

(19)



URZĄD
PATENTOWY
RZECZYPOSPOLITEJ
POLSKIEJ

(10) **PL 242987 B1**

(12)

Opis patentowy

(21) Numer zgłoszenia: **437110**

(22) Data zgłoszenia: **2021.02.24**

(43) Data publikacji o zgłoszeniu: **2022.08.29 BUP 35/2022**

(45) Data publikacji o udzieleniu patentu: **2023.05.29 WUP 22/2023**

(51) MKP:

C12Q 1/6893 (2018.01)

C12Q 1/6844 (2018.01)

(73) Uprawniony z patentu:

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

(72) Twórca(-y) wynalazku:

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

(74) Pełnomocnik:

Magdalena Tarała, Lublin, PL

(54) Tytuł:

**Startery oligonukleotydowe do wykrywania fitopatogenicznych mikroorganizmów
Phytophthora cactorum oraz sposób ich wykrywania**

PL 242987 B1

Opis wynalazku

Przedmiotem wynalazku są startery oligonukleotydowe do wykrywania patogenów należących do gatunku *Phytophthora cactorum*, a także sposób wykrywania obecności tych patogenów.

Phytophthora cactorum jest patogenem atakującym wiele gatunków roślin istotnych rolniczo, a jego występowanie stwierdzono na całym świecie. Na plantacjach truskawek patogen ten powoduje dwie choroby poważnie obniżające plony: skórzastą zgniliznę owoców oraz zgniliznę korony truskawki. Dlatego też, wczesna detekcja *P. cactorum*, również przed założeniem plantacji jest niezbędna w celu wdrożenia skutecznych metod ochronnych oraz kontroli rozprzestrzeniania się tego fitopatogenu. Tradycyjne metody identyfikacji stosowane w celu detekcji tego patogenu, oparte o tradycyjne techniki płyt-kowe są długotrwałe i często dają niejednoznaczne rezultaty (Martin, F., Abad Z., Balci Y., Ivors K., 2012. *Identification and detection of Phytophthora: Reviewing our progress, identifying our needs. Plant Disease*, 96, 1080–1103). Do molekularnych metod stosowanych do detekcji patogenu należą techniki oparte o klasyczną łańcuchową reakcję polimerazy (PCR) (Li, J. A., Parikka P., Paaskynkivi E., Hantula J., Vainio E., Vartiama H., Lemmetty A., Vestberg M., 2006. *Phytophthora cactorum and Colletotrichum acutatum: Survival and Detection. Agriculturae Conspectus Scientificus*, 71, 4, 121–128), zagnieżdżoną łańcuchową reakcję polimerazy (nested-PCR) (Bhat R., Browne G., 2010. *Specific detection of Phytophthora cactorum in diseased strawberry plants using nested polymerase chain reaction. Plant Pathology*, 59, 1, 121–129), jak również o ilościową łańcuchową reakcję polimerazy (qPCR) (Ozyilmaz U., Banlioglu K., Yildiz A., Banlioglu H., 2016. *Effects of soil amendments combined with solarization on the soil microbial community in strawberry cultivation using quantitative real-time PCR. Phytoparasitica*, 44, 661–680). Jednakże techniki dostępne w literaturze, służące do wykrywania *Phytophthora cactorum*, zostały zoptymalizowane w oparciu o inne markery molekularne oraz charakteryzują się zmienną czułością i specyficznością. Co więcej, metody detekcji tego mikroorganizmu zostały najczęściej zwalidowane jedynie na czystych kulturach patogenu, bez oceny skuteczności metody na próbkach środowiskowych, charakteryzujących się zawartością licznych inhibitorów reakcji, jak również materiału genetycznego innych mikroorganizmów, bądź zostały sprawdzone na pojedynczych matrycach środowiskowych. Dodatkowo, w dostępnej literaturze nie ma informacji o metodzie detekcji z wykorzystaniem izotermicznej amplifikacji wykorzystującej zapętlanie (LAMP) opracowanej dla *Phytophthora cactorum*. W związku z tym nadal istnieje potrzeba dalszych poszukiwań skutecznych sposobów identyfikacji tego patogenu.

Celem wynalazku jest zatem zaproponowanie zestawu starterów do wykrywania patogenów roślinnych należących do gatunku *Phytophthora cactorum*, a także sposobu ich wykrywania. Sposób powinien być zwalidowany na próbkach środowiskowych, w szczególności glebie oraz fragmentach roślin.

Istotę wynalazku stanowi zestaw starterów oligonukleotydowych do wykrywania patogenów roślinnych należących do gatunku *Phytophthora cactorum* o sekwencjach nr 1, 2, 3, 4, 5, 6, jak przedstawiono na liście sekwencji.

Istota sposobu wykrywania fitopatogenicznego organizmu z gatunku *Phytophthora cactorum* z zastosowaniem reakcji amplifikacji określonego fragmentu DNA, gdzie amplifikacja objawia się pojawieniem się krzywej amplifikacji, potwierdzając detekcję powstałego produktu i wykorzystuje się izotermiczną metodę amplifikacji LAMP, polega na tym, że zestaw starterów stanowią startery oligonukleotydowe o sekwencjach nr 1, 2, 3, 4, 5 i 6, przedstawionych na liście sekwencji.

Startery zostały zaprojektowane w oparciu o sekwencje genu kodującego czynnik elongacji 1- α , uzyskane z izolatów organizmów należących do gatunku *Phytophthora cactorum* pochodzących z roślin, owoców i korzeni truskawki oraz z gleby spod upraw truskawek.

Zastosowanie wymienionych starterów oligonukleotydowych do przeprowadzenia izotermicznej reakcji amplifikacji wykorzystującej zapętlanie, przebiegającej w ściśle określonych warunkach według wynalazku, umożliwia amplifikację sekwencji DNA o długości 235 par zasad. Podstawową zaletą opracowanego systemu detekcji jest fakt, że został on zwalidowany nie tylko na czystych szczepach mikroorganizmów, ale również na próbkach środowiskowych, w szczególności glebie oraz fragmentach roślin, korzeniach i owocach truskawki, w których stwierdzono obecność organizmu patogenicznego z gatunku *Phytophthora cactorum*.

Specyficznej detekcji otrzymanego produktu amplifikacji dokonuje się poprzez odczyt fluorescencji o długości fali 520 nm, po wzbudzeniu światłem o długości fali 495 nm lub poprzez przeprowadzenie elektroforezy agarozowej.

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

- Fig. 1 przedstawia sekwencję nukleotydową fragmentu DNA amplifikowanego w reakcji przeprowadzonej z zastosowaniem oligonukleotydów o sekwencjach nr 1 i 2;
- Fig. 2 przedstawia wykres wzrostu fluorescencji w wyniku amplifikacji materiału genetycznego *Phytophthora cactorum* w obecności starterów o sekwencjach nr 1, 2, 3, 4, 5, 6.

Materiał biologiczny wykorzystywany w procesie detekcji stanowi gleba, korzenie, fragmenty roślin, owoce, komórki lub zarodniki mikroorganizmu. DNA uzyskane w wyniku przeprowadzenia procedury izolacji stosowane jest jako matryca do amplifikacji. Reakcję LAMP przeprowadza się w mieszaninie reakcyjnej o następującym składzie: woda dejonizowana wolna od nukleaz, master mix do reakcji LAMP zawierający w składzie polimerazę o aktywności zamiany nici *Gsp* SSD, kofaktor enzymu – jony Mg^{2+} , termostabilną pirofosfatazę, dNTP, bufor reakcyjny, barwnik fluorescencyjny wiążący dwuniciowe DNA, matrycowe DNA oraz oligonukleotydowe startery o sekwencjach nr 1 i 2 (0,2 μM), 3 i 4 (0,8 μM) oraz 5 i 6 (0,4 μM). Amplifikację przeprowadza się w 65°C przez 40–90 minut, z odczytem fluorescencji co minutę lub innego profilu termicznego umożliwiającego uzyskanie powielania DNA i detekcji z oligonukleotydami stanowiącymi przedmiot tego wynalazku.

Obecność oczekiwanego produktu potwierdza się poprzez zastosowanie dowolnego termocyklera typu real-time PCR umożliwiającego wzbudzenie mieszaniny reakcyjnej światłem o długości fali 495 nm i odczyt fluorescencji o długości fali 520 nm lub poprzez przeprowadzenie elektroforezy agarozowej.

Sposób stwierdzania obecności materiału genetycznego patogenów należących do gatunku *Phytophthora cactorum* w badanej próbce według wynalazku ilustruje zamieszczony poniżej przykład.

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

Izolację DNA przeprowadzono z wykorzystaniem komercyjnego zestawu do izolacji DNA z próbek śródowiskowych (FastDNA Spin Kit for Feces – MP Biomedicals).

250 mg tkanki roślinnej/fragmentów patogenu lub 500 mg gleby wprowadzano do próbek 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 μl) z odczynnikiem PLS (275 μl). Następnie wirowano (5 minut, 14 000 x g) i zlewano supernatant. Dodano bufor fosforanowo-sodowy (978 pl) i bufor MT (122 μl), 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 próbek zawierających bufor PPS (250 μl). Próbkę 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 próbki 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 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 próbki. 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 LAMP. Do próbki o pojemności 0,1 ml dodano 1 μl wyizolowanego DNA. Reakcję przeprowadzono w termocyklerze 7500 FAST (Applied Biosystems) w objętości 10 μl mieszaniny reakcyjnej zawierającej: wodę dejonizowaną wolną od nukleaz, master mix Isothermal MasterMix (ISO-001, OptiGene), zestaw oligonukleotydowych starterów o sekwencjach nr 1 i 2 (0,2 μM), 3 i 4 (0,8 μM) oraz 5 i 6 (0,4 μM). Ponadto, ze względu na wykorzystany termocykler, mieszanina reakcyjna zawierała barwnik referencyjny ROX (30 nM). Próbkę wprowadzono na blok termocyklera stosując następujący profil termiczny: 90 cykli: 65°C przez 30 sekund, odczyt fluorescencji w 65°C przez 30 sekund.

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

W trakcie trwania reakcji, 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 i metody stanowiącej przedmiot wynalazku przedstawia Fig. 2.

Lista sekwencji starterów

Numer	Nazwa	Sekwencja (5'→3')
1.	Psp_Ef1a_F3	GTACTTCTTCACGGTCATTGA
2.	Psp_Ef1a_B3	GTACATGACAGACGAGTCG
3.	Pca_Ef1a_FIP	AGCAACCACCAGGATGGCCACCGTGACTTCATCAAGAA
4.	Pca_Ef1a_BIP	TyGAAGCTGGTATCTCCAAGGAACrATCATCTGCTTCACAC
5.	Pca_Ef1a_LoopF	CTGCGAGGTACCCGTAATC
6.	Pca_Ef1a_LoopB	TGCTTGCCTTCACTCTGG

Zastrzeżenia patentowe

1. Zestaw starterów oligonukleotydowych do wykrywania patogenów należących do gatunku *Phytophthora cactorum* o sekwencjach nr 1, 2, 3, 4, 5 i 6, przedstawionych na liście sekwencji.
2. Sposób wykrywania fitopatogenicznego organizmu z gatunku *Phytophthora cactorum* z zastosowaniem reakcji amplifikacji określonego fragmentu DNA, gdzie amplifikacja objawia się pojawieniem się krzywej amplifikacji, potwierdzając detekcję powstałego produktu, w którym wykorzystuje się izotermiczną metodę amplifikacji LAMP, **znamienny tym**, że zestaw starterów stanowią startery oligonukleotydowe o sekwencjach nr 1, 2, 3, 4, 5 i 6, przedstawionych na liście sekwencji.

Rysunki

GTACTTCTTCACGGTCATTGACGCCCCTGGTCACCGTGACTTCATCAAGA
 ACATGATTACGGGTACCTCGCAGGCCGACTGCGCCATCCTGGTGGTTGCT
 TCGGGYGTGGGTGAGTTYGAAGCTGGTATCTCCAAGGAGGGCCAGACYC
 GTGAGCACGCTCTGCTTGCCTTCACTCTGGGTGTGAAGCAGATGATYGTY
 GCCATCAACAAGATGGACGACTCGTCTGTCATGTAC

Fig.1

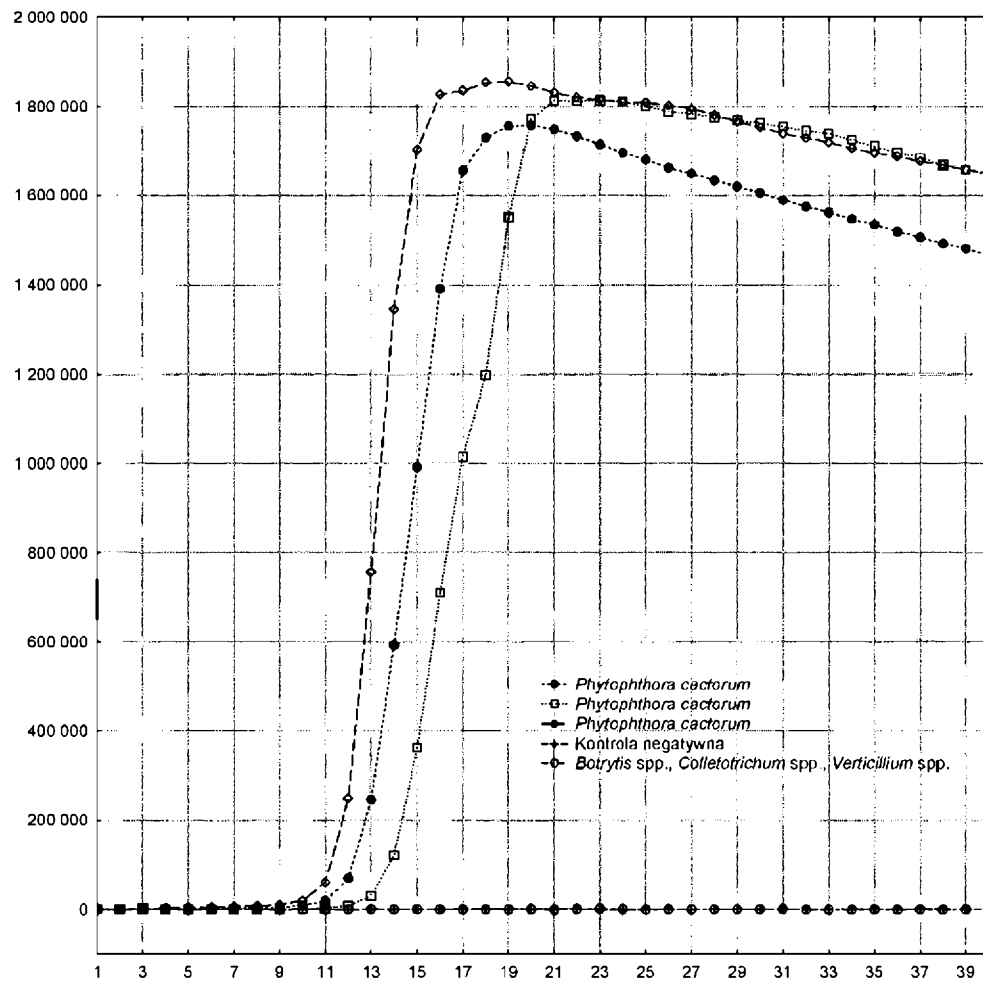


Fig.2