

RZECZPOSPOLITA
POLSKA



Urząd Patentowy
Rzeczypospolitej Polskiej

(12) **OPIS PATENTOWY**

(19) **PL**

(11) **239139**

(13) **B1**

(21) Numer zgłoszenia: **431989**

(51) Int.Cl.

C12Q 1/6895 (2018.01)

(22) Data zgłoszenia: **28.11.2019**

(54) **Startery oligonukleotydowe do wykrywania fitopatogenicznego grzyba
Botrytis cinerea oraz sposób jego 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:

**GIORGIA PERTILE, Lublin, PL
MAGDALENA FRĄC, Markuszów, PL**

(74) Pełnomocnik:

rzecz. pat. Magdalena Tarała

PL 239139 B1

Opis wynalazku

Przedmiotem wynalazku są startery oligonukleotydowe do wykrywania patogenów grzybowych należących do gatunku *Botrytis cinerea* z zastosowaniem reakcji łańcuchowej polimerazy (PCR) lub reakcji łańcuchowej polimerazy z detekcją w czasie rzeczywistym (qPCR), a także sposób wykrywania obecności tych patogenów.

Grzybowe patogeny truskawek mogą powodować duże szkody na poziomie produkcji i przetwarzania owoców, ale także na poziomie szkółek. Jednym z ważniejszych patogenów jest gatunek *Botrytis cinerea*, powodujący szarą pleśń truskawki. Gatunek ten rozprzestrzenia się wśród upraw prowadząc do znacznych szkód na plantacjach truskawek w całej Europie i na świecie (Williamson B., Tudzynski B., Tudzynski P., Van Kan J., 2007. *Botrytis cinerea: the cause of grey mould disease. Molecular Plant Pathology*, 8, 561–580). *Botrytis cinerea* wytwarza różnorodne substancje, powodujące śmierć gospodarza, m.in. podczas penetracji naskórka i powstawania pierwotnych zmian grzyb ten wyzwała w roślinie szereg reakcji oksydacyjnych, gromadzenie się wolnych rodników i śmierć nadwrażliwych komórek roślinnych, co powoduje ogromne straty plonów i/lub obniżenie ich jakości (Lynne Boddy, 2016. *Pathogens of Autotrophs. In. The Fungi, Eds. Watkinson S.C., Boddy L., Money N.P., Chapter 8, 245–292*). Szarą pleśń można częściowo kontrolować za pomocą różnych fungicydów, a biologiczna kontrola grzybów *B. cinerea* przy użyciu antagonistycznych mikroorganizmów ma potencjał na przyszłość. Ważnym środkiem kontrolnym jest usunięcie zainfekowanego materiału roślinnego i zmniejszenie wilgotności podczas przechowywania owoców oraz zmniejszenie wilgotności w szklarniach (Hua L., Yong C., Zhanquan Z., Boqiang L., Guozheng O., Shiping T, 2018. *Pathogenic mechanisms and control strategies of Botrytis cinerea causing post-harvest Decay in fruits and vegetables. Food Quality and Safety*, 3, 111–119). Jednakże, żeby prawidłowo stosować działania zmierzające do eliminacji tych patogenów, a zwłaszcza w celu trafnego doboru środków ochrony roślin istnieje konieczność rozwijania nowych, coraz bardziej precyzyjnych, dokładnych, specyficznych i czułych metod detekcji grzybów należących do gatunku *B. cinerea*.

Wykrycie grzybów *Botrytis cinerea* na wczesnych etapach zakażenia jest bardzo istotne dla utrzymania wydajności i jakości owoców, a także dla kontroli rozprzestrzeniania się patogenów (Mararczyk D., Panek Frąć 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 *Botrytis cinerea* należą metody oparte o łańcuchową reakcję polimerazy (PCR) (Rigotti S., Gindro K., Richter H., Viret O., 2002. *Characterization of molecular markers for specific and sensitive detection of Botrytis cinerea Pers.: Fr. in strawberry (Fragaria x ananassa Duch.) using PCR. FEMS Microbiology Letters*, 209, 169–174), ilościową łańcuchową reakcję polimerazy (qPCR), w której wykorzystywany jest najczęściej region ITS (Ammour MS, Fedele G, Morcia C, et al (2019) *Quantification of Botrytis cinerea in grapevine bunch trash by Real-Time PCR. Phytopathology* 109:1312–1319; Diguta CF, Rousseaux S, Weidmann S, et al (2010) *Development of a qPCR assay for specific quantification of Botrytis cinerea on grapes. FEMS Microbiol Lett* 313:81–87) oraz metody izotermicznej amplifikacji wykorzystującej zapętlenie (LAMP) (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. PLoS ONE*, 9, 10, el 1109). Jednakże wymienione dostępne w literaturze metody umożliwiające identyfikację grzybów należących do gatunku *Botrytis cinerea* 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 szerokiej gamie próbek środowiskowych, w których występują inne grzyby towarzyszące uprawom roślin w danej lokalizacji lub kontaminowanych różnymi patogenami, albo sprawdzane są na pojedynczych rodzajach próbek środowiskowych.

Sposób identyfikacji patogenu grzybowego *Botrytis cinerea* w badanej próbce opiera się według wynalazku na amplifikacji sekwencji DNA przy użyciu zaprojektowanej pary specyficznych gatunkowo oligonukleotydów, a następnie detekcji otrzymanego produktu reakcji PCR lub qPCR, w przypadku kiedy w próbce środowiskowej obecne jest DNA tego mikroorganizmu. Startery zostały zaprojektowane w oparciu o sekwencje genu kodującego dehydrogenazę 3-fosforanu gliceraldehydu (GAPDH). Istotę wynalazku stanowią startery oligonukleotydowe do wykrywania patogenów grzybowych należących do gatunku *Botrytis cinerea* o sekwencjach nr 1 i 2, jak przedstawiono na liście sekwencji.

Istotą sposobu wykrywania patogenów grzybowych należących do gatunku *Botrytis cinerea* jest zastosowanie w reakcji PCR lub qPCR, pary starterów oligonukleotydowych o sekwencjach nr 1 i 2, jak przedstawiono na liście sekwencji, w wyniku której dochodzi do amplifikacji określonego fragmentu DNA, po czym dokonuje się specyficznej detekcji otrzymanego produktu amplifikacji poprzez rozdział elektrofor etyczny (dla reakcji PCR) lub odczyt fluorescencji (dla reakcji qPCR).

Zastosowanie wymienionych starterów oligonukleotydowych do przeprowadzenia reakcji łańcuchowej polimerazy, przebiegającej w ściśle określonych warunkach według wynalazku, umożliwia amplifikację produktu o długości 406 par zasad. Podstawową zaletą opracowanego systemu detekcji jest fakt, że został on zwalidowany 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 grzyba patogenicznego z gatunku *Botrytis cinerea*.

Wynalazek ilustruje przykład wykonania oraz zamieszczony poniżej rysunek, na którym:

- Fig. 1 przedstawia sekwencję nukleotydową fragmentu DNA amplifikowanego w reakcji PCR przeprowadzonej z zastosowaniem oligonukleotydów o sekwencjach nr 1 i 2;
- Fig. 2 przedstawia wyniki analizy specyficzności zaprojektowanych oligonukleotydów w rozdziale elektroforetycznym produktów amplifikacji przeprowadzonej w obecności starterów o sekwencjach nr 1 i 2 dla pojedynczych próbek DNA izolowanych z grzybni patogenów *Botrytis cinerea* (ścieżka 3 i 6 – widoczny prążek), *Colletotrichum* sp. (ścieżka 2), *Verticillium* sp. (ścieżka 4), *Phytophthora* sp. (ścieżka 5), kontrola negatywna (ścieżka 7), Marker wielkości DNA, 100–1000 pz (ścieżka 1).

Materiał biologiczny wykorzystywany w procesie detekcji stanowi gleba, fragmenty roślin, korzenie, owoce, fragmenty grzybni lub zarodniki mikroorganizmu. DNA uzyskane w wyniku przeprowadzenia procedury izolacji stosowane jest jako matryca do amplifikacji. Reakcję PCR przeprowadza się w mieszaninie reakcyjnej o następującym składzie: woda dejonizowana wolna od nukleaz, master mix do reakcji PCR zawierający w składzie polimerazę *Taq* DNA, kofaktor enzymu – jony Mg^{2+} , dNTP oraz bufor, matrycowe DNA oraz parę oligonukleotydowych starterów (0,5 μ M) o sekwencjach nr 1 i 2. W reakcji qPCR dodatkowo stosuje się SYBR Green. Amplifikację przeprowadza się z zastosowaniem następującego profilu termicznego: wstępna denaturacja: 94°C przez 3 minuty, następnie 35 cykli: denaturacja – 94°C przez 15 sekund, przyłączanie starterów – 50°C przez 30 sekund, elongacja – 72°C przez 45 sekund, oraz ostatni etap reakcji – końcowa elongacja – 72°C przez 10 minut lub innego profilu termicznego umożliwiającego uzyskanie powielania DNA i detekcji z oligonukleotydami stanowiącymi przedmiot tego wynalazku. Sekwencja zamplifikowanego fragmentu DNA przedstawiona jest na Fig. 1.

Obecność oczekiwanego produktu o długości 406 par zasad potwierdza się poprzez zastosowanie dowolnej metody rozdziału i identyfikacji fragmentów kwasów nukleinowych.

Sposób stwierdzania obecności materiału genetycznego grzyba *Botrytis cinerea* 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 z wykorzystaniem 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. Próbkę 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 próbkę 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). Mieszanie 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 PCR. Do probówki o pojemności 0,1 ml dodano 3 μ l DNA wyizolowanego z czystych szczepów (grzybni lub zarodników) lub 4 μ l DNA wyizolowanego z próbek środowiskowych. Reakcje przeprowadzono w termocyklerze 9901 Veriti 96 well Fast Thermal Cycler (AppliedBiosystems) w objętości 10 μ l mieszaniny reakcyjnej zawierającej: wodę dejonizowaną wolną od nukleaz, master mix REDTaq mix (X2) (Sigma-Aldrich), parę oligonukleotydowych starterów (0,5 μ M) o sekwencjach nr 1 i 2. Probówki wprowadzono na blok termocyklera stosując następujące profile termiczne dla DNA matrycowego wyizolowanego z czystych szczepów: 94°C przez 3 minuty, następnie 35 cykli: 94°C przez 15 sekund, 50°C przez 30 sekund, 72°C przez 45 sekund, a następnie 72°C przez 10 minut, dla DNA matrycowego wyizolowanego z próbek środowiskowych: 94°C przez 3 minuty, następnie 45 cykli: 94°C przez 15 sekund, 52°C przez 30 sekund, 72°C przez 45 sekund, a następnie 72°C przez 10 minut.

C. Wizualizacja wyników amplifikacji za pomocą elektroforezy agarozowej

Produkty reakcji PCR rozdzielano na 2% żelu agarozowym w obecności 0,01% barwnika do wizualizacji DNA SimplySafe (EURx) w buforze TAE, przy napięciu 120 V, w czasie 60 minut. Otrzymane wzory rozdziałów obserwowano w świetle UV w systemie do wizualizacji i archiwizacji żeli.

Uzyskany dla badanego materiału wynik identyfikacji z zastosowaniem oligonukleotydów i metody stanowiącej przedmiot wynalazku przedstawia Fig. 1.

LISTA SEKWENCJI

Sekwencja nr 1

Brt_GAPDH_F: 5' TCCTTGCCGATGGATTGGA '3

Sekwencja nr 2

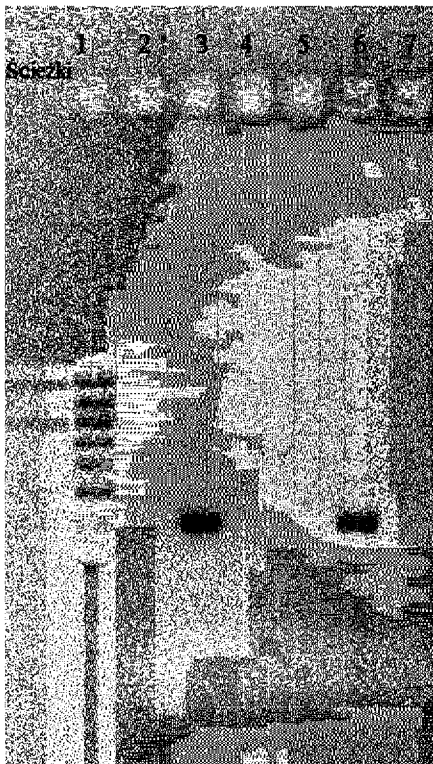
Brt_GAPDH_R: 5' ACGCCAATCCTTAGCGGAT '3

Zastrzeżenia patentowe

1. Startery oligonukleotydowe do wykrywania patogenu grzybowego truskawki *Botrytis cinerea* o sekwencjach nr 1 i 2, jak przedstawiono na liście sekwencji.
2. Sposób wykrywania fitopatogenicznego grzyba *Botrytis cinerea*, w którym w reakcji PCR lub qPCR z zastosowaniem pary starterów dochodzi do amplifikacji określonego fragmentu DNA, po czym dokonuje się detekcji powstałego produktu, **znamienny tym**, że parę starterów stanowią startery oligonukleotydowe jak określono w zastrzeżeniu 1.

Rysunki

TTCCTTGCCGATGGATTGGAGGTCAATGGCAAGAAGGTCAAGTTCTACAC
TGAGAGAGACCCAGCCAACATCCCATGGGCTGAGTCTGAGGCATACTAC
GTCGTCGAGTCCACCGGTGTTTTACCACCACCGAGAAGGCCAAGGCAC
ATTTGAAGGGTGGTGCCAAGAAGGTTGTTATCTCTGCTCCTTCTGCCGAT
GCCCCAATGTACGTTATGGGTGTCAACAACGAGACCTACACTGGTGATGT
TGATGTTATCTCCAACGCCTCTTGCACAACCAACTGCTGGCTCCTCTCGCC
AAGGTCATCAACGATGAGTTCACCATCATTGAAGGTTTGATGACCACCAT
CCACTCCTACACCGCTACCCAAAAGACCGTTGATGGTCCATCCGCTAAGG
ATTGGCGTA

Fig.1**Fig.2**