

UŽITNÝ VZOR

(11) Číslo dokumentu:

31 547

(13) Druh dokumentu: **U1**

(51) Int. Cl.:

C12Q 1/6895 (2018.01)
C12N 15/31 (2006.01)
C12R 1/645 (2006.01)

(19)
ČESKÁ
REPUBLIKA



ÚŘAD
PRŮMYSLOVÉHO
VLASTNICTVÍ

(21) Číslo přihlášky: **2017-34297**
(22) Přihlášeno: **31.10.2017**
(47) Zapsáno: **06.03.2018**

(73) Majitel:
VÝZKUMNÝ A ŠLECHTITELSKÝ ÚSTAV
OVOCNÁŘSKÝ HOLOVOUSY s.r.o., Hořice, CZ

(72) Původce:
RNDr. Radek Čmejla, Ph.D., Jičín, CZ
Ing. Pavlína Jaklová, Miletín, CZ
Ing. Jana Kloutvorová, Hořice, CZ

(74) Zástupce:
PATENTOVÁ KANCELÁŘ, Mgr. Hana Jirkalová,
Michelská 18/12a, 140 00 Praha 4

(54) Název užitného vzoru:
**Sada pro detekci mutace G143A způsobující
rezistenci ke Qol fungicidům**

CZ 31547 U1

Sada pro detekci mutace G143A způsobující rezistenci ke QoI fungicidům

Oblast techniky

Řešení se týká sady primerů pro PCR detekci mutace G143A v mitochondriálním genu *cytb* u *Venturia inaequalis*, která způsobuje rezistenci ke QoI fungicidům.

5 Dosavadní stav techniky

Strupovitost jabloně je hospodářsky nejvýznamnější choroba jabloní, která je způsobena houbovým patogenem *Venturia inaequalis* [(Cooke) G. Winter 1875]. Tato houba napadá listy i plody, na kterých vytváří tmavé strupovité skvrny. V těchto místech dochází k nekrotám, opadu listů a praskání plodů, čímž je umožněn vstup pro druhotné infekce a napadené ovoce je tržně nerealizovatelné. U neošetřovaných sadů může klesnout výnosnost o 40 až 80 % nebo i více.

Základní způsob ochrany je používání fungicidů. Jedním typem často používaných fungicidů jsou fungicidy z chemické skupiny strobilurinů, které inhibují respirační řetězec, a jsou známy jako Quinone-outrside Inhibitors (QoI). Strobiluriny cíleně inhibují klíčový protein respiračního řetězce, cytochrom b (*cytb*). Používání těchto fungicidů však často vede ke vzniku rezistence k těmto přípravkům, a to zejména vyselektováním jednobodové mutace v genu *cytb* vedoucí k záměně glycinu za alanin v pozici 143 (G143A).

Z hlediska managementu ošetřování jablonových sadů je proto žádoucí včas zachytit přítomnost rezistentních kmenů *Venturia inaequalis*, a to z mnoha důvodů: 1) zabránit neúčelnému použití strobilurinových fungicidních přípravků tam, kde se již vytvořila rezistence patogena k nim; 2) a tím předejít ekonomickým ztrátám z použití nesprávného přípravku; 3) předejít zbytečné environmentální zátěži; 4) zahájit používání fungicidů z jiné skupiny s odlišným mechanismem působení pro zajištění efektivní ochrany jabloní proti chorobě a pro zachování kvalitní produkce. Pro účinnou ochranu ovocného sadu je dále výhodné znát poměr mutovaného, rezistentního kmenu *Venturia inaequalis*, k citlivému.

V současnosti se pro detekci mutace G143A používají postupy založené na metodě PCR. Fontaine (Fontaine, S., 2009) popisuje kvalitativní metodu detekce s použitím alelicky specifických primerů s udávanou citlivostí 1 %. Sedlák (Sedlak, P., 2013) popisuje detekci mutované varianty analýzou PCR produktů pomocí metody SSCP (ssDNA Conformation Polymorphism) s využitím polyakrylamidové gelové elektroforézy. Výbor FRAC (Fungicide Resistance Action Committee) uvádí dvě schválené metody pro detekci mutace G143A v genu *cytb* – využití RFLP (Restriction Fragment Length Polymorphism), respektive pyrosekvenování pro analýzu PCR produktů.

Nevýhodou všech postupů je časová náročnost, nemožnost přesné kvantifikace zastoupení mutované rezistentní formy G143A a nízká citlivost.

Podstata technického řešení

Uvedené nedostatky odstraňuje sada pro detekci mutace G143A způsobující rezistenci ke QoI fungicidům, podle technického řešení, jehož podstata spočívá v tom, že obsahuje primery pro současnou kvalitativní nebo kvantitativní PCR detekci lokusu mitochondriálního genu *cytb* u původce strupovitosti jabloně *Venturia inaequalis*, kdy tento lokus obsahuje buď přirozeně se vyskytující aminokyselinu glycin v poloze 143 (WT), nebo mutaci G143A zajišťující rezistenci vůči strobilurinovým fungicidům, a uvedené primery mají následující sekvence:

Forward primer 1: ATGGTCAAATGAGCCTAGGTGGT (SEQ ID NO. 1),

Forward primer 2: ATGGTCAAATGAGCCTAGTGGCT (SEQ ID NO. 2),

Reverse primer 1: AAGCCTCCCCACAGAAATTCG (SEQ ID NO. 3),

přičemž pro PCR detekci WT sekvence mitochondriálního genu *cytb* u *Venturia inaequalis* obsahuje sada primery, jejichž sekvence jsou:

Forward primer 1: ATGGTCAAATGAGCCTAGGTGGT (SEQ ID NO. 1),

Reverse primer 1: AAGCCTCCCCACAGAAATTCG (SEQ ID NO. 3),

a pro PCR detekci mutované sekvence G143A mitochondriálního genu cytb u *Venturia inaequalis* obsahuje sada primery, jejichž sekvence jsou:

Forward primer 2: ATGGTCAAATGAGCCTAGTGGCT (SEQ ID NO. 2),

5 Reverse primer 1: AAGCCTCCCCACAGAAATTCG (SEQ ID NO. 3).

Výše uvedené sady primerů jsou vhodné pro kvalitativní nebo kvantitativní detekci WT sekvence (varianty) nebo mutované sekvence (varianty) G143A mitochondriálního genu cytb u *Venturia inaequalis* metodou PCR. Kombinací výsledků kvantitativní analýzy obou variant lze získat přesné zastoupení mutované varianty G143A mitochondriálního genu cytb ve sledované populaci, a to s vysokou citlivostí nejméně 0,1 % vzhledem k WT variantě.

10 Metodou PCR se rozumí klasické uspořádání PCR reakce s detekcí ampliconů pomocí gelové elektroforézy nebo digitální PCR nebo real-time PCR využívající k detekci interkalační barviva a další varianty metody PCR známé odborníkovi v oboru. Ve výhodném provedení technického řešení je PCR produkt detekován v reálném čase pomocí real-time PCR s využitím interkalačního barviva, kdy v oddělených zkumavkách probíhá analýza daného vzorku s primery pro WT sekvenci, respektive mutovanou sekvenci G143A.

Detekce WT sekvence nebo mutované sekvence G143A mitochondriálního genu cytb u *Venturia inaequalis* může být dle provedení technického řešení provedena z jakékoliv části organismu, s výhodou se jedná o konidie, askospory, nebo jinou část houbového organismu.

20 Prvním krokem detekce WT sekvence nebo mutované sekvence G143A mitochondriálního genu cytb u *Venturia inaequalis* je izolace celkové DNA z houbového organismu metodami známými v oboru. Izolovaná DNA je následně analyzována na přítomnost WT a/nebo mutované sekvence G143A mitochondriálního genu cytb u *Venturia inaequalis* metodou PCR sadami primerů podle technického řešení.

25 Příklady provedení technického řešení jsou zde uvedeny pouze pro ilustraci a žádným způsobem neomezují rozsah této přihlášky, která je vymezena připojenými nároky a podrobně popsána v popisu technického řešení. Odborník v oboru bude schopen učinit různé modifikace použitého způsobu PCR a uvedených primerů tak, aby nedošlo ke snížení specifity a senzitivity PCR detekce. Modifikací primerů se rozumí zejména zkrácení nebo prodloužení na 3' a/nebo 5' konci
30 nebo záměna nukleotidů nebo kombinace těchto modifikací, které zachovávají alespoň 80% identitu k uvedeným sekvencím.

Příklady uskutečnění technického řešení

Příklad 1: Stanovení senzitivity metody detekce WT varianty a mutované varianty G143A mitochondriálního genu cytb u *Venturia inaequalis*

35 Pro stanovení senzitivity metody byly použity syntetické standardy typu Ultramer®, které jsou identické se sekvencemi WT a mutované G143A varianty. Byly připraveny směsi těchto standardů tak, aby obsahovaly standardy v různých poměrech dle Tabulky 1:

Zastoupení standardů ve směsi	
Varianta WT	Varianta MUT
100%	0%
99,9%	0,1%
99%	1%
90%	10%
50%	50%

10%	90%
1%	99%
0,1%	99,9%
0%	100%

Připravené kombinace standardů byly použity jako templát pro real-time PCR reakci s následujícími reakčními podmínkami: 2 µl směs standardů; 1x PCR Blue reakční pufr (Top-Bio); 2,5 mM MgCl₂; 200 µM dNTP každý; 1U Combi Taq DNA polymeráza (Top-Bio); 500 nM primery každý; 1x EvaGreen (interkalační barvivo, Biotium). Každá kombinace standardů byla otestována v triplicátu na přítomnost sekvence WT a mutované sekvence G143A mitochondriálního genu *cytb* pomocí real-time PCR.

Pro real-time PCR detekci WT sekvence mitochondriálního genu *cytb* *Venturia inaequalis* byly použity tyto primery:

Forward primer 1: ATGGTCAAATGAGCCTAGGTGGT (SEQ ID NO. 1),

Reverse primer 1: AAGCCTCCCCACAGAAATTCG (SEQ ID NO. 3).

Pro real-time PCR detekci mutované sekvence G143A mitochondriálního genu *cytb* *Venturia inaequalis* byly použity tyto primery:

Forward primer 2: ATGGTCAAATGAGCCTAGTGGCT (SEQ ID NO. 2),

Reverse primer 1: AAGCCTCCCCACAGAAATTCG (SEQ ID NO. 3).

Real-time PCR reakce probíhala v zařízení Rotor-Gene Q (Qiagen) s následujícím teplotním profilem: 94 °C/5 minut; cyklování 94 °C/20 s, 58 °C/2 s, 72 °C/10 s (50x), s odečtem fluorescence v HRM kanálu.

Po ukončení reakce bylo provedeno kvantitativní vyhodnocení obou variant pomocí Rotor-Gene Q softwaru. Ve všech kombinacích standardů byla nalezena shoda mezi očekávaným a identifikovaným poměrem obou variant. Senzitivita metody pro detekci mutované sekvence G143A mitochondriálního genu *cytb* *Venturia inaequalis* ve směsi je ≤ 0,1% vzhledem k WT variantě.

Příklad 2: Kvalitativní detekce WT a mutované varianty G143A mitochondriálního genu *cytb* u *Venturia inaequalis* metodou PCR v klasickém uspořádání

Pro detekci přítomnosti WT a rezistentní mutované varianty G143A mitochondriálního genu *cytb* byla ze směsi konidií *Venturia inaequalis* izolována celková DNA pomocí soupravy Exgene Plant SV mini (GeneAll). Připravená DNA byla použita jako templát pro PCR reakci s následujícími reakčními podmínkami: 2 µl cDNA; 1x PCR Blue reakční pufr (Top-Bio); 2,5 mM MgCl₂; 200 µM dNTP každý; 1U Combi Taq DNA polymeráza (Top-Bio); 500 nM primery každý. Každý vzorek byl v oddělených zkumavkách otestován na přítomnost sekvence WT a mutované sekvence G143A mitochondriálního genu *cytb* pomocí PCR.

Pro PCR detekci WT sekvence mitochondriálního genu *cytb* u *Venturia inaequalis* byly použity tyto primery:

Forward primer 1: ATGGTCAAATGAGCCTAGGTGGT (SEQ ID NO. 1),

Reverse primer 1: AAGCCTCCCCACAGAAATTCG (SEQ ID NO. 3).

Pro PCR detekci mutované sekvence G143A mitochondriálního genu *cytb* u *Venturia inaequalis* byly použity tyto primery:

Forward primer 2: ATGGTCAAATGAGCCTAGTGGCT (SEQ ID NO. 2),

Reverse primer 1: AAGCCTCCCCACAGAAATTCG (SEQ ID NO. 3).

PCR amplifikace probíhala v PCR cykleru C1000 (Biorad) s následujícím teplotním profilem: 94 °C/5 minut; cyklování 94 °C/20 s, 58 °C/2 s, 72 °C/10 s (50x).

Po ukončení reakce byly výsledné PCR amplikony analyzovány elektroforeticky na 3% agarózo-
vém gelu. U vzorků, které byly pozitivní pouze na přítomnost WT sekvence a neobsahovaly žád-
nou mutovanou variantu G143A mitochondriálního genu *cytb*, byl identifikován proužek o veli-
kosti 105 bp pouze u PCR reakce detekující WT variantu. U vzorků, které obsahovaly pouze
5 mutovanou variantu G143A mitochondriálního genu *cytb* a neobsahovaly žádnou WT variantu,
byl identifikován proužek o velikosti 105 bp pouze u PCR reakce detekující mutovanou variantu
G143A mitochondriálního genu *cytb*. Vzorky, které byly směsné a obsahovaly jak WT variantu,
tak mutovanou variantu G143A mitochondriálního genu *cytb*, vykazovaly proužky o velikosti
105 bp v obou PCR reakcích s různou intenzitou podle poměrů obou variant ve vzorku.

10 Pozitivní nálezy získané pomocí PCR byly ověřeny přímým sekvenováním PCR amplikonů. Ve
všech případech byl potvrzen nález WT sekvence nebo mutované sekvence G143A mitochondri-
álního genu *cytb* ve shodě se závěry z gelové elektroforézy.

Příklad 3: Kvalitativní a kvantitativní detekce WT a mutované varianty G143A mitochondriál-
ního genu *cytb* u *Venturia inaequalis* metodou real-time PCR

15 Pro detekci přítomnosti WT a rezistentní mutované varianty G143A mitochondriálního genu *cytb*
byla ze směsi konidií *Venturia inaequalis* izolována celková DNA pomocí soupravy Exgene
Plant SV mini (GeneAll). Připravené DNA byly použity jako templát pro real-time PCR reakci
s následujícími reakčními podmínkami: 2 µl směs standardů; 1x PCR Blue reakční pufr (Top-
-Bio); 2,5 mM MgCl₂; 200 µM dNTP každý; 1U Combi Taq DNA polymeráza (Top-Bio);
20 500 nM primery každý; 1x EvaGreen (interkalační barvivo, Biotium). Každý vzorek byl v od-
dělených zkumavkách otestován na přítomnost sekvence WT a mutované sekvence G143A
mitochondriálního genu *cytb* pomocí real-time PCR.

Pro real-time PCR detekci WT sekvence mitochondriálního genu *cytb* *Venturia inaequalis* byly
použity tyto primery:

25 Forward primer 1: ATGGTCAAATGAGCCTAGGTGGT (SEQ ID NO. 1),

Reverse primer 1: AAGCCTCCCCACAGAAATTCG (SEQ ID NO. 3).

Pro real-time PCR detekci mutované sekvence G143A mitochondriálního genu *cytb* *Venturia*
inaequalis byly použity tyto primery:

Forward primer 2: ATGGTCAAATGAGCCTAGTGGCT (SEQ ID NO. 2),

30 Reverse primer 1: AAGCCTCCCCACAGAAATTCG (SEQ ID NO. 3).

Real-time PCR reakce probíhala v zařízení Rotor-Gene Q (Qiagen) s následujícím teplotním pro-
filem: 94 °C/5 minut; cyklování 94 °C/20 s, 58 °C/2 s, 72 °C/10 s (50x), s odečtem fluorescence
v HRM kanálu.

35 Pozitivní nálezy získané pomocí real-time PCR byly ověřeny melting analýzou s určením cha-
rakteristické křivky tání specifických PCR amplikonů a přímým sekvenováním PCR amplikonů.
Ve všech případech byl potvrzen nález WT sekvence nebo mutované sekvence G143A mito-
chondriálního genu *cytb* ve shodě se závěry z real-time PCR.

40 Ve výhodném provedení technického řešení byla přítomnost WT nebo mutované sekvence
G143A mitochondriálního genu *cytb* *Venturia inaequalis* stanovena kvantitativně. Do real-time
PCR běhu byly přidány čtyři standardy pro WT sekvenci a čtyři standardy pro mutovanou sek-
venci G143A mitochondriálního genu *cytb* o známé koncentraci v desítkovém ředění pro sestro-
jení kalibrační křivky. U pozitivních vzorků byla použita kalibrační křivka pro stanovení abso-
lutní koncentrace WT sekvence nebo mutované sekvence G143A mitochondriálního genu *cytb*
Venturia inaequalis.

45 Příklad 4: Stanovení zastoupení mutované varianty G143A mitochondriálního genu *cytb* v popu-
laci *Venturia inaequalis* metodou real-time PCR

Pro stanovení zastoupení rezistentní mutované varianty G143A mitochondriálního genu *cytb*
v populaci byla ze směsi konidií *Venturia inaequalis* izolována celková DNA pomocí soupravy

Exgene Plant SV mini (GeneAll). Připravené DNA byly použity jako templát pro real-time PCR reakci s následujícími reakčními podmínkami: 2 µl směs standardů; 1x PCR Blue reakční pufr (Top-Bio); 2,5 mM MgCl₂; 200 µM dNTP každý; 1U Combi Taq DNA polymeráza (Top-Bio); 500 nM primery každý; 1x EvaGreen (interkalační barvivo, Biotium). Každý vzorek byl v oddělených zkumavkách otestován v triplicátu na přítomnost sekvence WT a mutované sekvence G143A mitochondriálního genu *cytb* pomocí real-time PCR. Do real-time PCR běhu byly přidány čtyři standardy pro WT sekvenci a čtyři standardy pro mutovanou sekvenci G143A mitochondriálního genu *cytb* o známé koncentraci v desítkovém ředění pro sestrojení kalibrační křivky.

Pro real-time PCR detekci WT sekvence mitochondriálního genu *cytb* *Venturia inaequalis* byly použity tyto primery:

Forward primer 1: ATGGTCAAATGAGCCTAGGTGGT (SEQ ID NO. 1),

Reverse primer 1: AAGCCTCCCCACAGAAATTCG (SEQ ID NO. 3).

Pro real-time PCR detekci mutované sekvence G143A mitochondriálního genu *cytb* *Venturia inaequalis* byly použity tyto primery:

Forward primer 2: ATGGTCAAATGAGCCTAGTGGCT (SEQ ID NO. 2),

Reverse primer 1: AAGCCTCCCCACAGAAATTCG (SEQ ID NO. 3).

Real-time PCR reakce probíhala v zařízení Rotor-Gene Q (Qiagen) s následujícím teplotním profilem: 94 °C/5 minut; cyklování 94 °C/20 s, 58 °C/2 s, 72 °C/10 s (50x), s odečtem fluorescence v HRM kanálu.

Po ukončení běhu byly pomocí Rotor-Gene Q softwaru sestrojeny kalibrační křivky pro absolutní kvantifikaci varianty WT a mutované varianty G143A mitochondriálního genu *cytb* v testované populaci *Venturia inaequalis*. Z absolutních koncentrací jednotlivých variant bylo po provedené normalizaci vypočteno zastoupení mutované varianty G143A mitochondriálního genu *cytb* jako procento v testované populaci *Venturia inaequalis*.

Průmyslová využitelnost

Nová sada primerů pro PCR detekci mutace G143A v mitochondriálním genu *cytb* u *Venturia inaequalis*, která způsobuje rezistenci ke QoI fungicidům, odstraňuje oproti dosavadnímu stavu techniky nízkou senzitivitu, umožňuje provést současnou přesnou kvantifikaci i kvalifikaci zastoupení mutované varianty v populaci a zkracuje čas potřebný k analýze. Tato sada primerů tak zrychluje, zpřesňuje a zlevňuje monitoring výskytu mutovaného kmene houby *Venturia inaequalis* a umožňuje tak operativnější management ochrany zejména sadů jabloní s pozitivním ekonomickým dopadem.

Seznam použité literatury

Fontaine, S., Remuson, F., Fraissinet-Tachet, L. et al. Monitoring of *Venturia inaequalis* harbouring the QoI resistance G143A mutation in French orchards as revealed by PCR assays. *Pest Manage. Sci.* (2009) 65:74-81. Sedlak, P., Vavra, R., Vejl, P. et al. Efficacy loss of strobilurins used in protection against apple scab in Czech orchards. *Hort. Sci. (Prague)* (2013) 40: 45-51.

N Á R O K Y N A O C H R A N U

1. Sada pro detekci mutace G143A způsobující rezistenci ke QoI fungicidům, **v y z n a ě u - j í c í s e t í m**, že obsahuje primery pro současnou kvalitativní nebo kvantitativní PCR detekci lokusu mitochondriálního genu *cytb* u původce strupovitosti jabloně *Venturia inaequalis*, kdy tento lokus obsahuje buď přirozeně se vyskytující aminokyselinu glycin v poloze 143 (WT), nebo

mutaci G143A zajišťující rezistenci vůči strobilurinovým fungicidům, a uvedené primery mají následující sekvence:

Forward primer 1: ATGGTCAAATGAGCCTAGGTGGT (SEQ ID NO. 1),

Forward primer 2: ATGGTCAAATGAGCCTAGTGGCT (SEQ ID NO. 2),

5 Reverse primer 1: AAGCCTCCCCACAGAAATTCG (SEQ ID NO. 3),

přičemž pro PCR detekci WT sekvence mitochondriálního genu *cytb* u *Venturia inaequalis* obsahuje sada primery, jejichž sekvence jsou:

Forward primer 1: ATGGTCAAATGAGCCTAGGTGGT (SEQ ID NO. 1),

Reverse primer 1: AAGCCTCCCCACAGAAATTCG (SEQ ID NO. 3),

10 a pro PCR detekci mutované sekvence G143A mitochondriálního genu *cytb* u *Venturia inaequalis* obsahuje sada primery, jejichž sekvence jsou:

Forward primer 2: ATGGTCAAATGAGCCTAGTGGCT (SEQ ID NO. 2),

Reverse primer 1: AAGCCTCCCCACAGAAATTCG (SEQ ID NO. 3).

Konec dokumentu
