

RZECZPOSPOLITA
POLSKA



Urząd Patentowy
Rzeczypospolitej Polskiej

(12) **OPIS PATENTOWY**

(19) **PL**

(11) **239140**

(13) **B1**

(21) Numer zgłoszenia: **431991**

(51) Int.Cl.

C12Q 1/6895 (2018.01)

(22) Data zgłoszenia: **28.11.2019**

(54) **Startery oligonukleotydowe do wykrywania fitopatogenicznego grzyba
Colletotrichum 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 239140 B1

Opis wynalazku

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

Grzyby z rodzaju *Colletotrichum* powodują antraknozę, która należy od chorób atakujących rośliny w czasie wegetacji, ale również powodujących psucie owoców po zbiorze, powodując straty ekonomiczne, związane z obniżeniem plonów i jakości owoców (Bragança C.A.D., Damm U., Baroncelli R., et al., 2016. *Species of the Colletotrichum acutatum complex associated with anthracnose diseases of fruit in Brazil. Fungal Biology* 120:547–561). Stosowane metody identyfikacji grzybów z rodzaju *Colletotrichum* na podstawie cech morfologicznych, stwarzają wiele problemów, ze względu na plastyczność tych grzybów i podobieństwa cech morfologicznych i fenotypu z innymi rodzajami grzybów, co sprawia, że metody te, oprócz tego, że są czasochłonne, to nie są dokładne i obarczone są dużym błędem (Cai L., Hyde K.D., Taylor P.W.J., et al., 2009. *A polyphasic approach for studying Colletotrichum. Fungal Divers* 39:183–204; Martinez-Culebras P.V., Barrio E., Garcia M.D., Querol A., 2000. *Identification of Colletotrichum species responsible for anthracnose of strawberry based on the internal transcribed spacers of the ribosomal region. FEMS Microbiology Letters*, 189, 97–101). Dlatego też do diagnostyki grzybów z rodzaju *Colletotrichum* bardzo często wprowadzane są metody biologii molekularnej oparte o różnorodne markery genetyczne, takie jak: ITS, HIS, GAPDH, CHS-1, TUB2, ACT, CAL, GS (Bragança C.A.D., Damm U., Baroncelli R., et al., 2016. *Species of the Colletotrichum acutatum complex associated with anthracnose diseases of fruit in Brazil. Fungal Biology* 120:547–561; Prihastuti H., Cai L., Chen H., et al., 2009. *Characterization of Colletotrichum species associated with coffee berries in northern Thailand. Fungal Diversity*, 39, 89–109). W literaturze opisane są metody umożliwiające identyfikację gatunku *C. acutatum* z wykorzystaniem specyficznych starterów i sondy molekularnej na podstawie sekwencji ITS1 i β -tubuliny (DeBode Van Hemelrijck W., Baeyen S., et al., 2009. *Quantitative detection and monitoring of Colletotrichum acutatum in strawberry leaves using real-time PCR. Plant Pathology Journal*, 58, 504–514). Z literatury wynika, że sekwencje genów funkcjonalnych takich jak BTUB i GAPDH mogą być przydatne w identyfikacji grzybów z rodzaju *Colletotrichum* na poziomie gatunku (Diao Y.Z., Zhang C., Liu F., et al., 2017. *Colletotrichum species causing anthracnose disease of chili in China. Persoonia – Molecular Phylogeny and Evolution of Fungi*, 38, 20–37; Dela Cueva F.M., Mendoza J.S., Balendres M.A., 2018. *A new Colletotrichum species causing anthracnose of chilli in the Philippines and its pathogenicity to chilli cultivar Django. Crop Protection*, 112, 264–268). Z kolei Talhinhas i in. (2005) opracowali metodę szybkiego wykrywania grzybów *C. acutatum* na podstawie genu β -tubuliny (Talhinhas P., Sreenivasaprasad S., Neves-Martins Oliveira H., 2005. *Molecular and phenotypic analyses reveal Association of diverse Colletotrichum acutatum groups and a low level of C. gloeosporioides with olive anthracnose. Applied and Environmental Microbiology*, 71, 2987–2998). Jednakże wymienione dostępne w literaturze metody umożliwiające identyfikację grzybów z rodzaju *Colletotrichum* 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 *Colletotrichum* 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 dehydrogenazę aldehydu 3-fosfo-glicerynowego (GAPDH).

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

Istotą sposobu wykrywania patogenów grzybowych należących do rodzaju *Colletotrichum* 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 250 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 *Colletotrichum*.

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

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 μ M) 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 5 cykli: denaturacja – 94°C przez 15 sekund, przyłączanie starterów – 56°C (touchdown – 1°C) przez 15 sekund, elongacja – 72°C przez 15 sekund, następnie 25 cykli: denaturacja: 94°C przez 15 sekund, przyłączanie starterów – 50°C przez 15 sekund, elongacja – 72°C przez 15 sekund oraz ostatni etap reakcji – końcowa elongacja – 72°C przez 7 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 250 par zasad potwierdza się poprzez zastosowanie dowolnej metody rozdzielania i identyfikacji fragmentów kwasów nukleinowych.

Sposób stwierdzania obecności materiału genetycznego grzyba *Colletotrichum* 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 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. Probki następnie wirowano (15 minut, 14 000 x g), a supernatant przenoszono do nowych probówek zawierających bufor PPS (250 μ l). 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 μ l), 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 μ l) 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 μ l DNA wyizolowanego z czystych szczepów (grzybni lub zarodników) lub 4 μ l DNA wyizolowanego z próbek środowiskowych. Reakcje przeprowadzono w termocyklerze 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 DNA matrycowego wyizolowanego z czystych szczepów: 94°C przez 3 minuty, następnie 5 cykli: 94°C przez 15 sekund, 56°C (touchdown – 1°C) przez 15 sekund, 72°C przez 15 sekund, następnie 25 cykli: 94°C przez 15 sekund, 50°C przez 15 sekund, 72°C przez 15 sekund, następnie 72°C przez 7 minut, dla DNA matrycowego wyizolowanego z próbek środowiskowych: 94°C przez 3 minuty, następnie 5 cykli: 94°C przez 15 sekund, 54°C (touchdown – 1°C) przez 15 sekund, 72°C przez 15 sekund, następnie 35 cykli: 94°C przez 15 sekund, 48°C przez 15 sekund, 72°C przez 15 sekund, następnie 72°C przez 7 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

CII_GAPDH_F: 5' TCATTCCACCTTACCCCTCC '3

Sekwencja nr 2

CII_GAPDH_R: 5' GTGGAGTCGTACTTGAGCATG '3

Zastrzeżenia patentowe

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

TTACAACAAGCCCAATCGAAACCTTGGGGCAAAGAGTTGAAGCTGCTA
CCTCCGACTCTTTTGCCCGTCGGTTTCGATTGGGCTGGTTGTATCGTGGCG
ACGTGATACAATGATGGAGGAGTAGCCGAGAATAAACTTGCTGACAGAC
AATCATCACAGGCCTACATGCTCAAGTACGACTCCACA

Fig.1**Fig.2**