



Urząd Patentowy
Rzeczypospolitej Polskiej

(21) Numer zgłoszenia: **431988**

(51) Int.Cl.
C12Q 1/6895 (2018.01)

(22) Data zgłoszenia: **28.11.2019**

(54) **Startery oligonukleotydowe oraz sondy molekularne do jednoczesnego wykrywania fitopatogenicznych grzybów Botrytis sp., Colletotrichum sp., Verticillium sp. oraz sposób ich wykrywania**

(43) Zgłoszenie ogłoszono:

31.05.2021 BUP 11/21

(45) O udzieleniu patentu ogłoszono:

08.11.2021 WUP 32/21

(73) Uprawniony z patentu:

**INSTYTUT AGROFIZYKI
IM. BOHDANA DOBRZAŃSKIEGO POLSKIEJ
AKADEMII NAUK, Lublin, PL**

(72) Twórca(y) wynalazku:

**JACEK PANEK, Lublin, PL
MAGDALENA FRĄC, Markuszów, PL
DOMINIKA MALARCZYK, Lublin, PL**

(74) Pełnomocnik:

rzecz. pat. Magdalena Tarała

Opis wynalazku

Przedmiotem wynalazku są startery oligonukleotydowe oraz sondy molekularne do jednoczesnego wykrywania patogenów grzybowych należących do rodzajów *Botrytis*, *Colletotrichum* i *Verticillium* z zastosowaniem reakcji łańcuchowej polimerazy z detekcją w czasie rzeczywistym (qPCR), a także sposób wykrywania obecności tych patogenów.

Grzyby z rodzaju *Botrytis*, *Colletotrichum* i *Verticillium* należą do fitopatogenów o zasięgu światowym i mogą infekować wiele gatunków roślin, w tym wiele ważnych rolniczo i cennych ekonomicznie upraw, do których zaliczyć należy również plantacje owoców miękkich, w tym truskawek. Grzyby te niszczą roślinę, prowadząc do poważnych strat w plonach i powodują obniżenie jakości wielu upraw, a zwłaszcza owoców (Williamson B., Tudzynski B., Tudzynski P., Van Kan J., 2007. *Botrytis cinerea: the cause of grey mould disease. Molecular Plant Pathology*, 8, 561–580; Howard C. M., Maas J. L., Chandler C. K., Afbregts E. E., 1992. *Anthraco-nose of strawberry caused by the Colletotrichum complex in Florida. Plant Disease*, 76, 976–981; Klosterman S. J., Atallah Z. K., Vallad G. E., Subbarao K. V., 2009. *Diversity, pathogenicity, and management of Verticillium species. Annual Review Phytopathology*, 47, 39–62).

Opisano wiele metod detekcji grzybów z rodzaju *Botrytis*, *Colletotrichum* i *Verticillium*, jednakże pomimo ogromnych wysiłków nie istnieje niezawodna metoda pozwalająca na wykrycie tych patogenów w próbkach środowiskowych, a ponadto nie opracowano dotychczas metody jednoczesnej detekcji tych patogenów w próbkach środowiskowych, dlatego opracowana nowa metoda, zwalidowana na wielu rodzajach próbek środowiskowych jest odpowiedzią na zapotrzebowanie rolników, przetwórców i laboratoriów diagnostycznych. Wykrycie grzybów *Botrytis* sp., *Colletotrichum* sp. i *Verticillium* sp. na wczesnych etapach zakażenia oraz w glebie lub w materiale roślinnym przed założeniem plantacji jest bardzo istotne dla utrzymania wydajności i jakości owoców, a także dla kontroli rozprzestrzeniania się patogenów (Mararczyk D., Panek J., Frąc M., 2019. *Alternative Molecular-Based Diagnostic Methods of Plant Pathogenic Fungi Affecting Berry Crops-A Review. Molecules*, 24, 1200, doi: 10.3390/molecules).

Do metod najczęściej wykorzystywanych w detekcji grzybów z rodzaju *Botrytis*, *Colletotrichum* i *Verticillium* należą tradycyjne metody diagnostyczne oparte o metody płytkowe, które są długotrwałe i czasochłonne (Termorshuizen A. J., Davis J. R., Gort G., Harris D. C., Huisman O. C., Lazarovits G., Locke T., Melero Vara J. M., Mol L., Paplomatas E. J., Platt H. W., Powelson M., Rouse D. I., Rowe R. C., Tsror L., 1998. *Interlaboratory comparison of methods to quantify microsclerotia of Verticillium dahliae in soil. Applied and Environmental Microbiology* 64, 3846–3853), oraz metody oparte na immunodetekcji (Heppner C., Heitefuss R., 1997. *Development of an enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA) for Verticillium dahliae detection in soil. In: Dehne HW, Adam G., Diekmann M., Frahm J., Mauler-Machnik A. and van Halteren P (eds) Diagnosis and Identification of Plant Pathogens. Proceedings of the 4th International Symposium of the European Foundation for Plant Pathology, Bonn, Germany, Kluwer Academic Publishers, Dordrecht, 9–12 September 1996, 105–108; Obanor F. O., Walter M., Waipara N. W., Cernusko R., 2002. *Rapid method for the detection and quantification of Botrytis cinerea in plant tissues. New Zealand Plant Protection* 55, 150–153). Wśród metod molekularnych opracowanych do diagnostyki grzybów z wymienionych rodzajów należą te oparte o konwencjonalną łańcuchową reakcję polimerazy (PCR) (Inderbitzin P., Davis R. M., Bostock R. M., Subbarao K. V., 2013. *Identification and Differentiation of Verticillium Species and V. longisporum Lineages by Simplex and Multiplex PCR Assays. PLoS ONE* 8, 6, e65990. doi: 10.1371/journal.pone.0065990), ilościową łańcuchową reakcją polimerazy (qPCR) (Maurer K. A., Radišek S., Berg G., Seefelder S., 2013. *Real-time PCR assay to detect Verticillium albo-atrum and V. dahliae in hops: development and comparison with a standard PCR method. Journal of Plant Diseases and Protection*, 120, 3, 105–114; Tapia-Tussell R, Qujano-Ramayo A., Cortes-Velazquez A., Lappe P., Lar que-Saavedra A., Perez-Brito D., 2008. *PCR-Based Detection and Characterization of the Fungal Pathogens Colletotrichum gloeosporioides and Colletotrichum capsici Causing Anthracnose in Papaya (Carica papaya L.) in the Yucatan Peninsula. Molecular Biotechnology*, 40, 3, 293–298), oraz metody izotermicznej amplifikacji wykorzystującej zapętlenie (LAMP) (Aslani S., Garoosi G., Jafary H., 2017. *Using a Loop-Mediated Isothermal Amplification (LAMP) Assay and Direct DNA Extraction Method from Wood for Rapid Detection of Verticillium dahliae in Olive Trees. Biosciences Biotechnology Research Asia*, 14, 2, DOI : <http://dx.doi.org/10.13005/hhra/2501>; Duan Y. B., Ge C. Y., Zhang X. K., Wang J. X., Zhou M. G., 2014. *Development and Evaluation of a Novel and Rapid Detection Assay for Botrytis cinerea Based on Loop-Mediated Isothermal Amplification. PlosONE*, 9, 10, e11109). Jednakże wymienione dostępne w literaturze metody umożliwiające*

identyfikację grzybów z rodzaju *Botrytis*, *Colletotrichum* i *Verticillium* oparte są o inne markery lub startery i charakteryzują się zmienną specyficznością i czułością. Ponadto, testy detekcji wymienionych grzybów opracowywane są najczęściej dla czystych kultur bez oceny ich przydatności do detekcji na próbkach środowiskowych, w których występują inne grzyby towarzyszące uprawom roślin w danej lokalizacji lub kontaminowanych różnymi patogenami, albo sprawdzane są na pojedynczych specyficznych matrycach środowiskowych. Należy również dodać, że dostępne w literaturze metody nie umożliwiają jednoczesnej detekcji tych patogenów w jednej reakcji, podczas tego samego badania.

Startery oraz sondy zostały zaprojektowane w oparciu o sekwencje genu kodującego region D2 dużej podjednostki rybosomalnego RNA, uzyskane z izolatów grzybów należących do rodzajów *Botrytis*, *Colletotrichum* i *Verticillium* pochodzących z części nadziemnych roślin, owoców i korzeni truskawki oraz z gleby spod upraw truskawek.

Istotę wynalazku stanowią startery oligonukleotydowe oraz sondy molekularne do wykrywania patogenów grzybowych należących do rodzaju *Botrytis*, *Colletotrichum* i *Verticillium* o sekwencjach od nr 1 do nr 5, jak przedstawiono na liście sekwencji.

Istotą sposobu wykrywania patogenów grzybowych należących do rodzaju *Botrytis*, *Colletotrichum* i *Verticillium* jest zastosowanie w reakcji qPCR pary starterów oligonukleotydowych o sekwencjach nr 1, 2 oraz sond molekularnych o sekwencjach od nr 3 do nr 5. Jak przedstawiono na liście sekwencji, w wyniku której dochodzi do amplifikacji określonego fragmentu DNA, po czym dokonuje się specyficznej detekcji otrzymanego produktu amplifikacji poprzez odczyt fluorescencji o długości fali 520 nm, 576 nm i 667 nm, po wzbudzeniu światłem o długości fali 495 nm, 544 nm i 643 nm.

Zastosowanie wymienionych starterów oligonukleotydowych oraz sond molekularnych do przeprowadzenia reakcji łańcuchowej polimerazy z detekcją w czasie rzeczywistym, przebiegającej w ściśle określonych warunkach według wynalazku, umożliwi amplifikację produktu o długości 320, 321 i 322 par zasad, odpowiednio dla detekcji grzybów z rodzaju *Botrytis*, *Colletotrichum* i *Verticillium*. Podstawową zaletą opracowanego systemu detekcji jest możliwość jednoczesnej detekcji trzech różnych, często występujących wspólnie patogenów lub wykrycia jednego z tych patogenów, jeśli inne nie występują w danej próbce. Przewagą jednoczesnej detekcji różnych patogenów jest również znaczna oszczędność kosztów związanych z odczynnikami, które byłyby wykorzystywane w trzech oddzielnych reakcjach. Korzyścią opracowanej metody jest również fakt, że została ona zwalidowana nie tylko na czystych kulturach grzybów, ale również na próbkach środowiskowych, w szczególności glebie oraz fragmentach roślin, korzeniach i owocach truskawki, w których stwierdzono obecność grzybów patogennych z rodzaju *Botrytis*, *Colletotrichum* i *Verticillium*.

Wynalazek jest bliżej pokazany w przykładzie wykonania i zamieszczonym poniżej rysunku, na którym:

- Fig. 1 przedstawia sekwencje nukleotydowe fragmentów DNA amplifikowanych w reakcji qPCR przeprowadzonej z zastosowaniem oligonukleotydów o sekwencjach nr 1 i 2;
- Fig. 2 przedstawia wykresy wzrostu fluorescencji w wyniku amplifikacji materiału genetycznego *Botrytis* sp., *Colletotrichum* sp. i *Verticillium* sp. w obecności starterów o sekwencjach nr 1 i 2 oraz sond molekularnych o sekwencjach od nr 3 do nr 5.

Materiał biologiczny wykorzystywany w procesie detekcji stanowi gleba, korzenie, fragmenty roślin, owoce, fragmenty grzybní lub zarodniki mikroorganizmów. DNA uzyskane w wyniku przeprowadzenia procedury izolacji stosowane jest jako matryca do amplifikacji. Reakcję qPCR przeprowadza się w mieszaninie reakcyjnej o następującym składzie: woda dejonizowana wolna od nukleaz, master mix do reakcji qPCR zawierający w składzie polimerazę *Taq* DNA typu HotStart, kofaktor enzymu – jony Mg^{2+} , dNTP oraz bufor, matrycowe DNA oraz parę oligonukleotydowych starterów (0,3 μM) o sekwencjach nr 1 i 2, sondy molekularne o sekwencji nr 3 (0,15 μM), o sekwencji nr 4 (0,15 μM) oraz o sekwencji nr 5 (0,15 μM) i termolabilną uracyl-N-glikozylazę (0,01 U/ μl). Amplifikację przeprowadza się z zastosowaniem następującego profilu termicznego: UNG – 37°C przez 2 minuty, wstępna denaturacja, dezaktywacja UNG i aktywacja polimerazy *Taq* DNA: 95°C przez 12 minut, następnie 40 cykli: denaturacja – 95°C przez 5 sekund, przyłączanie starterów, elongacja i odczyt fluorescencji – 60°C przez 2 minuty lub innego profilu termicznego umożliwiającego uzyskanie powielania DNA i detekcji z oligonukleotydami stanowiącymi przedmiot tego wynalazku. Sekwencja zamplifikowanych fragmentów DNA przedstawiona jest na Fig. 1.

Obecność oczekiwanych produktów o długości 320, 321 i 322 par zasad potwierdza się poprzez zastosowanie dowolnego termocyklera typu real-time PCR umożliwiającego wzbudzenie mieszaniny

reakcyjnej światłem o długości fali 495 nm, 544 nm i 643 nm i odczyt fluorescencji o długości fali 520 nm, 576 nm i 667 nm.

Sposób stwierdzania obecności materiału genetycznego patogenów grzybowych należących do rodzajów *Botrytis*, *Colletotrichum* i *Verticillium* w badanej próbce według wynalazku ilustruje zamieszczony poniżej przykład.

A. Izolacja DNA z fragmentów roślin, korzeni i owoców truskawki, grzybni oraz gleby

Izolację DNA przeprowadzono w wykorzystaniu komercyjnego zestawu do izolacji DNA z próbek środowiskowych (FastDNA Spin Kit for Faeces – MP Biomedicals).

250 mg tkanki roślinnej/grzybowej lub 500 mg gleby wprowadzano do probówek o pojemności 2 ml, zawierających matrycę złożoną z kulek ceramicznych o średnicy 1,4 mm, kulek krzemionkowych o średnicy 0,1 mm oraz 1 kulki szklanej o średnicy 4 mm. Próby następnie płukano w buforze fosforanowo-sodowym (825 μ l) z odczynnikiem PLS (275 μ l). Następnie wirowano (5 minut, 14 000 x g) i zlewano supernatant. Dodano bufor fosforanowo-sodowy (978 μ l) i bufor MT (122 μ l), po czym próbki homogenizowano w aparacie FastPrep24 w warunkach: 40 s, 6 m/s. Próbkę następnie wirowano (15 minut, 14 000 x g), a supernatant przenoszono do nowych probówek zawierających bufor PPS (250 μ l). Próbkę mieszało poprzez odwracanie i inkubowano (10 minut w temperaturze 4°C). Mieszaninę wirowano (2 minuty, 14 000 x g), a następnie supernatant przenoszono do nowej probówki o pojemności 5 ml, zawierającej odczynnik Binding Matrix Solution (1 ml). Próbkę następnie mieszało na rotatorze (5 minut), wirowano (2 minuty, 14 000 x g) i zlewano supernatant. Osad płukano buforem płuczającym (Wash Buffer #1, 1 ml). Otrzymaną zawiesinę dwukrotnie przenoszono na kolumnę separacyjną (SPIN Filter), wirowano (1 minutę, 14 000 x g) i wylewano przesącz. Filtr następnie płukano drugim buforem płuczającym (Wash Buffer #2, 500 μ l), wirowano (2 minuty, 14 000 x g) i wylewano przesącz. Filtr ponownie wirowano (2 minuty, 14 000 x g) a następnie przenoszono filtr do nowej probówki. Na filtr nanoszono bufor elucyjny (TES, 100 μ l) i wirowano (2 minuty, 14 000 x g). Uzyskany przesącz, zawierający wyekstrahowane DNA, rozcieńczano 10-krotnie wodą dejonizowaną wolną od nukleaz.

B. Przygotowanie próbek do amplifikacji

DNA wyizolowane według powyższej procedury wykorzystano jako matrycę dla reakcji qPCR. Do probówki o pojemności 0,1 ml dodano 4 μ l wyizolowanego DNA.

Reakcje przeprowadzono w termocyklerze 7500 FAST (AppliedBiosystems) w objętości 20 μ l mieszaniny reakcyjnej zawierającej: wodę dejonizowaną wolną od nukleaz, master mix MP qPCR Master Mix (2x) (EURx), parę oligonukleotydowych starterów (0,3 μ M) o sekwencji nr 1 i 2, sondy molekularne o sekwencji nr 3 (0,15 μ M), o sekwencji nr 4 (0,15 μ M) oraz o sekwencji nr 5 (0,15 μ M), termolabilną uracyl-N-glikozylazę (0,1 U/ μ l). Ponadto, ze względu na wykorzystany termocykler, mieszanina reakcyjna zawierała barwnik referencyjny ROX (30 nM). Probówki wprowadzono na blok termocyklera stosując następujący profil termiczny: 37°C przez 2 minuty, 95°C przez 12 minut, następnie 40 cykli: 95°C przez 5 sekund, 60°C przez 2 minuty.

C. Wizualizacja wyników amplifikacji za pomocą detekcji fluorescencji w trakcie trwania reakcji

W trakcie trwania reakcji, po każdym cyklu aparat zbierał dane dotyczące fluorescencji mieszaniny reakcyjnej. Pozytywny wynik reakcji obserwowano jako wystąpienie wzrostu fluorescencji ponad poziom bazowy i pojawienie się krzywej amplifikacji. Uzyskany dla badanego materiału wynik identyfikacji z zastosowaniem oligonukleotydów, sond molekularnych i metody stanowiącej przedmiot wynalazku przedstawia Fig. 2.

LISTA SEKWENCJI

Sekwencja nr 1

D2LSU_F: 5' AGA CCG ATA GCG MAC AAG 3'

Sekwencja nr 2

D2LSU_R: 5' CTT GGT CCG TGT TTC AAG 3'

Sekwencja nr 3

Botrytis6FAM: 6FAM 5' TCAGGGTCTCGTACCCTGTGTACTT 3' BIIQ-1

Sekwencja nr 4

ColletotrichumTamra: Tamra(R)5' TGTGACCAGACTTGCGTCCGGTGAA 3'

BHQ-2

Sekwencja nr 5

VerticilliumCy5: Cy5 5' TGGTTCAACCAGGTCCATGACCT 3' BHQ-2

Zastrzeżenia patentowe

1. Startery oligonukleotydowe oraz sondy molekularne do wykrywania patogenów grzybowych należących do rodzaju *Botrytis*, *Colletotrichum* i *Verticillium* o sekwencjach od nr 1 do nr 5, jak przedstawiono na liście sekwencji.
2. Sposób wykrywania fitopatogenicznych grzybów z rodzaju *Botrytis*, *Colletotrichum* i *Verticillium*, w którym w reakcji qPCR z zastosowaniem pary starterów i sond molekularnych dochodzi do amplifikacji określonych fragmentów DNA, objawiającej się pojawieniem się krzywych amplifikacji, potwierdzając detekcję powstałych produktów, **znamienny tym**, że parę starterów i sondy stanowią startery oligonukleotydowe i sondy molekularne jak określono w zastrz. 1.

Rysunki**Botrytis**

AGACCGATAGGMACAAGTAGAGTGATCGAAAGATGAAAAGCACTTGGGA
AAGAGAGTTAAACAGTACGTGAAATTGTTGAAAGGGAAGCGCTTGCAAT
CAGACTTGCACTTGGTGTTCATCAGGGTCTCGTACCCTGTGTACTTCATCA
AGTTCAGGCCAGCATCAGTTTGTAGTGGTTAGATAAAGGCTTAGAGAATGT
GGCCCTCTTCGGGGGGTGTATAGCTCTAGGTGCAATGTAGCCTACTTGG
ACTGAGGACCGCGCTTCGGCTAGGATGCTGGCGTAATGGTTGTAAGCGA
CCCGTCTTGAAACACGGACCAAG

Colletotrichum

AGACCGATAGCGAACAAGTAGAGTGATCGAAAGATGAAAAGCACTTTGA
AAAGAGGGTTAAACAGCACGTGAAATTGTTAAAAAGGGAAGCGCTTGTG
ACCAGACTTGCGTCCGGTGAATCACCCAGCTCTCGCGGCTGGGGCACTTC
GCCGGCACAGGCCAGCATCAGCTTGCCGTCGGGGACAAAAGCTTCAGGA
ACGTGGCTCCTCTCGGGGAGTGTATAGCCTGTTGCATAATACCCTTCGG
CGGGCTGAGGTACGCGCTCCGCAAGGATGCTGGCGTAATGGTCATCAGC
GACCCGTCTTGAAACACGGACCAAG

Verticillium

AGACCGATAGCGMACAAGTAGAGTGATCGAAAGATGAAAAGTACTTTGA
AAAGAGAGTCAAACAGCACGTGAAATTGTTAAAAGGGAAGCGCTCGCTA
CCAGACGTGGGTTCGGTGGTTCAACCAGGTCCATGACCTGGGGCACTCCG
CCGGCCCAGGCCAGCATCAGCTTTCGTCGGGGGCAAAGGCGTCGGGAA
TGTGGCTCTCCTTCGGGGGAGTGTATAGCCCGTCGCGTCATACCCTTCG
GGGGGCTGAGGTACGCGCTCCGCAAGGATGCTGGCGTAATGGTAGCTAG
TGACCCGTCTTGAAACACGGACCAAG

Fig.1

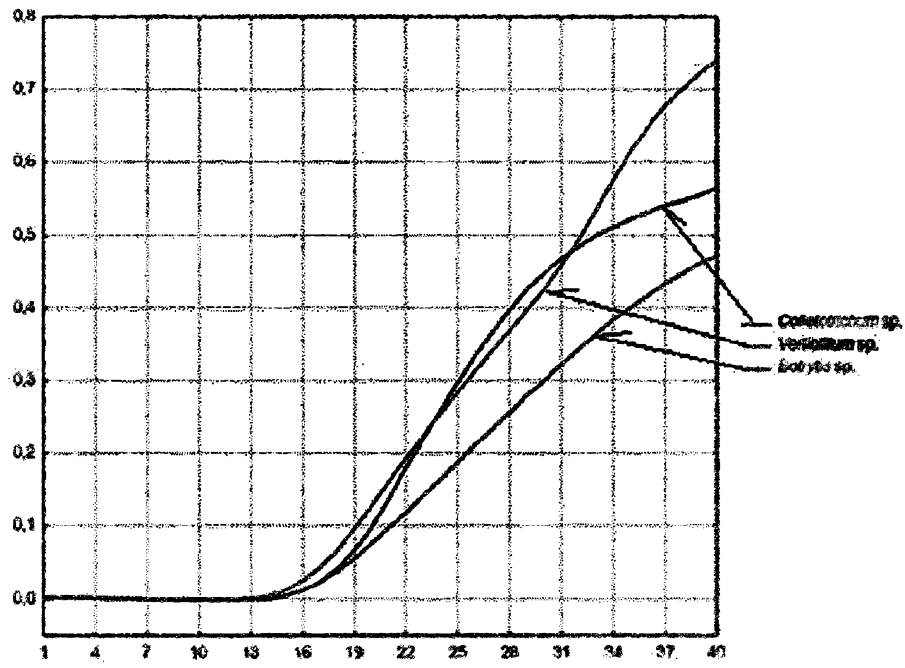


Fig.2