



Urząd Patentowy
Rzeczypospolitej Polskiej

(21) Numer zgłoszenia: **431170**

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

(22) Data zgłoszenia: **16.09.2019**

(54) **Startery oligonukleotydowe hybrydujące w obrębie genu *Cyp51* do wykrywania patogenu grzybowego pszenicy *Zymoseptoria tritici* powodującego septoriozę paskowaną liści oraz sposób jego wykrywania**

(43) Zgłoszenie ogłoszono:
22.03.2021 BUP 06/21

(45) O udzieleniu patentu ogłoszono:
27.09.2021 WUP 26/21

(73) Uprawniony z patentu:
**UNIwersytet Przyrodniczy w Lublinie,
Lublin, PL**

(72) Twórca(y) wynalazku:
**ADAM KUZDRALIŃSKI, Lublin, PL
JUSTYNA LEŚNIEWSKA-NOWAK,
Kalinówka, PL
MICHAŁ NOWAK, Kalinówka, PL
MAGDALENA KAWĘCKA, Bystrzyca, PL
KAROLINA RÓŻANIECKA,
Janówka Zachodnia, PL
ANNA KOT, Zwiartówek Kolonia, PL
AGNIESZKA OSTROWSKA, Lublin, PL
MARTA MUSZYŃSKA, Lublin, PL
HUBERT SZCZERBA, Świdnik, PL
ADAM WAŚKO, Lublin, PL**

Opis wynalazku

Przedmiotem wynalazku są startery oligonukleotydowe hybrydujące w obrębie genu *Cyp51* do wczesnego wykrywania patogenu grzybowego *Zymoseptoria tritici* z zastosowaniem łańcuchowej reakcji polimerazy, a także sposób wykrywania obecności tego patogenu.

Straty powodowane przez patogeny roślin zbożowych w niesprzyjających latach sięgają nawet 50% wielkości plonów. Najczęściej w celu ograniczenia populacji grzybów patogennych stosuje się działające nieselektywnie środki ochrony roślin. Niektóre z patogenów, tak jak *Zymoseptoria tritici*, odpowiadają za większość stosowanych środków dla danej rośliny (tutaj aż 70% rocznego użycia fungicydów w pszenicy zwyczajnej w EU) [Fones i Gurr, 2015]. Z kolei wykorzystywane obecnie metody molekularne, identyfikujące mikroorganizmy jeszcze przed wystąpieniem widocznych objawów chorobowych poprzez wykrycie obecności ich materiału genetycznego, charakteryzują się zmienną specyficznością i czułością. Znakomitym przykładem słabości metod opisanych w literaturze naukowej jest historia testów PCR wykrywających czynnik sprawczy septoriozy paskowanej liści pszenicy tj. patogen *Zymoseptoria tritici*.

Beck i Ligon (1995) jako pierwsi zaprojektowali i walidowali oligonukleotydy mające na celu detekcję *Z. tritici*, w oparciu o region ITS. Amplifikacja ze starterami JB446/ITS1 skutkowała produktem o długości 345 nt. Jednakże, oligonukleotydy te w doświadczeniach przeprowadzonych przez Fraaije i in. (1999) okazały się powielać również inny fragment DNA dając produkt niespecyficzny o długości 280 nt, który okazał się być fragmentem genomu rośliny, na której rozwijał się patogen. Fraaije i in. (1999) zaprojektowali nową parę starterów oligonukleotydowych E1/STSP2R, które miały być pozbawione tej wady. Następnie Fraaije i in. (2001) zaprojektowali i zwalidowali kolejną parę oligonukleotydów STIF2/BAF4ST hybrydujące do genu kodującego beta-tubulinę. Niestety Guo i in. (2006) wykazali uzyskiwanie produktów niespecyficznych dla innych patogenów pszenicy z w/w oligonukleotydami. Dlatego też Guo i in. (2006) zaproponowali nowe cztery testy PCR, które miały za zadanie specyficznie wykrywać obecność DNA *Z. tritici*. Również Consolo i in. (2009) zaproponowali nowe testy DNA. Od 2009 roku nie ma doniesień na temat nowych oligonukleotydów służących wykrywaniu obecności DNA *Z. tritici* w oparciu o konwencjonalną reakcję PCR, która jest znacząco efektywniejsza kosztowo w porównaniu z innymi technikami laboratoryjnymi.

Sposób identyfikacji patogenu grzybowego *Zymospetoria tritici* 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, w przypadku kiedy w próbce środowiskowej obecne jest DNA niniejszego mikroorganizmu. Uzyskane oligonukleotydy zaprojektowane zostały w oparciu o autorski algorytm autorów. Kilkanaście zaprojektowanych par starterów przeszło proces walidacji na kilkuset próbach środowiskowych. Nieliczne okazały się w pełni specyficzne dla patogenu, jednocześnie nie amplifikując DNA innych mikroorganizmów obecnych na pszenicy oraz DNA rośliny. Walidację przeprowadzono zarówno posługując się narzędziami bioinformatycznymi, jak i w oparciu o próby środowiskowe z trzech sezonów wegetacyjnych. Ponadto zaprojektowane oligonukleotydy porównano ze znanymi metodami opublikowanymi w literaturze naukowej. Oligonukleotydy będące przedmiotem niniejszego wynalazku wykrywają obecność DNA patogenu we wszystkich próbach środowiskowych gdzie obecność ta została potwierdzona wizualnie, podczas gdy porównywane metody literaturowe osiągają 70–80% poziom wykrywalności (dane uzyskane przez autorów).

Istotę wynalazku stanowią startery oligonukleotydowe do wykrywania patogenu grzybowego pszenicy *Zymospetoria tritici* o sekwencjach nr 1 i 2 przedstawionych na liście sekwencji.

Istotą sposobu wykrywania patogenu grzybowego pszenicy *Zymospetoria tritici* jest zastosowanie w reakcji PCR pary starterów oligonukleotydowych o sekwencjach nr 1 i 2 przedstawionych na liście sekwencji, w wyniku której dochodzi do amplifikacji określonego fragmentu DNA, po czym dokonuje się detekcji otrzymanego produktu amplifikacji poprzez rozdział elektroforetyczny.

Zastosowanie wyżej wymienionej pary starterów do przeprowadzenia łańcuchowej reakcji polimerazy przebiegającej w ściśle określonych warunkach według wynalazku umożliwia amplifikację fragmentu DNA o długości 430–450 par zasad.

Wynalazek jest bliżej pokazany w przykładzie wykonania i na rysunku, 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 rozdział elektroforetyczny produktów amplifikacji przeprowadzonej w obecności starterów o sekwencjach nr 1 i 2 dla wybranej próby izolowanej z liści porażonych patogenem.

Materiał biologiczny wykorzystywany w procesie identyfikacji stanowią fragmenty liści pszenicy zwyczajnej lub fragmenty grzybni/zarodniki mikroorganizmu. DNA uzyskane w wyniku przeprowadzenia procedury izolacji stosowane jest jako matryca do amplifikacji. PCR przeprowadza się w mieszaninie reakcyjnej o następującym składzie: woda dejonizowana, standardowy master mix do reakcji PCR zawierający w składzie polimerazę *Taq* DNA, kofaktor enzymu – jony Mg^{2+} , dNTP oraz bufor, matrycowe DNA oraz parę specyficznych starterów oligonukleotydowych (0,5–0,8 μM): o sekwencjach nr 1 i 2. Amplifikację przeprowadza się z zastosowaniem następującego profilu termicznego (lub zbliżonego): wstępna denaturacja – 95°C przez 5 minut, następnie 40 cykli: denaturacja – 95°C przez 30 sekund, annealing – 55°C przez 30 sekund, elongacja – 72°C przez 1 minutę, ostatni etap reakcji stanowi końcowa elongacja w 72°C przez 8 minut lub innego profilu termicznego umożliwiającego uzyskanie powielania DNA z oligonukleotydami stanowiącymi przedmiot tego wynalazku. Sekwencja zamplifikowanego fragmentu DNA przedstawiona jest na Fig. 1.

Obecność oczekiwanego produktu o długości około 430–450 par zasad potwierdza się poprzez zastosowanie dowolnej metody rozdziału i identyfikacji obecności fragmentów kwasów nukleinowych.

Sposób stwierdzania obecności materiału genetycznego grzyba *Zymoseptoria tritici* w badanej próbce według wynalazku ilustruje zamieszczony poniżej przykład.

A. Izolacja DNA z fragmentów liści pszenicy zwyczajnej

Izolację DNA przeprowadzono w wykorzystaniem komercyjnego zestawu do izolacji kolumnkowej, przeznaczonego dla roślin i grzybów (Plant and Fungi DNA Purification Kit – EURx). Fragmenty tkanki zamrażano w ciekłym azocie i homogenizowano mechanicznie poprzez rozcieranie w moździerzu. Otrzymane w ten sposób homogenaty przenoszono do probówek 2 ml typu Eppendorf i dodawano 400 μl buforu ekstrakcyjnego, a następnie 3 μl RNazy i 10 μl proteinazy K. Mieszaniny po dokładnym zworteksowaniu inkubowano w temperaturze 65°C przez 30 minut. W kolejnych etapach dokonano ekstrakcji przy użyciu 130 μl buforu AC oraz precypitacji (350 μl buforu Sol P, 250 μl etanolu 96%). Uzyskany po wirowaniu (1 min., 14 000 x g) supernatant nanoszono dwukrotnie na minikolumny umieszczone w probówkach odbierających, każdorazowo wylewając przesącz po zwirowaniu (1 min., 14 000 x g). Złoża minikolumny płukano dwukrotnie buforem płuczącym (Wash PX, 500 μl). Minikolumny umieszczono w nowych probówkach 2 ml typu Eppendorf i dokonano elucji DNA ze złoża z zastosowaniem 100 μl ogrzanego do 70°C buforu Elution. Dla określenia stężenia i jakości wyizolowanego DNA przeprowadzono pomiar spektrofotometryczny przy użyciu spektrofotometru NanoDrop2000 (Thermo Scientific).

B. Przygotowanie prób do amplifikacji

DNA wyizolowane według powyższej procedury wykorzystano jako matrycę dla reakcji PCR. Do każdej probówki o pojemności 0,2 ml dodano po 20 ng DNA. PCR przeprowadzono w objętości 25 μl mieszaniny reakcyjnej zawierającej: wodę dejonizowaną, standardowy master mix 2xPCR Master Mix (Thermo Scientific, Litwa), parę specyficznych starterów oligonukleotydowych (0,5–0,8 μM). Próby nałożono na blok termocyklera stosując następujący profil termiczny: wstępna denaturacja – 95°C przez 5 minut, następnie 40 cykli: denaturacja – 95°C przez 30 sekund; annealing – 55°C przez 30 sekund, elongacja – 72°C przez 1 minutę, ostatni etap reakcji stanowiła końcowa elongacja w 72°C przez 8 minut.

C. Wizualizacja wyników amplifikacji za pomocą elektroforezy agarozowej

Produkty reakcji PCR po zmieszaniu z 3 μl buforu obciążającego 6xLoading Dye (Thermo Scientific) rozdzielano na 2% żelu agarozowym w obecności 0,01% barwnika do wizualizacji DNA SimplySafe (EURx) w buforze TAE, przy napięciu 120 V, natężeniu 200 mA; w czasie 1 godziny. Otrzymane wzory rozdziałów obserwowano w świetle UV w archiwizatorze żeli.

Uzyskany dla badanego materiału wynik identyfikacji z zastosowaniem oligonukleotydów i metody stanowiącej przedmiot wynalazku przedstawia Fig. 2.

Literatura:

- Beck J.J. & Ligon L.M. (1995), Polymerase chain reaction assays for detection of *Stagonospora nodorum* and *Septoria tritici* in wheat. *Phytopathology*, 85, 319–324.
- Consolo, V. F., Albani, C. M., Berón, C. M., Salerno, G. L., & Cordo, C. A. (2009). A conventional PCR technique to detect *Septoria tritici* in wheat seeds. *Australasian Plant Pathology*, 38(3), 222–227.
- Fones, H., & Gurr, S. (2015). The impact of *Septoria tritici* Blotch disease on wheat: An EU perspective. *Fungal Genetics and Biology*, 79, 3–7
- Fraaije, B. A., Lovell, D. J., Coelho, J. M., Baldwin, S., & Hollomon, D. W. (2001). PCR-based assays to assess wheat varietal resistance to blotch (*Septoria tritici* and *Stagonospora nodorum*) and rust (*Puccinia striiformis* and *Puccinia recondita*) diseases. *European Journal of Plant Pathology*, 107(9), 905–917.
- Fraaije, B. A., Lovell, D. J., Rohei, E. A., & Hollomon, D. W. (1999). Rapid detection and diagnosis of *Septoria tritici* epidemics in wheat using a polymerase chain reaction/PicoGreen assay. *Journal of applied Microbiology*, 86(4), 701–708.
- Guo, J. R., Schnieder, F., & Verreet, J. A. (2006). Presymptomatic and quantitative detection of *Mycosphaerella graminicola* development in wheat using a real-time PCR assay. *FEMS Microbiology Letters*, 262(2), 223–229.

Zastrzeżenia patentowe

1. Startery oligonukleotydowe hybrydujące w obrębie genu *Cyp51* do wykrywania patogenu grzybowego pszenicy *Zymoseptoria tritici* o sekwencjach nr 1 i 2 przedstawionych na liście sekwencji.
2. Sposób wykrywania patogenu, grzybowego pszenicy *Zymoseptoria tritici*, w którym w reakcji PCR 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 zastrz. 1.

Lista sekwencji**Sekwencja nr 1**

LidSt11 5'-TTCGCGGACCTCTACCACTA-3'

Sekwencja nr 2

LidSt12 5'-TGGCATTGCCGTCCTTGTAT-3'

Rysunki

ATGTCCGAGACATACATGTCGATCATTCAGAAGAGACGAGAGTCCAAAA
CGGGCGAACATGAGGAAGACAGTAAGTGAAGTCAGGCACAGGAGGCGT
CCAGCTCTCGGAGTCTTGCAGTTGGCCTGTTAGTGGCCATGACATCGCCG
AGCATTTGCTAACGTCTTGTACCATCAGTGATCCACAACCTTGATGCAGTT
AGTAAAGTCACAAGCAGAAGGCGTGCAGATACAGTGTTGCCACGCGTGT
CCCACGGCCATGCGGCCCAAGTTCCTCCCTGGAGACGATGCTGACCCTCG
ACTTCTAGGTGCAAATACAA

Fig.1.

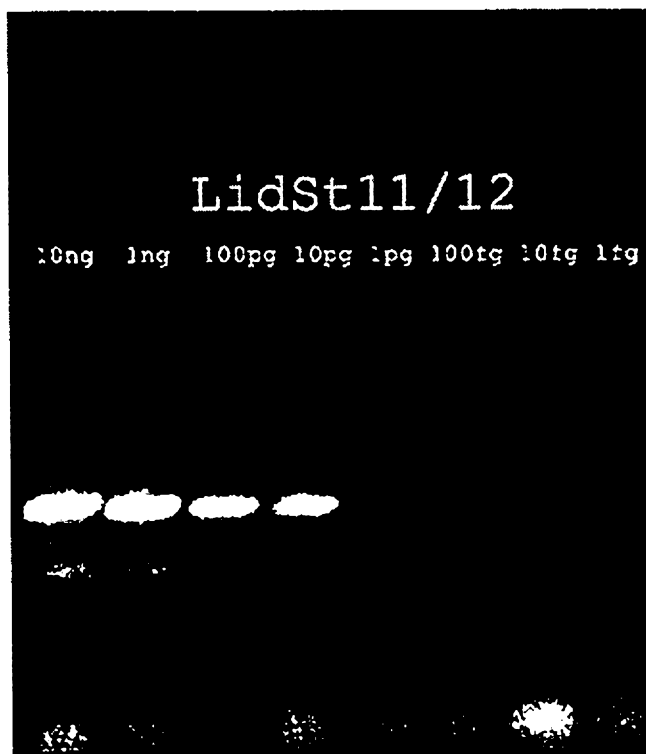


Fig.2.