

RZECZPOSPOLITA
POLSKA



Urząd Patentowy
Rzeczypospolitej Polskiej

(12) **OPIS PATENTOWY** (19) **PL** (11) **239137**

(13) **B1**

(21) Numer zgłoszenia: **431987**

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

(22) Data zgłoszenia: **28.11.2019**

(54) **Startery oligonukleotydowe oraz sonda molekularna do wykrywania fitopatogenicznego grzyba Verticillium sp. 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:

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

(74) Pełnomocnik:

rzecz. pat. Magdalena Tarała

PL 239137 B1

Opis wynalazku

Przedmiotem wynalazku są startery oligonukleotydowe oraz sonda molekularna do wykrywania patogenów grzybowych należących do rodzaju *Verticillium* z zastosowaniem reakcji łańcuchowej polimerazy z detekcją w czasie rzeczywistym (qPCR), a także sposób wykrywania obecności tych patogenów.

Grzyby z rodzaju *Verticillium* należą do ważnych rolniczo organizmów fitopatogenicznych, które powodują wędnięcie roślin, przyczyniając się do strat ekonomicznych wielu upraw, w tym truskawek, w wielu częściach świata. Charakterystyczną cechą tych grzybów jest tworzenie struktur spoczynkowych, zwanych mikrosklerocjami, które mogą przetrwać w glebie nawet kilkanaście lat, a w sprzyjających warunkach i obecności gospodarza roślinnego powodują infekcję i straty w plonach. W związku z tym, detekcja tych grzybów w glebie, a także roślinie jest ważnym elementem monitoringu w celu ograniczania chorób powodowanych przez te fitopatogeny (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 *Verticillium*, jednakże pomimo ogromnych wysiłków nie istnieje niezawodna metoda pozwalająca na wykrycie tego patogenu w próbkach środowiskowych i istnieje konieczność opracowywania nowych metod zwalidowanych na wielu rodzajach próbek środowiskowych, dostosowanych do próbek danego regionu czy typu gleby (Aslam S., Tahir A., Aslam M. F., Alam M. W., Shedayi A. A., Sadia S., 2017. *Recent advances in molecular techniques for the identification of phytopathogenic fungi – a mini review. Journal of Plant Interactions*, 12, 1, 493–504).

Wykrycie grzybów z rodzaju *Verticillium* 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 *Verticillium* należą tradycyjne metody diagnostyczne oparte o metody płytkowe, co jest 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., Tsrer L., 1998. *Interlaboratory comparison of methods to quantify microsclerotia of Verticillium dahliae in soil. Applied and Environmental Microbiology* 64, 3846–3853), czy metody polegające 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*). Wśród metod molekularnych opracowanych do diagnostyki grzybów z rodzaju *Verticillium* 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), 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/bbra/2501>). Jednakże wymienione dostępne w literaturze metody umożliwiające identyfikację grzybów z rodzaju *Verticillium* oparte są o inne markery lub startery i charakteryzują się zmienną specyficznością i czułością. Ponadto, testy detekcji wymienionych grzybów opracowane 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.

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

Istotę wynalazku stanowią startery oligonukleotydowe oraz sonda molekularna do wykrywania patogenów grzybowych należących do rodzaju *Verticillium* o sekwencjach nr 1, 2 i 3, przedstawionych na liście sekwencji.

Istotą sposobu wykrywania patogenów grzybowych należących do rodzaju *Verticillium* jest zastosowanie w reakcji qPCR pary starterów oligonukleotydowych o sekwencjach nr 1 i 2 oraz sondy molekularnej o sekwencji nr 3, w wyniku którego dochodzi do amplifikacji określonego fragmentu DNA, po czym dokonuje się specyficznej detekcji otrzymanego produktu amplifikacji poprzez odczyt fluorescencji o długości fali 667 nm, po wzbudzeniu światłem o długości fali 643 nm.

Zastosowanie wymienionych starterów oligonukleotydowych oraz sondy molekularnej do przeprowadzenia reakcji łańcuchowej polimerazy z detekcją w czasie rzeczywistym, przebiegającej w ściśle określonych warunkach według wynalazku, umożliwia amplifikację produktu o długości 322 par zasad. Podstawową zaletą opracowanego systemu detekcji jest fakt, że został on zwalidowany nie tylko na czystych szczepach grzybów, ale również na próbkach środowiskowych, w szczególności glebie oraz fragmentach roślin, korzeniach i owocach truskawki, w których stwierdzono obecność grzyba patogenicznego z rodzaju *Verticillium*.

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

- Fig. 1 przedstawia sekwencję nukleotydową fragmentu DNA amplifikowanego w reakcji qPCR przeprowadzonej z zastosowaniem oligonukleotydów o sekwencjach nr 1 i 2;
- Fig. 2 przedstawia wykres wzrostu fluorescencji w wyniku amplifikacji materiału genetycznego *Verticillium* sp. w obecności starterów o sekwencjach nr 1 i 2 oraz sondy molekularnej o sekwencji nr 3.

Materiał biologiczny wykorzystywany w procesie detekcji stanowi gleba, korzenie, fragmenty roślin, owoce, fragmenty grzybni lub zarodniki mikroorganizmu. 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 μ M): o sekwencjach nr 1 i 2, sondę molekularną (0,15 μ M) o sekwencji nr 3 i termolabilną uracyl-N-glikozylazę (0,01 U/ μ l). 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 zamplifikowanego fragmentu DNA przedstawiona jest na Fig. 1.

Obecność oczekiwanego produktu o długości 322 par zasad potwierdza się poprzez zastosowanie dowolnego termocyklera typu real-time PCR umożliwiającego wzbudzenie mieszaniny reakcyjnej światłem o długości fali 643 nm i odczyt fluorescencji o długości fali 667 nm.

Sposób stwierdzania obecności materiału genetycznego patogenów grzybowych należących do rodzaju *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. Próbki następnie wirowano (15 minut, 14 000 x g), a supernatant przenoszono do nowych probówek zawierających bufor PPS (250 μ l). Próbki mieszano 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 mieszano 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 µl), 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 µl) 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 µl wyizolowanego DNA. Reakcje przeprowadzono w termocyklerze 7500 FAST (AppliedBiosystems) w objętości 20 µl mieszaniny reakcyjnej zawierającej: wodę dejonizowaną wolną od nukleaz, master mix MP qPCR Master Mix (2x) (EURx), parę oligonukleotydowych starterów (0,3 µM) o sekwencjach nr 1 i 2, sondę molekularną o sekwencji nr 3 (0,15 µM), termolabilną uracyl-N-glikozylazę (0,1 U/µl). 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, sondy molekularnej 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

VerticilliumCy5: Cy5 5' TGGTTCAACCAGGTCCATGACCT 3' BHQ-2

Zastrzeżenia patentowe

1. Startery oligonukleotydowe oraz sonda molekularna do wykrywania patogenów grzybowych należących do rodzaju *Verticillium* o sekwencjach nr 1, 2 i 3.
2. Sposób wykrywania fitopatogenicznego grzyba z rodzaju *Verticillium*, w którym w reakcji qPCR z zastosowaniem pary starterów i sondy molekularnej dochodzi do amplifikacji określonego fragmentu DNA, objawiającej się pojawieniem się krzywej amplifikacji, potwierdzając detekcję powstałego produktu, **znamienny tym**, że parę starterów i sondę stanowią startery oligonukleotydowe i sonda molekularna jak określono w zastrz. 1.

Rysunek

AGACCGATAGCGMACAAGTAGAGTGATCGAAAGATGAAAAGTACTTTGA
 AAAGAGAGTCAAACAGCACGTGAAATTGTTAAAAGGGAAGCGCTCGCTA
 CCAGACGTGGGTTCGGTGGTTCACCAGGTCCATGACCTGGGGCACTCCG
 CCGGCCAGGCCAGCATCAGCTTTCGTCGGGGGCAAAGGCGTCGGGAA
 TGTGGCTCTCCTTCGGGGGAGTGTTATAGCCCGTCGCGTCATACCCTTCG
 GGGGGCTGAGGTACGCGCTCCGCAAGGATGCTGGCGTAATGGTAGCTAG
 TGACCCGTCTTGAAACACGGACCAAG

Fig.1

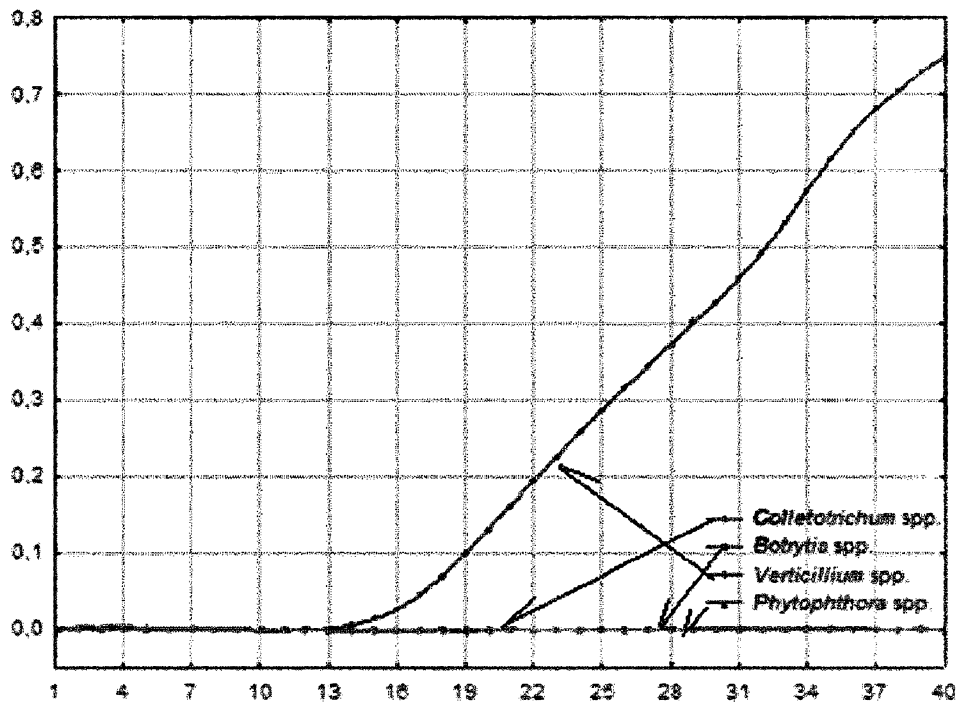


Fig.2