

JUSTYNA A. NOWAKOWSKA, TADEUSZ MALEWSKI, ANNA TEREBA,
MAŁGORZATA BORYS, TOMASZ OSZAKO

Molekularna diagnostyka wybranych patogenów z rodzaju *Phytophthora* w ramach integrowanej ochrony roślin*

Molecular diagnostic of *Phytophthora* pathogens as a tool for Integrated Pest Management

ABSTRACT

Nowakowska J. A., Malewski T., Tereba A., Borys M., Oszako T. 2016. Molekularna diagnostyka wybranych patogenów z rodzaju *Phytophthora* w ramach integrowanej ochrony roślin. Sylwan 160 (5): 365-370.

Traditional detection methods such as baiting or direct isolation take a long time and are incapable to handling large volume of material to be tested. The real-time PCR-based techniques are faster, more sensitive, more easily automated, and do not require post-amplification procedures. Species-specific primers for *Phytophthora* were designed based on the internal transcribed spacer regions (ITS) of rDNA collected from the NCBI DNA database. Primers and probes were designed using the Allele ID 7 at default search criteria. Specific probes were labeled with the reporter dyes JOE (6-carboxy-4,5-dichloro-2,7-dimethoxyfluorescein) at the 5' end and HBQ1 quencher at the 3' end (Sigma-Aldrich). The specificity of primers and fluorogenic probes was tested against genomic DNA of *P. alni* subsp. *multiformis*, *P. lacustris* and *P. taxon hungarica*. The real-time PCR reactions with the specific probes and primers yielded positive results with five concentrations of standards obtained by standard PCR reaction for corresponding *Phytophthora* species. The negative control (lack of DNA pathogens) yielded no amplification products. Standard curves showed a linear correlation between input DNA and cycle threshold (Ct) values with R^2 from 0.994 (*P. alni*) to 0.998 (*P. taxon hungarica*). The amplification efficiency of target DNA varied from 94.6% (*P. alni*) to 100% (*P. taxon hungarica*). The validation of the primers and probes designed for analysed *Phytophthora* species was performed on pure cultures, on soil samples from the forest nursery and declining oak stands. The designed probes displayed the high specificity of the detection of investigated species in pure cultures. The presented new molecular TaqMan probes can fully assist the integrated pest management as a powerful tool for a quick detection of above pathogenic organisms in forest nurseries. The molecular detection of harmful phytophthoras and in consequences diminishing of fungicides use for their control in forestry fully support European Union directives as well as the 'Good plant protection practice measures' elaborated by European and Mediterranean Organisation of Plant Protection.

KEY WORDS

real time PCR, TaqMan, butt and fine root pathogens, *Phytophthora*

*Badania sfinansowano z Grantu Rozwojowego NCBiR NR12-0098-10 „Stosowanie fosforynów jako elicytorów odporności na patogeny korzeni w szkółkach leśnych i drzewostanach” oraz grantu 7PR EU ISEFOR „Increasing Sustainability of European Forests, Modeling for Security Against Invasive Pests and Pathogens under Climate Change”.

ADDRESSES

Justyna A. Nowakowska ⁽¹⁾ – e-mail: J.Nowakowska@ibles.waw.pl

Tadeusz Malewski ⁽²⁾ – e-mail: tmalewski@miiz.waw.pl

Tomasz Oszako ⁽³⁾ – e-mail: T.Oszako@ibles.waw.pl

Anna Tereba ⁽¹⁾, Małgorzata Borys ⁽¹⁾

⁽¹⁾ Laboratorium Biologii Molekularnej, Instytut Badawczy Leśnictwa; Sękocin Stary, ul. Braci Leśnej 3, 05-090 Raszyn

⁽²⁾ Muzeum i Instytut Zoologii PAN; ul. Wilcza 64, 00-679 Warszawa

⁽³⁾ Zamiejscowy Wydział Leśny w Hajnówce, Politechnika Białostocka; ul. Piłsudskiego 8, 17-200 Hajnówka

Wstęp

Tradycyjnie stosowane techniki do wykrywania i identyfikacji gatunków *Phytophthora* za pomocą pułapek roślinnych (takich jak liście czy jabłka) oraz ich bezpośrednia izolacja na selektywne podłoża hodowlane są bardzo pracochłonne. Nowe techniki biologii molekularnej oparte na reakcji łańcuchowej polimerazy (PCR) pozwalają na osiągnięcie większej wydajności w identyfikacji patogenów przy zachowaniu wysokiej precyzji i czułości badań, co stanowi cenne uzupełnienie (potwierdzenie) analiz morfologicznych. Istnieje szereg metod detekcji i identyfikacji gatunków *Phytophthora* opartych o reakcję PCR, np. polimorfizm konformacji pojedynczych nici (SSCP) lub polimorfizm długości fragmentów restrykcyjnych – RFLP [Kong i in. 2004; Martin, Tooley 2004]. Jednak metody te, umożliwiające odczyt migracji elektroforetycznej powielonych fragmentów DNA, cechuje niska wydajność w przypadku konieczności testowania wielu prób jednocześnie.

Inne techniki oparte o reakcje PCR, np. z odczytem wyniku w czasie rzeczywistym (ang. real time PCR) charakteryzują się wyższą specyficnością, czułością i krótszym czasem detekcji niż techniki oparte na samym rozdziale fragmentów DNA za pomocą migracji elektroforetycznej. Podstawą metod real time PCR jest odczyt fluorescencji barwnika, najczęściej SYBR Green, który przyłączany jest w trakcie reakcji do dwuniciowej struktury DNA. Dodatkowo inne barwniki, np. HEX, JOE, TET, NED czy 6FAM, są wbudowane do sond molekularnych i wykazują fluorescencję w momencie przyłączenia się sond do fragmentów DNA [Sambrook, Russell 2001]. Zaletą techniki PCR w czasie rzeczywistym jest możliwość całkowitej automatyzacji reakcji oraz mniejsza podatność na zanieczyszczenie prób dzięki prowadzeniu reakcji w jednej probówce. Dzięki temu techniki real time PCR są obecnie często wykorzystywanym narzędziem do jakościowej i ilościowej detekcji patogenów roślin, w tym z rodzaju *Phytophthora*, m.in.: *P. citricola* Jung and Burgess i *P. quercina* Jung [Scheda i in. 2006], *P. citrophthora* [Ippolito i in. 2004] oraz *P. ramorum* Werres i *P. pseudosyringae* Jung and Nechwatal [Scheda i in. 2006; Tooley i in. 2006].

Celem niniejszych badań było opracowanie szybkiej i niezawodnej metody identyfikacji patogenów *P. alni* subsp. *multiformis* Brasier and Kirk, *P. lacustris* (Pasch. and Rutt.) Javorn i *P. taxon hungarica* Bakonyi w oparciu o technikę real time PCR przy zastosowaniu sond TaqMan jako elementu profilaktyki w integrowanej ochronie roślin.

Materiał i metody

Opracowanie molekularnych sond TaqMan polegało na analizie sekwencji nukleotydowych różnicujących gatunki z rodzaju *Phytophthora* na podstawie ogólnodostępnych baz danych, a następnie ich walidacji w próbkach gleby oraz czystych kultur patogenów *P. alni* subsp. *multiformis*, *P. lacustris* i *P. taxon hungarica* pochodzących z kolekcji IBL.

Sekwencje ITS DNA u *P. lacustris* i *P. taxon hungarica* pobrano z internetowego banku genów NCBI (www.ncbi.org), a *P. alni* subsp. *multiformis* z Q-banku (http://www.q-bank.eu) (tab.). Projektowanie starterów i sond typu TaqMan przeprowadzono w programie Allele ID 7 (PREMIER Biosoft International, Palo Alto, CA, USA) według standardowych wytycznych dla techniki wykorzystującej sondy typu TaqMan [Dorak 2006]. Sondy znakowano za pomocą fluorescencyjnego barwnika JOE (6-carboxy-4,5-dichloro-2,7-dimethoxyfluorescein) na końcu 5' sondy oraz sekwencji „wyciszającej” HBQ1 na końcu 3' (Sigma-Aldrich). Schemat projektu sond przedstawiono na rycinie 1. Specyficzność zaprojektowanych sond oszacowano za pomocą BLASTN, porównując sekwencję zaprojektowanych sond do sekwencji zgromadzonych w GenBank (www.ncbi.org).

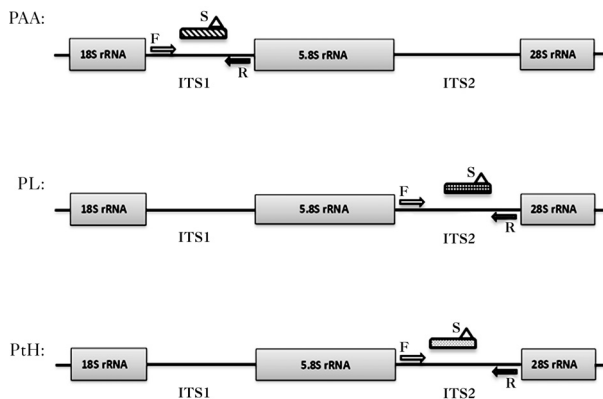
Dodatkowo specyficzność zaprojektowanych sond sprawdzano na DNA wydzielonym z żywych kultur patogenów z rodzaju *Phytophthora* przechowywanych w kolekcji Zakładu Ochrony Lasu (IBL), otrzymanych z próbek gleby z zastosowaniem pułapek roślinnych i hodowanych na selektywnej pożywce ziemniaczanej (PDA) według Junga i in. [1996]. Skuteczność zaprojektowanych sond TaqMan testowano na genomowym DNA wyizolowanym z próbek gleby pobranych spod zamierających sadzonek buka (szkółka leśna Kiejsze, Nadleśnictwo Koło) i dębów (Nadleśnictwo Karczma Borowa, Krotoszyn i Piaski). W tym celu 0,5 g gleby zawieszano w 500 µl buforu SL1 (Macherey-Nagel®) i wytrząsano wraz z kulkami ceramicznymi przez 5 min z prędkością 5000 rpm. Następnie próbki poddawano procedurom według zaleceń Macherey-Nagel® (Duren, Niemcy) za pomocą zestawów NucleoSpin Soil Kit. Końcowy roztwór cząsteczek DNA genomowego przechowywano w objętości 100 µl końcowego buforu SE NucleoSpin Soil Kit w temperaturze -20°C.

Tabela.

Sekwencje zaprojektowanych sond dla badanych izolatów *Phytophthora* sp. wraz z odpowiadającym numerem GenBank/Q-bank oraz liczbą par zasad produktu PCR

Molecular patterns of probes designed for studied *Phytophthora* sp. with the GenBank/Q-bank database numbers and amount of base-pairs in the PCR product

	Numer Number	Starter F (5'-3') Primer F (5'-3')	Starter R (5'-3') Primer R (5'-3')	Sonda (5'-3') Probe (5'-3')	PCR
<i>Phytophthora alni</i> subsp. <i>multiformis</i>	JF300250	ccgtatcaaccacttag	cacagtatgttcagtattcaa	cggcctgctgtcgatatca	177
<i>Phytophthora lacustris</i>	JX271790	tggaggagtggttcgatc	ggttcaaaagccaagcac	acgtgaaccgtttcaaac	123
<i>Phytophthora taxon hungarica</i>	JX274428	ggctgaacaactctgctta	ttccaaaatggatcgac	ccactctactctcgcaaacagca	153



Ryc. 1.

Sekwencje DNA kodujące podjednostki genów rybosomalnych oraz sekwencje ITS różnicujące badane gatunki *Phytophthora*

Sequences coding the rRNA subunits with the ITS regions characteristic for the different *Phytophthora* species

F, R, S – miejsca przyłączenia się do łańcucha DNA poszczególnych patogenów starterów, odpowiednio wiodącego i wstecznego, oraz specyficznych gatunkowo sond TaqMan

F, R, S – forward and reverse primer as well as TaqMan probe (respectively) annealing sites to the DNA of individual pathogens

PAA – *P. alni* subsp. *alni*, PL – *P. lacustris*; PtH – *P. taxon hungarica*

Cząsteczki DNA wyizolowane zarówno z prób gleby, jak i czystych kultur patogenów poddawano amplifikacji w reakcji real time PCR w mieszaninie reakcyjnej zawierającej 2 μ l roztworu DNA-matrycy, 10 μ l 2 \times LuminoCt Master Mix (Sigma-Aldrich), 2 μ l każdego ze starterów (5 μ M) i 0,2 μ l sondy (5 μ M) TaqMan specyficznej dla każdego z gatunków: *P. alni*, *P. lacustris* i *P. taxon hungarica*. Dla każdego gatunku przeprowadzano osobną reakcję real time PCR w następujących warunkach: 3 min wstępnego podgrzania DNA matrycy w 95°C, potem 40 cykli amplifikacji przez 30 s w 95°C, 30 s w 55-61°C i 30 s w 72°C. Odczyt fluorescencji poszczególnych sond przeprowadzono w aparacie RotorGene 6000 (Qiagen), zaś analizę danych za pomocą oprogramowania producenta (Qiagen).

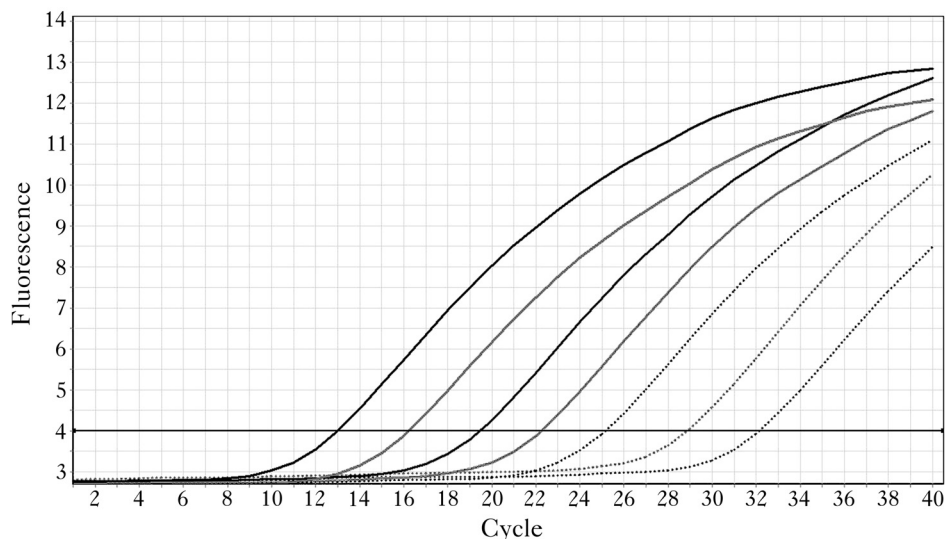
Wyniki

Poszukiwanie w bazie NCBI sekwencji DNA do projektowanej sondy ITS dla *P. alni* wykazało, że sonda jest specyficzna tylko dla podgatunku *multiformis* (PAM). Projektowanie sond do dwóch pozostałych podgatunków – *P. alni* subsp. *alni* (PAA) i *P. alni* subsp. *uniformis* (PAU) – było nieskuteczne. Otrzymane sondy były albo specyficzne tylko do sekwencji, dla której projektowano sondę i nie wykrywały innych sekwencji ITS w GenBank należących do tego samego gatunku, albo były niespecyficzne i wykrywały sekwencje opisane jako należące do innych gatunków. Trudności z odczytem sekwencji w bazie danych NCBI mogą też wynikać ze zmieniającej się wraz z czasem taksonomii badanych patogenów z rodzaju *Phytophthora* – początkowo opisywano gatunek patogena na olszach jako „alder *Phytophthora*”, potem jako *P. alni*, a obecnie został on rozdzielony na 3 podgatunki: PAA, PAM i PAU [Ioos i in. 2006].

Sonda zaprojektowana dla *P. lacustris* wykryła 149 sekwencji w GenBank, z czego 61 opisano jako *P. lacustris*, 50 jako *P. salixsoil*, 6 jako *P. lacustris* \times *riparia*, 12 jako *P. riparia*, 2 jako *P. gonapodyides* Brasier i 18 sekwencji o nieoznaczonym gatunku. Mając na względzie, że nazwa *P. lacustris* Brasier, Cacciola, Nechwatal, Jung & Bakonyi jest formalną taksonomiczną nazwą organizmu poprzednio opisanego jako *P. salixsoil* oraz że jest możliwość istnienia gatunku hybrydowego *P. lacustris* \times *riparia*, należy stwierdzić, że sonda jest specyficzna dla badanego gatunku *P. lacustris*. Brasier i in. [2003] zauważają, że izolaty *P. lacustris* były czasami błędnie identyfikowane jako gatunek.

Sonda zaprojektowana dla *P. taxon hungarica* wykrywa oprócz sekwencji należących do *P. taxon hungarica* w GenBank również inne sekwencje, opisane jako przynależące do gatunku *P. rosacearum* Hansen. Ze względu na to, że organizm ten nie ma jeszcze statusu gatunku, trudno jest określić, czy zaprojektowana sonda jest gatunkowo specyficzna, czy też uwarunkowane jest to zawilnością klasyfikacji gatunków *Phytophthora*.

Analiza obecności patogenów z rodzaju *Phytophthora* za pomocą opracowanych specyficznych sond i starterów w reakcji real time PCR w badanych próbkach gleb nie wykazała obecności gatunków *P. alni sensu lato*, *P. lacustris* i *P. taxon hungarica*. Walidację skuteczności zaprojektowanych sond przeprowadzono jedynie w czystych kulturach tych gatunków, dla których zaobserwowano charakterystyczny obraz amplifikacji, co zilustrowano na przykładzie *P. lacustris* dla różnych stężeń DNA matrycy (ryc. 2). Krzywe amplifikacji potwierdziły skuteczność opracowanych sond, a mianowicie krzywa standardowa dla *P. alni* subsp. *multiformis* miała $R^2=0,994$, dla *P. taxon hungarica* $R^2=0,998$, a dla *P. lacustris* $R^2=0,996$. Nie zaobserwowano żadnych niespecyficznych reakcji w próbach „ślepych”, tj. niezawierających cząsteczek DNA. Wydajność reakcji amplifikacji real time PCR wahała się w granicach od 94,6% (dla *P. alni*) do 100% (dla *P. taxon hungarica*).



Ryc. 2.

Krzywe amplifikacji wzorców dla *P. lacustris*. Im większe stężenie DNA-matrycy w próbce, tym mniejsza wartość cyklu amplifikacji, dla którego linia przekracza limit fluorescencji Ct=4

Real time PCR amplification curves characteristic for *P. lacustris*. The higher DNA-matrix concentration in the sample, the lower cycle value for the limit of fluorescence Ct=4

Dyskusja

Projektowanie sond stwarza nowe możliwości wykrywania patogenów w próbkach środowiskowych. Dzięki nim możliwe jest selektywne wykrywanie obcych, inwazyjnych organizmów, do których należą patogeny z rodzaju *Phytophthora*. Zaletą zaprojektowanych sond jest możliwość szybkiej detekcji kilku lub kilkunastu gatunków najbardziej uciążliwych w szkółkach leśnych. Weryfikacja zdrowotności sadzonek wysadzanych na uprawy leśne ma zasadnicze znaczenie dla trwałości i różnorodności biologicznej przyszłych lasów. Rocznie w szkółkach leśnych w Polsce produkuje się około 870 mln sadzonek (informacja ustna: Anna Malinowska, rzecznik LP), które wysadzone do lasu mogą przenosić ze sobą patogeny i czynniki chorobotwórcze. O ile w szkółkach można jeszcze ograniczyć, a nawet zupełnie wyeliminować organizmy chorobotwórcze, to jednak gdy zostaną one zawleczone do drzewostanów, wtedy zadanie to jest praktycznie niewykonalne. Stosowanie w szkółkach odpowiedniego reżimu wodnego, nawozów i pestycydów często maskuje choroby, które ujawniają się na sadzonkach dopiero po ich wysadzeniu w sprzyjające dla patogenu warunki środowiskowe, np. okresowo zalewane wodą uprawy lub drzewostany. Patogeny z rodzaju *Phytophthora* mogą przez jakiś czas rozwijać się w tkankach roślin, nie powodując widocznych objawów, co dodatkowo komplikuje możliwość wyselekcjonowania zdrowych roślin jeszcze w szkółkach. Monitorowanie próbek gleby w poszczególnych kwaterach w szkółkach lub wody używanej do podlewania roślin umożliwia podejmowanie skutecznych działań prewencyjnych, np. niedopuszczanie do zainfekowania siewek poprzez zamianę uprawianych gatunków na poszczególnych kwaterach pod kątem ich odporności/podatności na patogeny. Monitoring fitopatologiczny szkółek może również skutkować wydawaniem odpowiednich paszportów zaświadczających, że materiał rozmnożeniowy jest wolny od szkodliwych organizmów, co jest zgodne z zaleceniami Unii Europejskiej. Obowiązek stosowania zasad integrowanej

ochrony roślin przez wszystkich profesjonalnych użytkowników środków ochrony roślin obowiązuje od 1 stycznia 2014 roku [Dyrektywa... 2009; Rozporządzenie... 2009]. Europejska i Śródziemnomorska Organizacja Ochrony Roślin (EPPO) kładzie duży nacisk na bezpieczne i racjonalne stosowanie chemicznych środków ochrony roślin oraz respektowanie „Dobrej praktyki ochrony roślin” [Dyrektywa... 2009]. Zabiegi ochrony w PGL LP powinny być prowadzone przy użyciu metod nieinwazyjnych [Zarządzenie... 1999]. Powyższe ograniczenia skłaniają do dalszego poszukiwania nowych, nieinwazyjnych technologii profilaktycznych lub ochronnych.

Wnioski

- ✚ Na podstawie uzyskanych wyników można stwierdzić, że zaprojektowane gatunkowo-specyficzne startery i sondy dla trzech gatunków z rodzaju *Phytophthora* są wysoce specyficzne dla *P. alni* subsp. *multiformis*, *P. lacustris* i *P. taxon hungarica*.
- ✚ Opracowane sondy molekularne stanowią precyzyjne narzędzie do molekularnej identyfikacji groźnych gatunków z rodzaju *Phytophthora* i mogą być wysoce przydatne w zapobieganiu dużym stratom w szkółkarstwie, uprawach oraz drzewostanach leśnych.

Literatura

- Brasier C. M., Cooke D. E. L., Duncan J. M., Hansen E. M. 2003. Multiple new phenotypic taxa from trees and riparian ecosystems in *Phytophthora gonapodyides* – *P. megasperma* ITS Clade 6, which tend to be high-temperature tolerant and either inbreeding or sterile. *Mycological Research* 107: 277-290.
- Dorak M. T. 2006. Real-Time PCR (Advanced Methods Series). Oxford: Taylor and Francis.
- Dyrektywa Parlamentu Europejskiego i Rady 2009/128/WE z dnia 21 października 2009 r. ustanawiająca ramy wspólnotowego działania na rzecz zrównoważonego stosowania pestycydów. 2009. Dz. U. UE L Nr 309.
- Ioos R., Andrieux A., Marçais B., Frey P. 2006. Genetic characterization of the natural hybrid species *Phytophthora alni* as inferred from nuclear and mitochondrial DNA analyses. *Fungal Genetics and Biology* 43: 511-529.
- Ippolito A., Schena L., Nigro F., Ligorio V. S., Yaseen T. 2004. Real-time detection of *Phytophthora nicotianae* and *P. citrophthora* in citrus roots and soil. *European Journal of Forest Pathology* 110: 833-843.
- Jung T., Blaschke H., Neumann P. 1996. Isolation, identification and pathogenicity of *Phytophthora* species from declining oak stands. *European Journal of Forest Pathology* 26: 253-272.
- Kong P., Hong C. X., Tooley P. W., Ivors K., Garbelotto M., Richardson P. A. 2004. Rapid identification of *Phytophthora ramorum* using PCR-SSCP analysis of ribosomal DNA ITS-1. *Letters in Applied Microbiology* 38: 433-439.
- Martin F. N., Tooley P. W. 2004. Identification of *Phytophthora* isolates to species level using restriction fragment length polymorphism analysis of a polymerase chain reaction-amplified region of mitochondrial DNA. *Phytopathology* 94: 983-991.
- Rozporządzenie Parlamentu Europejskiego i Rady (WE) nr 1107/2009 z dnia 21 października 2009 r. dotyczące wprowadzania do obrotu środków ochrony roślin i uchylające dyrektywy Rady 79/117/EWG i 91/414/EWG. 2009. Dz. U. UE L 309/1.
- Sambrook J., Russell D. W. 2001. Molecular cloning. A laboratory manual. Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, New York, USA.
- Schena L., Hughes K. J., Cooke D. E. 2006. Detection and quantification of *Phytophthora ramorum*, *P. kernoviae*, *P. citricola* and *P. quercina* in symptomatic leaves by multiplex real-time PCR. *Molecular Plant Pathology* 7 (5): 365-379.
- Tooley P. W., Martin F. N., Carras M. M., Frederick R. D. 2006. Real-Time fluorescent polymerase chain reaction detection of *Phytophthora ramorum* and *Phytophthora pseudosyringae* using mitochondrial gene regions. *Phytopathology* 96 (4): 336-345.
- Zarządzenie nr 11a Dyrektora Generalnego Lasów Państwowych z dnia 11 maja 1999 r. zmieniające Zarządzenie Nr 11 Dyrektora Generalnego Lasów Państwowych z dnia 14 lutego 1995 roku w sprawie doskonalenia gospodarki leśnej na podstawach ekologicznych. 1999. ZG-7120-2/99.