

UŽITNÝ VZOR

(11) Číslo dokumentu:

34 732

(13) Druh dokumentu: **U1**

(51) Int. Cl.:

C12Q 1/6895 (2018.01)

C12R 1/645 (2006.01)

C12N 15/11 (2006.01)

(19)
ČESKÁ
REPUBLIKA



ÚŘAD
PRŮMYSLOVÉHO
VLASTNICTVÍ

(21) Číslo přihlášky: **2020-38053**

(22) Přihlášeno: **01.10.2020**

(47) Zapsáno: **29.12.2020**

(73) Majitel:
Mendelova univerzita v Brně, Brno, Černá Pole, CZ

(72) Původce:
Ing. Aleš Eichmeier, Ph.D., Rajhrad, CZ
Ing. Jana Čechová, Ph.D., Slavkov, CZ
Ing. Milan Špetík, Hnanice, CZ

(54) Název užitého vzoru:
**Sada pro masivně paralelní
metagenomickou detekci hub na platformě
dvoukanálového sekvenátoru**

Sada pro masivně paralelní metagenomickou detekci hub na platformě dvoukanálového sekvenátoru

5 Oblast techniky

Předkládané technické řešení se týká sady pro metagenomickou detekci hub na platformě dvoukanálového sekvenátoru, využívající postup molekulární identifikace masivně paralelním sekvenováním.

10

Dosavadní stav techniky

Patogenní houby působí závažná onemocnění plodin jako je réva vinná, ovocné nebo okrasné dřeviny. Dřevní pletiva rostlin napadají zejména druhy rodů *Cadophora*, *Campylocarpon*, *Collophora*, *Cylindrocarpon*, *Cylindrocladiella*, *Dactylonectria*, *Ilyonectria*, *Phaeoacremonium* a *Phaeomoniella*, a stejně tak mnoho hub třídy Basidiomycetes. Tyto houby sporulují během dormance, kdy jsou deštěm přenášeny do ran způsobených řezem či přírodními podmínkami. Patogeny pak způsobují chronické infekce dřeva, přičemž dosud nebyly popsány fungicidy vhodné k eliminaci těchto infekcí. Pro metagenomickou detekci existují pouze metody založené na sekvenaci vícekanálovými sekvenátory, což představuje vysoké náklady. Existuje také detekční způsob izolace patogenu a na základě morfologie a Sangerova sekvenování markerových genů je určen patogen porovnáním sekvencí s databázemi. Tento způsob patří mezi klasické a je časově velmi náročný.

25

Pro zlepšení možností prevence je potřebná detekce, která přesně a rychle detekuje houbové patogeny ve vzorku. Navrhovaná metoda metagenomické detekce houbových patogenů dřeva s využitím masivně paralelní sekvenace představuje vysoce precizní způsob detekce jak patogenních hub, tak i ostatních endofytických hub. Metoda je levnější než metagenomická detekce využívající čtyřkanálové sekvenátory, a poskytuje dostatečnou efektivitu a zároveň rychlost detekce.

30

Podstata technického řešení

35

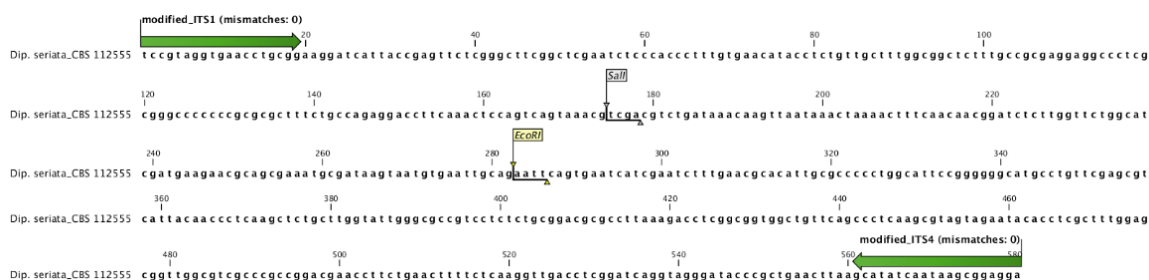
Předmětem předkládaného technického řešení je sada pro metagenomickou detekci houbových patogenů révy vinné na platformě dvoukanálového sekvenátoru, využívající postup molekulární identifikace masivně paralelním sekvenováním, vyznačující se tím, že obsahuje:

40 set oligonukleotidových primerů pro metagenomickou detekci hub:

forward primer TCCGTARSTGAACCTGCGG

reverse primer TCCTCCGCYWATTGATATGC

45 Pozn. (R-adenin/guanin, S-guanin/cytosin, W-adenin/thymin, Y-cytosin/thymin)



Výše uvedená sekvence zobrazuje amplifikovaný fragment ribozomálního genu (ITS region) v rámci referenční sekvence vybraného patogenu *Diplodia seriata* č. NR_1111151 dostupné v GenBank/NCBI. Velikost fragmentu je ~580 pb (párů bází). Cílová oblast nasedání primerů je vysoce univerzální.

5

Uvedenou kombinaci primerů lze s výhodou používat v mastermixu s Q5 High-Fidelity DNA Polymerase kitem a nukleáz prostou vodou. Reakční směs se smíchá s templátovou DNA extrahovanou z dřevního rostlinného pletiva. Získaný amplikon je doporučeno sekvenovat pomocí metody masivně paralelního sekvenování, kdy lze s výhodou používat indexovací kit Nextera a přístroj MiniSeq, dvoukanálový sekvenátor využívající sekvenaci syntézou.

10

Navrhovaná metoda metagenomické detekce houbových patogenů dřeva, využívající postup molekulární identifikace masivně paralelním sekvenováním představuje precizní způsob detekce. Metoda je levnější než metagenomická detekce využívající čtyřkanálové sekvenátory, a poskytuje dostatečnou efektivitu a zároveň rychlost detekce.

15

Navržený přístup je výsledkem testování různých kombinací primerů, které vykazovaly různou efektivitu amplifikace sekvencí cílových patogenů. Pro sekvenaci dvoukanálovým sekvenátorem je nutné amplifikovat co nejdiverzifikovanější amplikon, což je možné s pomocí uvedené kombinace primerů. Zvolená finální kombinace primerů poskytovala spolehlivou metagenomickou detekci houbových patogenů i ostatních hub ve dřevních pletivech révy vinné. Navržená metoda je rychlá a oproti jiným metodám umožňuje detekci také ostatních přítomných hub ve vzorku, nikoliv pouze patogenů.

25

Příklady uskutečnění technického řešení

Extrakce DNA z rostlinného pletiva – pletiva kmínku révy vinné.

Z části napadeného dřeva se odebere 50 až 100 mg pletiva, a z tohoto množství se pak přímo extrahuje DNA pomocí kitu NucleoSpin Tissue (Macherey Nagel) podle instrukcí výrobce.

30

Metagenomická detekce houbových patogenů metodou masivně paralelní sekvenace

Pro samotnou detekci byly použity primery podle tohoto technického řešení:

35

Název	Označení	Sekvence (5'-3')
forward primer 1	Modified ITS1	TCCGTARSTGAACCTGCGG
reverse primer 2	Modified ITS4	TCCTCCGCYWATTGATATGC

Reakce byla prováděna s použitím mastermixu o následujícím složení:

Reagencie	Množství
5× Pufr	5,0 µl
Nukleáz prostá voda	10,0 µl
Polymeráza 2,5 jednotek/µl	0,5 µl
MgCl ₂ roztok 25mM	1,0 µl
dNTPs 10mM	0,2 µl
Primer 1 (Modified ITS1) 10µM	1,0 µl
Primer 2 (Modified ITS4) 10µM	1,0 µl
Templát (DNA) 50 až 250 ng	2,0 µl

40

Teplotní profil PCR instrumentu

Reakce probíhala v termocykleru, např. TProfessional Standard Gradient, Biometra. Teplotní profil pro reakci: úvodní denaturace při 98 °C po dobu 2 minuty, následuje 30 cyklů 98 °C 15 s, 55 °C 15 s a 72 °C 40 s, a finální elongace při 72 °C 5 minut.

Kontrola detekce

Pro ověření detekce je možné PCR produkty vzniklé amplifikací v termocykleru separovat na agarózovém gelu (1,2%) s přídavkem fluorescenčního barviva, po dobu cca 1 hodiny při napětí 100 V. Na transiluminátoru pak lze vizualizovat vzniklé PCR produkty o velikosti ~580 bp.

Purifikace PCR produktu

PCR produkt je nutno purifikovat, např. kitem NucleoSpin Gel and PCR Clean-up (Macherey Nagel).

Příprava knihoven pro masivně paralelní sekvenování DNA (High-throughput sequencing)

Purifikovaný PCR produkt je vhodný k sekvenaci masivně paralelním způsobem, a navíc také k determinaci metagenomu hub. Příprava knihovny je založena na technologii Nextera, která umožňuje sekvenaci velkých ampliconů a celých genomů mikroorganismů. Finální knihovny je třeba zkontrolovat pomocí např. High Sensitive DNA kit (Agilent Technologies) a stanovit koncentrace. Knihovny jsou následně smíchány dohromady ve finální koncentraci 1,8pM roztoku.

Sekvenování

Připravené knihovny byly osekvenovány pomocí kitu MiniSeq Mid Output Kit (300-cycles) na přístroji MiniSeq (Illumina). K sekvenování takto připravených knihoven lze použít i jiné přístroje využívající technologii sekvenace syntézou, které jsou však finančně nákladnější.

Vyhodnocení metagenomických dat

Pro primární zpracování dat byl využit software CLC Genomics Workbench 6.5.1 (CLC Bio, Aarhus, Denmark). Pro klastrování byl využit online nástroj SCATA (<https://scata.mykopat.slu.se/>) a pro finální identifikaci rodu patogenu byl využit BLASTN (NCBI, National Center for Biotechnology Information).

Ověření metody

Byla provedena také klasická izolace patogenů na Petriho misky, které byly morfologicky a markerově identifikovány pomocí Sangerova sekvenování s následným porovnáním sekvencí s NCBI databází.

Výsledky

Bylo testováno čtyřicet roztoků DNA, které byly odebrány ze dřeva čtyř odrůd révy vinné: Pálava, Rulandské modré, Frankovka a Ryzlink vlašský. V rámci každé odrůdy bylo odebráno celkem 10 rostlin.

Tabulka č. 1: Výsledky metagenomické analýzy detekovaných houbových patogenů dřeva révy vinné. Uvedená čísla jsou abundance uvedené v procentech v poměru ke všem detekovaným houbám v rámci odrůdy. Frekvence pak popisuje procentické zastoupení detekovaných hub na celkový počet hodnocených jedinců. Pro zjednodušení uvádíme výsledky v rámci odrůd.

Rod GTD patogenu	Pálava	Rulandské modré	Frankovka	Ryzlink vlašský	Frekvence v %
<i>Botryosphaeria</i>	0,0	0,0	0,1	0,0	10,0
<i>Cadophora</i>	0,0	3,5	0,1	3,5	40,0
<i>Cryptosphaeria</i>	1,3	0,9	0,5	0,0	40,0
<i>Dactylonectria</i>	0,1	0,1	0,0	0,0	20,0
<i>Diaporthe</i>	0,0	18,8	1,3	0,1	50,0
<i>Diatrype</i>	2,5	1,2	7,9	0,0	35,0
<i>Diatrypella</i>	0,0	0,1	0,0	0,0	5,0
<i>Diplodia</i>	24,5	0,0	4,0	0,9	50,0
<i>Dothiorella</i>	0,6	0,0	0,0	0,0	5,0
<i>Fomitiporia</i>	0,0	0,1	0,3	0,0	20,0
<i>Lasiodiplodia</i>	0,4	0,0	0,0	0,0	15,0
<i>Neofusicoccum</i>	4,2	0,0	0,0	0,0	10,0
<i>Phaeoacremonium</i>	11,4	9,4	0,1	0,8	40,0
<i>Phaeomoniella</i>	0,7	33,2	30,4	0,0	40,0
Suma abundance	45,7	67,3	44,7	5,3	
Počet GTD taxonů	9	9	9	4	

5 Celkem bylo získáno 2 458 970 identifikačních čtení, které byly následně bioinformaticky zpracovány. Identifikačním čtením je myšlena každá získaná unikátní sekvence nukleotidů přiřazená k houbovému organismu na úrovni rodu. Nejvíce taxonů na úrovni rodů všech hub bylo přiřazeno v rámci rostlin odrůdy Ryzlink vlašský: 111; dále Frankovka: 64; Rulandské modré: 32 a Pálava: 24. Z toho houbových patogenů – Ryzlink vlašský: 4; Frankovka: 9; Rulandské modré: 9 a Pálava: 9, viz Tabulka č. 1. Tabulka č. 1 také popisuje zastoupení jednotlivých rodů houbových patogenů z celkového procenta detekovaných hub a frekvenci jejich zastoupení v rámci odrůd. Celkový poměr patogenů k ostatním houbám v rámci jednotlivých odrůd popisují následující poměry: Pálava (patogeny 45,7 %; ostatní 54,3 %), Rulandské modré (patogeny 67,3 %; ostatní 32,7 %), Frankovka (patogeny 44,7 %; ostatní 55,3 %) a Ryzlink vlašský (patogeny 5,3 %; ostatní 94,7 %). Výsledky klasické detekce izolace na Petriho miskách povrdily metagenomickým přístupem detekované patogeny, avšak v mnohem nižším zastoupení než prokazuje nově popsany přístup.

Šíření těchto závažných patogenů lze zabránit pouze používáním patogenů prostého množitelského materiálu a včasným odstraňováním infikovaných rostlin z výsadeb.

20

Průmyslová využitelnost

- 5 Popsanou reakční směs pro precizní metagenomickou detekci na dvoukanálovém sekvenátoru je možné dodávat diagnostickým laboratořím jako kit. Zavedením tohoto inovovaného postupu diagnostiky lze precizně detekovat houby dřeva révy vinné. Tímto způsobem je možné identifikovat infikované rostliny na poli a rovněž detekovat infekci ještě před započetím množitelského procesu u již infikovaných matečných rostlin a předejít tak významným ztrátám v produkci.

NÁROKY NA OCHRANU

- 5 1. Sada pro masivně paralelní metagenomickou detekci houbových patogenů révy vinné na platformě dvoukanálového sekvenátoru, **vyznačující se tím**, že obsahuje kombinaci nukleotidových sekvencí primerů:

forward primer TCCGTARSTGAACCTGCGG
reverse primer TCCTCCGCYWATTGATATGC.

10