

RZECZPOSPOLITA
POLSKA



Urząd Patentowy
Rzeczypospolitej Polskiej

(12) **OPIS PATENTOWY**

(19) **PL**

(11) **239141**

(13) **B1**

(21) Numer zgłoszenia: **431992**

(51) Int.Cl.

C12Q 1/6895 (2018.01)

(22) Data zgłoszenia: **28.11.2019**

(54) **Startery oligonukleotydowe do wykrywania fitopatogenicznego grzyba
Phytophthora 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:

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

(74) Pełnomocnik:

rzecz. pat. Magdalena Tarała

PL 239141 B1

Opis wynalazku

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

Patogeny z rodzaju *Phytophthora* należą do szkodliwych dla roślin grzybów wodnych, które są zdolne do powodowania dużych strat ekonomicznych w uprawach na całym świecie. Większość grzybów należących do rodzaju *Phytophthora* jest przenoszona przez glebę i trudna do kontrolowania, co sprawia, że zapobieganie fytoftoriozie jest ważnym składnikiem wielu strategii zarządzania chorobami roślin. Wykrywanie i identyfikacja grzybów z rodzaju *Phytophthora* jest istotną częścią skutecznego ograniczenia rozprzestrzeniania się chorób roślin, strat ekonomicznych i poprawa jakości produktów rolnych (Drenth A., Guest I., 2004. *Economic impact of Phytophthora diseases in Southeast Asia*. In: *Diversity and Management of Phytophthora in Southeast Asia*, ACIAR Monograph, 114, 10–28). Konwencjonalne testy diagnostyczne grzybów z rodzaju *Phytophthora* opierają się na izolowaniu grzybów z chorej tkanki roślinnej za pomocą hodowli na pożywkach zawierających antybiotyki, indukcję tworzenia zarodników w celu określenia cech taksonomicznych i badanie mikroskopowe zarodników. Metody te są jednak czasochłonne i trudne do zastosowania w badaniach przesiewowych i monitoringowych (Drenth A., Sendall B., 2004. *Isolation of Phytophthora from infected plant tissue and soil, and principles of species identification*. In *Diversity and Management of Phytophthora in Southeast Asia*. (Eds. A. Drenth, D.I. Guest), 94–102. (Australian Centre for International Agricultural Research: Canberra, Australia). Dlatego też w literaturze opisanych jest wiele metod alternatywnych, m.in. opartych o analizę profili białkowych (Erwin D.C., Ribeiro O.K., 1996. *Phytophthora diseases worldwide*. American Phytopathological Society Press: St Paul), immunodetekcję (Devergne J.C., Fort M.A., Bonnet P., Ricci P., Vergnet C., Delaunay T., Grosclaude 1994. *Immunodetection of elicitors from Phytophthora spp. using monoclonal antibodies*. *Plant Pathology*, 43, 885–896), czy metody biologii molekularnej (Drenth A., Wagels G., Smith B., Sendall B., O'Dwyer C., Irvine G., Irwin J.A.G., 2006. *Development of a DNA-based method for detection and identification of Phytophthora species*, *Australasian Plant Pathology*, 35, 147–159). Z literatury wynika, że Bonants i in. (1997) oraz Hussain i in. (2014) opracowali metody PCR i qPCR oparte na regionie ITS, które pozwalają na identyfikację *P. infestans* z oospor, korzenia truskawki i sztucznie zakażonej gleby (Bonants P., Hagenaar-de Weerd M., Van Gent-Pelzer M., et al., 1997. *Detection and identification of Phytophthora fragariae* Hickman by the polymerase chain reaction. *European Journal of Plant Pathology*, 103, 345–355; Hussain T., Singh B.P., Anwar F., 2014. *A quantitative real time PCR based method for the detection of Phytophthora infestans causing late blight of potato, in infested soil*. *Saudi Journal of Biological Sciences*, 21, 380–386). Ponadto znane są wyniki badań nad zastosowaniem sondy TaqMan w detekcji grzybów *P. ramorum* i *P. lateralis* występujących na drewnie (Migliorini D., Ghelardini L., Luchi N., et al., 2019. *Temporal patterns of airborne Phytophthora spp. in a woody plant nursery area detected using real-time PCR*. *Aerobiologia*, 35, 201–214). Jednakże wymienione dostępne w literaturze metody umożliwiające identyfikację grzybów z rodzaju *Phytophthora* oparte są o różne 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 patogenów grzybowych *Phytophthora* sp. w badanej próbce opiera się według wynalazku na amplifikacji sekwencji DNA przy użyciu zaprojektowanej pary specyficznych oligonukleotydów, a następnie detekcji otrzymanego produktu reakcji PCR lub qPCR, w przypadku kiedy w próbce środowiskowej obecne jest DNA tych mikroorganizmów. Startery zostały zaprojektowane w oparciu o sekwencje genu kodującego β -tubulinę 2 (TUB2).

Istotę wynalazku stanowią startery oligonukleotydowe do wykrywania patogenów grzybowych należących do rodzaju *Phytophthora* o sekwencjach nr 1 i 2, jak przedstawiono na liście sekwencji.

Istotą sposobu wykrywania patogenów grzybowych należących do rodzaju *Phytophthora* 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 elektroforetyczny (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 373 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 rodzaju *Phytophthora*.

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 *Phytophthora* sp. (ścieżka 5 – widoczny prążek), *Botrytis cinerea* (ścieżka 3 i 6), *Verticillium* sp. (ścieżka 4), *Colletotrichum* sp. (ścieżka 2), kontrola negatywna (ścieżka 7), Marker wielkości DNA, 100–1000 pz (ścieżka 1 i 8).

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 (1 μM) 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 – 60°C przez 40 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 373 par zasad potwierdza się poprzez zastosowanie dowolnej metody rozdziłu i identyfikacji fragmentów kwasów nukleinowych.

Sposób stwierdzania obecności materiału genetycznego grzyba *Phytophthora* sp. 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. Probki następnie płukano w buforze fosforanowo-sodowym (825 μl) z odczynnikiem PLS (275 μl). Następnie wirowano (5 minut, 14 000 x g) i zlewano supernatant. Dodano bufor fosforanowo-sodowy (978 μl) i bufor MT (122 μl), po czym próbki homogenizowano w aparacie FastPrep24 w warunkach: 40 s, 6 m/s. Probki następnie wirowano (15 minut, 14 000 x g), a supernatant przenoszono do nowych probówek zawierających bufor PPS (250 μl). Probki 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). Probki następnie mieszano na rotatorze (5 minut), wirowano (2 minuty, 14 000 x g) i zlewano supernatant. Osad płukano buforem płuczącym (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 płuczącym (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 PCR. Do probówki o pojemności 0,1 ml dodano 2 μl wyizolowanego DNA. Reakcje przeprowadzono w termocy-

klerze 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 (1 μ M) o sekwencjach nr 1 i 2. Probówki wprowadzono na blok termocyklera stosując następujące profile termiczne dla wyizolowanego DNA matrycowego: 94°C przez 3 minuty, następnie 35 cykli: 94°C przez 15 sekund, 60°C przez 40 sekund, 72°C przez 45 sekund, oraz 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. 2.

LISTA SEKWENCJI

Sekwencja nr 1

Pht_490TUB_F: 5' GCCGAYGARGTCATGTGCTGGATAA '3

Sekwencja nr 2

Pht_845TUB_R: 5' CGTCCGCGGAACATRCACG '3

Zastrzeżenia patentowe

1. Startery oligonukleotydowe do wykrywania patogenów grzybowych z rodzaju *Phytophthora* o sekwencjach nr 1 i 2, jak przedstawiono na liście sekwencji.
2. Sposób wykrywania fitopatogenicznych grzybów z rodzaju *Phytophthora*, 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

TGCCGAYGAGGTCATGTGCTGGATAACGAGGCCCTGTACGACATTGCT
TCCGTACGCTGAAGCTCACTACTCCACCTACGGGGACTTGAACCACCTG
GTGTGCGCCGCCATGTCCGGTATCACCACGTGCCTGCGTTTCCCCGGTCA
GCTGAACTCGGACCTGCGTAAGCTGGCCGTGAACCTGATCCCGTTCCCTC
GTCTCCACTTCTTTATGATTGGTTTCGCCCCGCTGACGTCGCGTGGCTCGC
AGCAGTATCGCGCCCTGACGGTGCCCGAGCTGACCCAGCAGCAGTTCGA
TGCCAAGAACATGATGTGCGCCGCCGACCCTCGCCACGGCCGCTATTAA
CTGCCGCGTGYATGTTCCGCGGACG

Fig.1

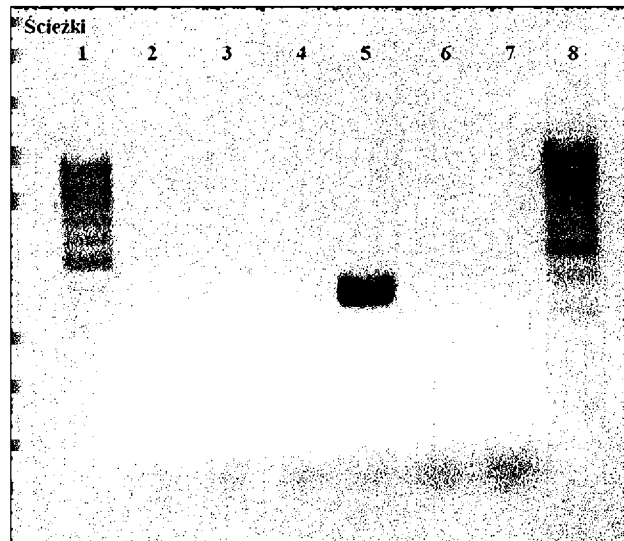


Fig.2