder K., Miller W.A. 2009. Structure of a viral cap-independent translation element that functions via high affinity binding to the eIF4E subunit of eIF4F. *Journal of Biological Chemistry*, 284: 14189-14202.
42. Fan Q., Treder K., Miller W.A. 2012. Untranslated regions of diverse plant viral RNAs vary greatly in translation enhancement efficiency. *BMC Biotechnology*, 12: 22.
43. Kraft J.J., Treder K., Peterson M.S., Miller W.A. 2013. Cation-dependent folding of 3' cap-independent translation elements facilitates interaction of a 17-nucleotide conserved sequence with eIF4G. *Nucleic Acids Research*, 41: 3398-3413.

PROJEKTY

- 2003-2013. 5R01GM067104. Projekt badawczy finansowany przez National Institute of Health, USA pt.: "Control of cap-independent translation by a viral 3'UTR". Wykonawca w latach 2004-2007 i 2010-2012.

Po powrocie z pierwszego stażu w USA, w styczniu 2008 r. objąłem stanowisko kierownika PDMiB w Zakładzie Nasiennictwa i Ochrony Ziemiaka w Boninie, IHAR-PIB, które zajmuję po dzień dzisiejszy. Kontynuowałem wraz z zespołem najważniejsze kierunki badawcze Pracowni, ze szczególnym uwzględnieniem badań nad optymalizacją diagnostyki wirusów ziemiaka oraz bakterii kwarantannowej *C. sepedonicus*. Na wykonanie tych prac uzyskałem finansowanie w ramach dwóch projektów badawczych w latach 2008-2013 (zad. nr.: 70 i 71) i jednego w latach 2014-2020 (zad nr.: 58) z programu Postęp Biologiczny w Produkcji Roślinnej (PBwPR), realizowanego przez Ministerstwo Rolnictwa i Rozwoju Wsi. Wyniki uzyskane w efekcie realizacji ww. projektów PBwPR są dostępne na stronie www

IHAR-PIB. Oba projekty zostały przeze mnie zaplanowane tak, by pokryć istniejące oraz stworzyć nowe etaty w Pracowni. Dzięki temu w jej ramach funkcjonują obecnie dwa zespoły, kierowany bezpośrednio przeze mnie trzyosobowy zespół realizujący tematykę wirusową i czteroosobowy zespół skupiony na badaniach nad *C. sepedonicus*. Większość osób tworzących te zespoły, to ludzie młodzi, będący na dobrej drodze do wykonania prac doktorskich. Ponieważ prowadzone przez nas badania obejmowały immunizację królików i pozyskiwanie z nich surowic, wystąpiłem również do Lokalnej Komisji Etycznej (LKE) o zezwolenie na prowadzenie doświadczeń na zwierzętach, które uzyskałem w 2008 i w 2013 dla kierowanych przeze mnie projektów LKE. Kontynuacja badań nad metodami oczyszczania wirusów finansowana była przez Narodowe Centrum Nauki (NCN) w postaci grantu uzyskanego przez członka zespołu - dr. inż. Agnieszkę Barnyk (obecnie Przewodowska). Moje zainteresowania biologią interakcji wirusów z roślinami realizuję dzięki uzyskaniu finansowania projektu badawczego przez NCN w ramach konkursu OPUS 11. Nawiązałem również współpracę naukową z dr. hab. Jarosławem Tyburskim, która zaowocowała omówionymi wcześniej badaniami nad peroksydazami z wycierki ziemniaczanej [22-24]. Prowadzę też współpracę z dr. inż. Dominiką Boguszewską (IHAR-PIB, Oddział w Jadwisinie), w ramach której wykonuję badania nad biochemicznymi markerami tolerancji odmian ziemniaka na suszę. Badania te finansowane są z kierowanego przez dr. inż. Dominikę Boguszewską projektu PBwPR (zad. 59). Poza prowadzeniem badań oraz kierowaniem zespołem badawczym, dbałem również o unowocześnienie bazy sprzętowej Pracowni, dzięki czemu dysponujemy obecnie dobrze wyposażonym laboratorium biochemicznym i molekularnym. Projekty, którymi kierowałem lub w których pełniłem funkcję wykonawcy, wymienione są poniżej. Wyniki ich realizacji omówię w dalszej części referatu, zgodnie z ich tematyką.

PROJEKTY

- 2008-2013. Zadanie nr 70 (nr 65 od 2011 r.) finansowane z Programu Ministerstwa Rolnictwa i Rozwoju Wsi - Postęp Biologiczny w Produkcji Roślinnej pt.: „Opracowanie procedur i wytworzenie materiałów diagnostycznych do wykrywania *Clavibacter michiganensis* ssp. *sepedonicus*”. Kierownik w latach 2008-2010.
- 2008-2013. Zadanie nr 71 (nr 66 od 2011 r.) finansowane z Programu Ministerstwa Rolnictwa i Rozwoju Wsi - Postęp Biologiczny w Produkcji Roślinnej pt.: „Opracowanie procedury wykrywania infekcji wirusowych w bulwach ziemniaka bezpośrednio po zbiorze lub w stanie spoczynku”. Kierownik w latach 2008-2010 i w roku 2013.
- 2014-2020. Zadanie nr 58 finansowane z Programu Ministerstwa Rolnictwa i Rozwoju Wsi - Postęp Biologiczny w Produkcji Roślinnej pt.: „Opracowanie czułych metod wykrywania najważniejszych wirusów ziemniaka”. Kierownik.
- 2014-2020. Zadanie nr 59 finansowane z Programu Ministerstwa Rolnictwa i Rozwoju Wsi - Postęp Biologiczny w Produkcji Roślinnej pt.: „Badania tolerancji odmian ziemniaka na stresy abiotyczne w świetle postępujących zmian klimatycznych”. Kierownik projektu – dr. inż. D. Boguszevska (IHAR-PIB, Oddział Jadwisin). Temat badawczy 7: Opracowanie metod szybkiego wykrywania enzymów odpowiedzialnych za tolerancyjność ziemniaka na suszę glebową. Kierownik tematu badawczego 7.

- 2008-2013. Projekt LKE nr 10/2008 realizowany na podstawie zgody Lokalnej Komisji Etycznej ds. doświadczeń na zwierzętach w Szczecinie pt.: „Wytwarzanie przeciwciał poliklonalnych na patogeny ziemniaka”. Kierownik.
- 2013-2017. Projekt badawczy LKE nr 10/2013 realizowany na podstawie zgody Lokalnej Komisji Etycznej ds. doświadczeń na zwierzętach w Szczecinie pt.: „Wytwarzanie przeciwciał poliklonalnych na patogeny ziemniaka i białka roślinne”. Kierownik.
- 2011-2014. N N310 728540. Projekt finansowany przez Narodowe Centrum Nauki pt.: „Opracowanie procedury izolacji wirusów roślinnych przy użyciu membranowej chromatografii jonowymiennej”. Wykonawca.
- 2017-2020. UMO-2016/21/B/NZ9/03573. Projekt OPUS 11 finansowany przez NCN pt.: "Dynamika transportu i replikacji najważniejszych szczepów wirusa Y ziemniaka w pierwotnie oraz wtórnie porażonych roślinach ziemniaka". Kierownik.

Kierowałem projektem PBwPR dotyczącym diagnostyki bakterii *C. sepedonicus* w latach 2008-2010. Ze względu na wyjazd na staż do USA w listopadzie 2010 r., w latach 2011-2013 projektem kierował dr inż. Włodzimierz Przewodowski. Mój udział w realizacji tych badań polegał na projektowaniu starterów do wykrywania *C. sepedonicus* za pomocą PCR. Projektowałem również startery do wykrywania tej bakterii za pomocą izotermicznego testu LAMP, kierowałem pracami mającymi na celu dobranie warunków testu LAMP oraz określenie specyficzności i czułości opracowanego testu. Wymiernym efektem prac badawczych był wysoce specyficzny dla *C. sepedonicus* test LAMP, wykrywający wszystkie zgromadzone w Pracowni izolaty tej bakterii [46-47].

KONFERENCJE

44. Przewodowski W., Przewodowska A., Treder K. 2013. Modern diagnosis of quarantine pathogen – *Clavibacter michiganensis* ssp. *sepedonicus* based on colloidal gold as sensitive marker. [W:] Symposium „Classical and molecular approaches in plant pathogen taxonomy”. Warsaw, Poland, September 10-11, 2013. WULS-SGGW. Book of Abstracts: 28. Współautor referatu.
45. Przewodowski W., Przewodowska A., Treder K. 2013. Application of colloidal metal nanoparticles in diagnosis of quarantine bacteria – *Clavibacter michiganensis* subsp. *sepedonicus*. [In:] Abstracts of the 10th International Congress of Plant Pathology, 25-30 August, Beijing, China, Acta Phytopathologica Sinica, 43 (suppl.): 370. Poster
46. Przewodowski W., Chołuj J., Przewodowska A., Treder K. 2014. Izotermiczna metoda amplifikacji kwasów nukleinowych LAMP w nowoczesnej diagnostyce sprawcy bakteriozy pierścieniowej ziemniaka. [W:] Nasiennictwo i ochrona ziemniaka. Konferencja naukowo-szkoleniowa. Dźwirzyno, 15-16 maja. IHAR ZNiOZ Bonin: 24 25. Współautor referatu.
47. Przewodowski W., Chołuj J., Przewodowska A., Treder K. 2014. Detection of *Clavibacter michiganensis* ssp. *sepedonicus* using loop-mediated isothermal amplification (LAMP). [In:] XVI International Congress on Molecular Plant-Microbe Interactions. Book of abstracts. 6-10 July, Rhodos, Greece, IS-MPMI: P209. Poster.

Kontynuując badania nad usprawnieniem metod oczyszczania wirusów ziemniaka zastosowałem do tego celu jonowymienną chromatografię membranową stosując PVY jako wirus modelowy. Do oceny integralności cząstek wirusa stosowałem ultrawirowanie w 100 000 g na poduszce 30% sacharozy, ponieważ w takich warunkach wiriony PVY sedymentują tworząc osad, a białka pochodzące z rozpadu płaszczka wirusa pozostają w supernatancie. Stosując to podejście stwierdziłem, że całe cząstki wirusa wiążą się z membraną

posiadającą na powierzchni czwartorzędowe grupy aminowe (membrana Q) i do ich elucji potrzebna jest wysoka siła jonowa (powyżej 0,5 M NaCl). Ponadto połączenie chromatografii na membranie Q z ultrawirowaniem pozwalało na szybkie, dwuetapowe otrzymywanie czystych preparatów PVY [48, 49]. Wyniki te stały się podstawą projektu NCN kierowanego przez dr inż. Agnieszkę Barnyk (obecnie Przewodowska) w latach 2011-2014. Po powrocie z drugiego stażu w USA w sierpniu 2012 r. brałem udział w realizacji tego projektu jako wykonawca. Wyniki badań prezentowano na pięciu konferencjach [48-52] i zawarto w jednej publikacji [53].

KONFERENCJE

48. Wieczorek J., Barnyk A., Treder K. 2010. Oczyszczanie wirusa Y ziemniaka za pomocą chromatografii membranowej. [W:] XV Sympozjum Sekcji Wirusologicznej Polskiego Towarzystwa Fitopatologicznego oraz XXXVII Konferencja Grupy Roboczej Wirusów Roślin Komitetu Ochrony Roślin PAN, Poznań, 9-10 września, streszczenia: 16-17.
49. Barnyk A., Treder K., Wieczorek J. 2010. Szybkie oczyszczanie wirusa Y z materiału roślinnego za pomocą chromatografii membranowej. [W:] 50 Sesja Naukowa IOR-PIB. Poznań, 4-5 lutego, streszczenia: 246. Poster.
50. Przewodowska A., Przewodowski W., Treder K. 2013. Ion-exchange membrane chromatography – a new tool for plant virus purification. [In:] Abstracts of 10th International Congress of Plant Pathology, 25-30 August, Beijing, China, Acta Phytopathologica Sinica, 43 (suppl.): 448-449. Poster.
51. Przewodowska A., Treder K. 2012. Purification of plant viruses by membrane ion-exchange chromatography. [In:] Abstracts of the 15th European Congress on Biotechnology, 23th-26th September, Istanbul, Turkey, New Biotechnology, 29: S133. Poster.
52. Przewodowska A., Zacharzewska B., Przewodowski W., Treder K. 2013. Ion-exchange membrane chromatography – a new tool for plant virus purification. [W:] Symposium „Classical and molecular approaches in plant pathogen taxonomy”. Warsaw, Poland, September 10-11, 2013. WULS-SGGW. Book of Abstracts: 28. Współautor referatu.

PUBLIKACJA

53. Treder K., Zacharzewska B., Przewodowska A., Przewodowski W., Otulak K. 2015. Ion-exchange membrane chromatography as an alternative method of separation of potato Y virus. *Plant Breeding and Seed Science* 72: 56-67.

W latach 2008-2010 i w roku 2013 kierowałem projektem badawczym PBwPR (zad. 71), dotyczącym diagnostyki wirusów. Na czas mojego drugiego stażu w USA, kierowanie projektem przekazałem dr inż. A. Przewodowskiej (w latach 2011-2012). Badania te kontynuuję obecnie realizując projekt PBwPR (zad. 58). W ramach tych projektów uzyskałem czyste preparaty wirusów PLRV, PVY i PVM, które wykorzystaliśmy do wytworzenia surowic króliczych o wysokim mianie przeciwciał specyficznych wobec badanych wirusów. Dzięki zastosowaniu chromatografii tiofilnej [86], zoptymalizowaliśmy izolację przeciwciał z surowic. Uzyskaliśmy przeciwciała anty PLRV, PVY i PVM o wysokim mianie (4-8 mln) oraz niskim poziomie reakcji niespecyficznych. Przeciwciała stosowaliśmy w DAS i koktajl ELISA [54, 55], oraz do opracowania immuno-fluorescencyjnego testu do wykrywania PVY [60], jak również do immunopułapkowania cząstek wirusów w teście immuno-capture RT-PCR [55, 58,

59, 87]. Opracowaliśmy metodę stabilnego wytwarzania koniugatu przeciwciał ze złotem koloidalnym, co umożliwiło wytwarzanie testów immunochromatograficznych (paskowych) we własnym zakresie. Testy umożliwiały wykrycie wirusów ziemniaka w ciągu 5 min z taką samą czułością jak test ELISA. Jednak koszt ich wytwarzania był wyższy niż koszt pasków dostępnych komercyjnie. Koszt komercyjnych testów paskowych to około 15-20 zł za jeden pasek i jest porównywalny z kosztem reakcji PCR oraz ponad 10-krotnie droższy od testu ELISA. Dlatego podjęliśmy badania, których efektem były testy - immunokoncentracyjny oparty o wytwarzane przez nas oraz komercyjne mikrosfery magnetyczne, które powlekaliśmy przeciwciałami, oraz izotermiczny test RT-LAMP do szybkiego wykrywania wirusa PVY [64]. Oba testy można wykonać w warunkach polowych w ciągu 5-20 minut, a ich koszt stanowi połowę kosztu testów paskowych.

Kontynuowaliśmy również prace nad wykrywaniem wirusów w bulwach [54, 55, 88-91]. Dzięki współpracy w ramach projektów PBwPR z polskimi hodowlami ziemniaka, nasze metody porównywano w trzech niezależnych laboratoriach badających infekcje wirusowe ziemniaków uprawianych w różnych regionach Polski. Bulwy do badań przygotowywano zakładając co roku doświadczenia polowe we współpracujących hodowlach oraz w Boninie. Początkowo wyniki potwierdziły przydatność naszej procedury koktajl-ELISA w wykrywaniu wirusów bezpośrednio w ekstraktach z bulw [88, 89]. Jednak w kolejnych latach obserwowaliśmy zmienną skuteczność testu koktajl-ELISA dla wirusa Y ziemniaka. Dalsze badania wykazały, że test koktajl-ELISA dobrze wykrywa PVY w odmianach o niskiej i średniej odporności, natomiast odmiany o podwyższonej odporności wymagają stosowania prób oczkowych do wiarygodnej oceny poziomu infekcji tym wirusem. W omawianych badaniach skuteczność testu dla PLRV i PVM była porównywalna ze skutecznością prób oczkowych. Jednak brak wiarygodności testu w ocenie PVY eliminował jego przydatność do rutynowego badania bulw, w którym potrzebna jest taka sama metodyka dla wszystkich wirusów. Szukając rozwiązania tego problemu, podjęliśmy badania nad wykrywaniem wirusów w kiełkach uzyskanych z bulw, również we współpracy z polskimi hodowlami. Wyniki z sześciu lat badań polowych świadczą o tym, że testowanie kiełków za pomocą ELISA stanowi atrakcyjną pod względem kosztu i czasu wykonania alternatywę dla stosowanych obecnie prób oczkowych [63, 75]. W ramach projektu prowadzimy od kilku lat badania nad wykorzystaniem metod molekularnych do wykrywania PVY, PVM i PLRV bezpośrednio w bulwach. Do realizacji tych prac projektowałem zestawy starterów do wykrywania wirusów PVY, PVM i PLRV testem RT-PCR. W porównaniu z testowanymi starterami opisywanymi w literaturze limit detekcji opracowanych starterów był o co najmniej rząd wielkości wyższy [66-68, 76, 77, 79, 81, 94]. Na podstawie wyników trzyletnich badań wykazaliśmy, że pomimo bardzo

niskiego limitu detekcji w warunkach laboratoryjnych, dla bulw z pola test RT-PCR w czasie rzeczywistym wykrywa kilkakrotnie mniej porażen bulw wirusami niż próby oczkowe [75]. Przyczyną tego stanu rzeczy jest prawdopodobnie fakt, że bulwy stanowią szczególnie trudną tkankę w izolacji RNA. Dlatego obecnie prowadzimy prace nad optymalizacją izolacji RNA z bulw. Z uwagi na mniejszą wrażliwość amplifikacji izotermicznych na roślinne inhibitory hamujące PCR, od kilku lat mój zespół naukowy prowadzi również badania nad stosowaniem izotermicznego testu RT-LAMP do wykrywania wirusów w liściach i w bulwach [89-74, 78], których wyniki zostały przedstawione w opisie osiągnięcia habilitacyjnego. Podjęte badania kontynuuję w ramach projektu PBwPR. W ubiegłym roku opracowaliśmy startery do wykrywania innych niż PVY wirusów ziemniaka oraz test RT-LAMP, który można wykonać z pominięciem izolacji RNA, dodając bezpośrednio do reakcji ekstrakt z tkanek ziemniaka jako matrycę [80, 82, 83]. Obecnie rozpoczynamy także innowacyjne badania nad multipleksową wersją testu RT-LAMP, dzięki której możliwe będzie wykrywanie kilku wirusów z jednej próby.

Wyniki omówionych powyżej badań były prezentowane w postaci trzydziestu jeden doniesień konferencyjnych, w tym dwunastu referatów oraz dwunastu publikacji, w tym trzech z listy A.

KONFERENCJE

54. Pilecki T., Treder K., Lewosz J. 2008. Detection of PVY, PVM and PLRV in the sap of dormant tubers by cocktail ELISA. [In:] The Congress of Biochemistry and Cell Biology, Olsztyn, Poland, September 7th-11th, Abstracts, Acta Biochimica Polonica, 55 (suppl.): 171. Poster.
55. Pilecki T., Treder K., Lewosz J. 2008. Optymalizacja testu koktajl-ELISA do wykrywania wirusa liściozwoju (PLRV) w bulwach ziemniaka. [W:] Nasiennictwo i Ochrona Ziemniaka. Konf. nauk.-szkol., Kołobrzeg, 3-4 kwietnia. IHAR, ZniOZ Bonin: 106-108. Poster.
56. Treder K., Pilecki T. 2009. Wykrywanie wirusów ziemniaczanych bezpośrednio w ekstraktach z bulw - porównanie testu ELISA z immuno-captured RT-PCR. [W:] 49 Sesja Naukowa IOR-PIB, Poznań, 19-20 lutego, streszczenia: 269. Poster.
57. Pilecki T., Treder K. 2010. Wpływ okresu przechowywania ziemniaków na wykrywalność wirusów PLRV, PVM oraz PVY w bulwach. [W:] 50 Sesja Naukowa IOR-PIB. Poznań, 4-5 lutego, streszczenia: 256. Poster.
58. Treder K. 2010. Optymalizacja detekcji wirusa Y ziemniaka za pomocą testu ELISA oraz RT-PCR w soku z liści i bulw ziemniaka. Konferencja „Tradycja i nowoczesność w produkcji ziemniaka”, Jadwisin, 7-9 lipca. Referat.
59. Treder K., Łycuś P. 2010. Optymalizacja wykrywania wirusa Y w soku z liści i bulw ziemniaka. [W:] Nasiennictwo i ochrona ziemniaka. Konf. nauk.-szkol. Darłówek, 20-21 maja. IHAR ZNiOZ Bonin: 74. Referat.
60. Treder K., Łycuś P. 2010. Szybki test immuno-chemiluminescencyjny do wykrywania wirusa Y ziemniaka (PVY), wirusa M ziemniaka (PVM) oraz wirusa liściozwoju ziemniaka (PLRV). [W:] 50 Sesja Naukowa IOR-PIB, Poznań, 4-5 lutego, streszczenia: 259. Poster.
61. Treder K., Zacharzewska B., Przewodowska P. 2013. Application of molecular and immunological methods for direct detection of viruses in dormant tubers. [W:] Symposium „Classical and molecular approaches in plant pathogen taxonomy”. Warsaw, Poland, September 10-11, 2013. WULS-SGGW. Book of Abstracts: 27. Referat.

62. Przewodowska A., Treder K. 2013. Optymalizacja testu RT-PCR do wykrywania wirusa liściozwoju ziemniaka (PLRV). [W:] Nasiennictwo i ochrona ziemniaka. Konf. nauk.-szkol. Dźwirzyno, 16-17.05. IHAR ZNiOZ Bonin: 121. Poster.
63. Treder K., Przewodowska A. 2013. Wykrywanie najważniejszych wirusów ziemniaka bezpośrednio w bulwach. [W:] Nasiennictwo i ochrona ziemniaka. Konf. nauk.-szkol. Dźwirzyno, 16-17.05. IHAR ZNiOZ Bonin: 122. Poster.
64. Treder K., Przewodowska A.. 2013. Application of RT-LAMP for direct detection of potato viruses in dormant tubers. [In:] Abstracts of 10th International Congress of Plant Pathology, 25-30 August, Beijing, China, Acta Phytopathologica Sinica, 43 (suppl.): 448. Poster.
65. 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. Współautor referatu.
66. 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. Referat.
67. 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. Poster.
68. Zacharzewska B., Przewodowska A., Treder K. 2014. Optimization of the detection of the most important potato viruses by reverse transcription polymerase chain reaction. [In:] XVI International Congress on Molecular Plant-Microbe Interactions. Book of abstracts. 6-10 July, Rhodos, Greece, IS-MPMI: P207. Poster.
69. 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.
70. 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.
71. 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. Referat.
72. Zacharzewska B., Chołuj J., Treder K. 2015. 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.
73. Zacharzewska B., Chołuj J., Treder K. 2015. Opracowanie izotermicznego testu LAMP do wykrywania wirusów ziemniaka. [W:] Nasiennictwo i ochrona ziemniaka. Konf. nauk.-szkol. Dźwirzyno, 13-15.05. IHAR ZNiOZ Bonin: 99. Poster.
74. 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. Współautor referatu.
75. Treder K., Chołuj J., Pawłowska A., Dybner M., 2016. Wykrywanie wirusa Y w bulwach i kiełkach ziemniaka. [W:] Nasiennictwo i ochrona ziemniaka. Konf. nauk.-szkol. Dźwirzyno, 11-13.05. IHAR ZNiOZ Bonin: 45-46. Referat.
76. 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.
77. Mielczarek M., Chołuj J., Zacharzewska B., Treder K. 2017. Nowy test do wykrywania wirusa liściozwoju ziemniaka za pomocą konwencjonalnego PCR oraz real-time PCR. [W:] Nasiennictwo i ochrona ziemniaka. Konf. nauk.-szkol. Dźwirzyno, 16-17 maja. IHAR ZNiOZ Bonin: 75-76. Poster.
78. 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. [In:] EAPR 20th Triennial Conference, Versailles, 9-10 July. Potato facing global challenges. Keynote lectures and abstracts, P052: 223. Poster.

79. 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. [In:] EAPR 20th Triennial Conference, Versailles, 9-10 July. Potato facing global challenges. Keynote lectures and abstracts, P052: 227. Poster.
80. Mielczarek M., Zacharzewska B., Treder K. 2018. Wykrywanie wirusów ziemniaka bezpośrednio w ekstraktach z liści za pomocą izotermicznego testu RT-LAMP. [W:] Nasiennictwo i ochrona ziemniaka. Konf. nauk.-szkol. Dźwirzyno, 6-8 czerwca. IHAR ZNiOZ Bonin: 27-29. Współautor referatu.
81. 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. Poster.
82. 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. Poster.
83. Treder K., Chołuj J., Zacharzewska B., Mielczarek M. 2018. Kolorymetryczny test RT-LAMP do wizualnego wykrywania wirusa Y ziemniaka. [W:] Nasiennictwo i ochrona ziemniaka. Konf. nauk.-szkol. Dźwirzyno, 6-8 czerwca. IHAR ZNiOZ Bonin: 24-26. Referat.
84. Zacharzewska B., Treder K. 2018. Opracowanie izotermicznego testu molekularnego do wykrywania wirusa liściozwoju ziemniaka w oparciu o reakcję amplifikacji kwasów nukleinowych zależną od helikazy. [W:] Nasiennictwo i ochrona ziemniaka. Konf. nauk.-szkol., Dźwirzyno, 6-8 czerwca. IHAR ZNiOZ Bonin: 29-30. Referat.

PUBLIKACJE

85. Barnyk A., Lewosz J., Treder K., Przewodowski W., Pilecki T. 2008. Zastosowanie chromatografii tiofilnej do izolacji przeciwciał poliklonalnych z surowicy krwi królików. Biuletyn Instytutu Hodowli i Aklimatyzacji Roślin, 248: 87-95.
86. Treder K., Przewodowski W. 2009. Poprawa czułości wykrywania wirusów ziemniaka testem ELISA dzięki zwiększeniu adsorpcyjności mikroptytek poprzez mycie w proszku do prania. Prog. Plant Prot./Post. Ochr. Roślin, 49: 1767-1769.
87. Treder K., Pilecki T., Łycuś P. 2009. Wykrywanie wirusów ziemniaczanych bezpośrednio w ekstraktach z bulw – porównanie testu ELISA z immuno-captured RT-PCR. Prog. Plant Prot./Post. Ochr. Roślin, 49: 740-745.
88. Pilecki T., Barnyk A., Przewodowski W., Treder K. 2009. Wpływ inhibitorów reakcji niespecyficznego adsorpcji przeciwciał i składu buforów na wykrywalność wirusów w bulwach ziemniaka. Prog. Plant Prot./Post. Ochr. Roślin, 49: 691-695.
89. Treder K., Przewodowski W., Barnyk A. 2009. Factors influencing detection of potato leafroll virus and potato virus Y in potato tuber extracts. Plant Breeding and Seed Science, 59: 65-74.
90. Pilecki T., Treder K. 2010. Wpływ okresu przechowywania ziemniaków na wykrywalność wirusów PLRV, PVM oraz PVY w bulwach. Prog. Plant Prot./Post. Ochr. Roślin, 50: 723-727.
91. 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. **(H1)**.
92. 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. Am. J. Potato. Res., 92: 303-311. **(H2)**.
93. Treder K. 2015. Metody wykrywania obecności wirusów ziemniaka. Ziemniak Polski, 4: 18-23.
94. 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.
95. 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. **(H3)**.
96. 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. Archives of Virology, 163: 447-458. **(H4)**.
97. Treder K. 2018. Izotermiczna amplifikacja kwasów nukleinowych metodą LAMP i jej zastosowanie w diagnostyce patogenów ziemniaka. Ziemniak Polski, 2: 48-36.

6. Podsumowanie dorobku naukowo-badawczego

Mój dorobek publikacyjny po uzyskaniu stopnia doktora obejmuje trzydzieści dwie publikacje, łącznie z czterema pracami stanowiącymi osiągnięcie naukowe. Wśród nich dwadzieścia pięć stanowią oryginalne opracowania naukowe, w tym dwanaście opublikowanych w czasopiśmie posiadających współczynnik wpływu IF, wyróżnionych w Journal Citation Reports (JCR). Jestem także autorem i współautorem siedmiu prac przeglądowych, włącznie z jedną opublikowaną w czasopiśmie posiadającym współczynnik wpływu IF. Wyniki realizowanych po doktoracie prac upowszechniałem również w postaci siedemdziesięciu dziewięciu doniesień prezentowanych na dwudziestu dwóch konferencjach międzynarodowych i osiemnastu konferencjach krajowych, z czego piętnaście stanowiły wygłoszone przeze mnie referaty, a w kolejnych piętnastu referatach byłem ich współautorem. Pozostałe czterdzieści dziewięć doniesień miało formę posterów. W dwóch konferencjach międzynarodowych uczestniczyłem dzięki stypendiom przyznanych przez organizatorów na podstawie konkursu zgłoszonych posterów (ang. travel grants).

Po doktoracie miałem okazję poszerzać moje doświadczenie naukowe przebywając w trzech zagranicznych uczelniach (Szwecja, USA i Irlandia). Szczególnie istotne były dla mnie dwa staże w Iowa State University (Ames, IA, USA), łącznie obejmujące pięć lat pracy w zespole kierowanym przez prof. Wyatta Allena Millera. Udział w pasjonujących badaniach nad biologią molekularną inicjacji translacji białek wirusowych stanowił doświadczenie, które udoskonało mój warsztat naukowy i poszerzyło wiedzę z zakresu biologii molekularnej. Miałem też doskonałą okazję na rozwijanie zdolności do międzynarodowej współpracy badawczej oraz zdobywałem doświadczenie w opiece naukowej nad początkującymi członkami zespołu. Nabyte umiejętności były zapewne powodem moich dwóch wizyt w Re-coding Laboratory (Bioscience Institute, University College Cork, Irlandia) na zaproszenie prof. Johna F. Atkinsa, w trakcie których uczyłem jego ówczesną doktorantkę Betty Chung metod badania interakcji białek wirusowych z białkami roślinnymi. Pani Betty Chung odbyła również dwie wizyty w kierowanej przeze mnie Pracowni, w Oddziale IHAR-PIB w Boninie w 2008 i 2009 roku. Prof. John F. Atkins i ówcześni członkowie jego zespołu - dr Betty Chung oraz dr Andrew Firth docenili mój wkład w ich badania nad wirusami roślinnymi umieszczając podziękowania dla mnie w kilku swoich publikacjach.

Z racji mojego zatrudnienia w instytucie badawczym, nie mam zbyt wielu osiągnięć w pracy dydaktycznej. Niemniej, pod moją opieką zdobywało doświadczenie w pracy laboratoryjnej pięcioro studentów studiów II stopnia z kilku polskich uczelni wyższych. Ponadto, przygotowałem i wygłosiłem siedemnaście wykładów, w tym dwa wykłady szkoleniowe na temat diagnostyki wirusów dla pracowników Państwowej Inspekcji Ochrony Roślin i Nasiennictwa (PIORiN), pracowników hodowli ziemniaka i uczelni, cztery wykłady dla pracowników PIORiN w ramach urzędowego szkolenia z oceny bulw i oceny polowej, wykład dla pracowników Oddziału IHAR-PIB w Młochowie w ramach organizowanych w tym oddziale seminariów naukowych, dwa wykłady przybliżające zagranicznym gościom zakres prac badawczych prowadzonych w Oddziale IHAR-PIB w Boninie, wykład

szkoleniowy na Krajowych Dniach Ziemniaka 2018, trzy wykłady dla studentów i pracowników naukowych Plant Pathology Department, Iowa State University (Ames, IA, USA) oraz cztery dla studentów i pracowników naukowych Wydziału Biologii i Ochrony Środowiska UMK w Toruniu. Związki z moją macierzystą uczelnią – UMK w Toruniu - utrzymuję również poprzez współpracę naukową z dr hab. Jarosławem Tyburskim. Efektem tej współpracy jest między innymi moje zaangażowanie w przewodzie doktorskim Pani mgr Katarzyny Kurnik (obecnie Krzyżyńskiej), która realizuje pracę pt.: „Biomasa odpadowa pochodzenia roślinnego jako źródło peroksydaz na potrzeby bioremediacji ścieków odpadowych skażonych związkami fenolowymi”. Zgodnie z uchwałą nr 32/2014 Rady Wydziału Biologii i Ochrony Środowiska UMK w Toruniu pełnię w tym przewodzie funkcję promotora pomocniczego.

Prowadzone po doktoracie badania wykonywałem w ramach ośmiu projektów badawczych. Obejmowały one grant kierowany przez prof. Wyatta Allena Millera, finansowany przez National Institute of Health (NIH). Byłem wykonawcą tego projektu podczas obu pobytów w USA. Byłem również wykonawcą w grantie finansowanym przez NCN i kierowanym przez dr inż. Agnieszkę Przewodowską. Obecnie jestem wykonawcą i kierownikiem tematu badawczego wchodzącego w skład projektu kierowanego przez dr inż. Dominikę Boguszewską-Mańkowską, który jest finansowany przez MRiRW z programu Postęp Biologiczny w Produkcji Roślinnej (PBwPR). Kierowałem jednym projektem finansowanym przez Komitet Badań Naukowych (KBN) i dwoma projektami PBwPR. Obecnie jestem kierownikiem grantu finansowanego przez NCN oraz projektu badawczego finansowanego przez MRiRW z PBwPR.

Wykonałem dwanaście odpłatnych ekspertyz dla przedsiębiorstw, policji i rolników indywidualnych. Dziewięć dotyczyło identyfikacji odmian ziemniaka za pomocą markerów białkowych i molekularnych, dwie identyfikacji patogennych dla ziemniaka bakterii i wirusów metodami molekularnymi i jedna określenia skuteczności komercyjnych zestawów ELISA do wykrywania w krwi ludzkiej przeciwciał specyficznych wobec alergenów obecnych w żywności.

Moja znajomość zagadnień związanych z biologią molekularną i biochemią interakcji wirusów z roślinami oraz z diagnostyką immunologiczną i molekularną patogenów roślin została doceniona przez redakcje czasopism naukowych, dla których wykonałem dwadzieścia jeden recenzji manuskryptów. Obejmowały one dwanaście recenzji, które wykonałem dla czasopism posiadających współczynnik wpływu IF. Za jakość trzech recenzji wykonanych dla czasopisma *Journal of Virological Methods* zostałem w bieżącym roku uhonorowany dyplomem „Certificate of outstanding contribution in reviewing” przez redakcję tego czasopisma. W tym roku zostałem również członkiem komitetu redakcyjnego kwartalnika *Progress in Plant Protection*, w którym pełnię funkcję redaktora działu *Virology and Bacteriology*.

Dane liczbowe omówionych wyżej dokonań zestawilem poniżej w tabelach 1 i 2.

Tabela 1. Liczbowe zestawienie dorobku przed i po uzyskaniu stopnia doktora.

WYSZCZEGÓLNIENIE	Liczba		
	Przed doktoratem	Po doktoracie	Razem
Oryginalne publikacje naukowe w czasopismach (łącznie z publikacjami tworzącymi osiągnięcie)			
posiadających współczynnik wpływu IF, wyróżnionych w JCR (lista A MNiSW)	0	12	12
nie posiadających współczynnik wpływu IF (lista B MNiSW)	2	13	15
Prace przeglądowe w czasopismach:			
posiadających współczynnik wpływu IF, wyróżnionych w JCR (lista A MNiSW)	0	1	1
nie posiadających współczynnik wpływu IF (lista B MNiSW)	0	6	6
Zbiorowe opracowania pokonferencyjne	3	0	3
Materiały szkoleniowe	3	0	3
RAZEM	8	32	40
Punkty za publikacje wg MNiSW	4	402	406
Sumaryczny współczynnik wpływu IF publikacji wg JCR		35,422	
Liczba cytowań wg WoS (bez autocytowań)		213	
Indeks Hirsha wg bazy WoS		7	
Prace badawcze prezentowane na konferencjach krajowych i zagranicznych			
Wygłoszone referaty	5	15	20
Współautor referatu	8	15	23
Autor/współautor posteru	8	49	57
RAZEM	21	79	100
Wykłady dydaktyczne	1	17	18
Udział w projektach badawczych (jako kierownik i/lub wykonawca) finansowanych ze środków			
zagranicznych	0	1	1
MNiSW (KBN, NCN)	1	3	4
MRiRW (PBwPR)	0	4	4
RAZEM	1	8	9
Wykonane ekspertyzy	0	12	12
Wykonane recenzje dla czasopism			
posiadających współczynnik wpływu IF, wyróżnionych w JCR (lista A MNiSW)	0	12	12
nie posiadających współczynnik wpływu IF (lista B MNiSW)	0	9	9
RAZEM	0	21	21

Tabela 2. Punktacja opublikowanych prac.

Lp	Nazwa czasopisma	IF	Punkty MNiSW
OSIĄGNIĘCIE			
1	American Journal of Potato Research	1,204	25
2	American Journal of Potato Research	1,159	25
3	Plant Breeding and Seed Science	-	11
4	Archives of Virology	2,160	20
SUMA		4,523	81
Posiadające współczynnik wpływu IF (Lista A MNiSW)			
5	Journal of Food Biochemistry	1,552	20
6	Waste and Biomass Valorization	1,874	20
7	American Journal of Potato Research	1,156	25
8	Water Air And Soil Pollution	1,551	25
9	Nucleic Acid Research	8,808	40
10	BMC Biotechnology	2,165	30
11	Journal of Biological Chemistry	5,328	24
12	RNA	5,018	24
13	Biochemical Society Transactions	3,447	30
Nie posiadające współczynnika wpływu IF (Lista B MNiSW)			
14	Plant Breeding and Seed Science	-	11
15	Plant Breeding and Seed Science	-	11
16	Plant Breeding and Seed Science	-	4
17	Ziemniak Polski	-	5
18	Ziemniak Polski	-	5
19	Ziemniak Polski	-	5
20	Ziemniak Polski	-	5
21	Ziemniak Polski	-	5
22	Ziemniak Polski	-	0
23	Ziemniak Polski	-	0
24	Ziemniak Polski	-	2
25	Ziemniak Polski	-	2
26	Prog. Plant Prot./Post. Ochr. Roślin	-	6
27	Prog. Plant Prot./Post. Ochr. Roślin	-	4
28	Prog. Plant Prot./Post. Ochr. Roślin	-	4
29	Prog. Plant Prot./Post. Ochr. Roślin	-	4
30	Prog. Plant Prot./Post. Ochr. Roślin	-	4
31	Biuletyn Instytutu Hodowli i Aklimatyzacji Roślin	-	4
32	Biuletyn Instytutu Hodowli i Aklimatyzacji Roślin	-	2
SUMA IF i PUNKTÓW DLA WSZYSTKICH PUBLIKACJI		35,422	402



Podpis Wnioskodawcy