

PATENTOVÝ SPIS

(11) Číslo dokumentu:

305 950

(13) Druh dokumentu: **B6**

(51) Int. Cl.:

A01N 65/00 (2009.01)
A01N 63/04 (2006.01)

(19)
ČESKÁ
REPUBLIKA



ÚŘAD
PRŮMYSLOVÉHO
VLASTNICTVÍ

(21) Číslo přihlášky: **2011-774**
(22) Přihlášeno: **28.11.2011**
(40) Zveřejněno: **05.06.2013**
(Věstník č. 23/2013)
(47) Uděleno: **06.04.2016**
(24) Oznámení o udělení ve věstníku: **18.05.2016**
(Věstník č. 20/2016)

(56) Relevantní dokumenty:
Redakčně upravená výroční zpráva 2008 "Využití biotechnologických postupů pro zvýšení odolnosti řepky proti fomové hnilobě" NAZV QH 81201; L. Burketová; 27.01.2009; disertační práce "Kvantitativní a indukovaná rezistence řepky ozimé k *Leptosphaeria maculans*"; ČZU; 01.04.2011; Vladimír Šašek.

(73) Majitel patentu:
Vysoká škola chemicko-technologická v Praze,
Praha 6, CZ
Ústav experimentální botaniky Akademie věd
České republiky, v.v.i., Praha 6, CZ

(72) Původce:
prof. RNDr. Olga Valentová, CSc., Praha 6, CZ
doc. Ing. Lenka Burketová, CSc., Praha 6, CZ
Ing. Vladimír Šašek, Ph.D., Praha 2, CZ
Ing. Dinh Kim Phuong, Hanoi district Tay Ho, VN
Ing. Jana Fajmonová, Pardubice, CZ

(74) Zástupce:
Ing. Václav Herman, Hlavní 43, 252 43 Průhonice

(54) Název vynálezu:
**Přípravek pro ochranu rostlin, jeho
příprava a jeho použití**

(57) Anotace:
Je popsán přípravek pro ochranu rostlin, který obsahuje elicitory z mycelia *Leptosphaeria maculans* a jeho příprava. Je popsáno také použití tohoto přípravku pro ochranu rostlin proti houbovým a bakteriálním patogenům.

CZ 305950 B6

Přípravek pro ochranu rostlin, jeho příprava a jeho použití

Oblast techniky

5

Tento vynález se týká přípravku na ochranu rostlin, elicitorů z mycelia *Leptosphaeria maculans*, jeho přípravy a jeho použití.

Dosavadní stav techniky

Fómová hniloba řepky (původce – houbový patogen *Leptosphaeria maculans* (Desm.) Ces. & De Not.) patří v podmínkách České republiky i celosvětově k nejzávažnějším chorobám řepky olejky. Hlavním způsobem ochrany plodiny je aplikace fungicidních přípravků, které zatěžují životní prostředí a často představují i možná zdravotní rizika. Využívány jsou nejčastěji přípravky na bázi tebuconazolu, který je potenciálním karcinogenem, teratogenem a hormonálním disruptorem. Podobná rizika jsou zmiňována i u syntetického induktoru rezistence BION® (Syngenta, aktivní složka BTH–benzothiadiazol, funkční analog kyseliny salicylové) (zdroj www.pesticide-info.org). Dalším negativem využití fungicidů je jejich finanční náročnost, která zvyšuje náklady na pěstování. Používání fungicidních prostředků je tedy z mnoha důvodů problematické.

Elicitory jsou látky, které jsou schopné v rostlinách aktivovat obranné mechanismy a vyvolat tak rezistenci k chorobám a škůdcům. Tyto látky lze izolovat z těla patogenů i rostlin a slouží pro aplikaci na rostliny jako signál pro spuštění obrany. Popsány byly elicitory izolované z mycelia houbových patogenů jako např. *Botrytis cinerea*, *Penicillium chrysogenum*, *Sclerotium rolfsii*, *Fusarium moniliforme* a dalších. Elicitor z mycelia *Leptosphaeria maculans* nebyl dosud popsán.

Podstata vynálezu

30

Předmětem vynálezu je přípravek na ochranu rostlin obsahující elicitory z mycelia *L. maculans*, jeho příprava a jeho použití.

Elicitory z mycelia *Leptosphaeria maculans* lze připravit například následujícím způsobem: *L. maculans* se inkubuje v tekutém mediu Gamborg B5 po dobu alespoň 7 dní při teplotě 20 až 28 °C za stálého třepání 130 ot/min ve tmě. Inokulace byla provedena suspenzí konidií. Poté bylo medium odfiltrováno přes papírový filtr a mycelium promyto vodou. Ke 150 g mycelia bylo poté přidáno 400 ml destilované vody a homogenizováno v mixeru. Homogenizované mycelium bylo zfiltrováno, byly odstraněny lipidy a mycelium bylo vysušeno acetonem. K myceliu byl dále přidán roztok proteinázy K (50 U/ml vzorku) v 15 ml 10mM Tris pH 7,2 a směs byla inkubována při 20 až 40 °C po dobu nejméně 1 h ve tmě. Roztok byl odfiltrován, mycelium bylo následně 3x promyto vodou, k myceliu bylo přidáno 100 ml dest. vody a směs byla autoklávována nejméně 1 h při 120 °C. Poté byla směs opět zfiltrována.

Filtrát získaný předchozím postupem byl dále přečištěn iontoměničovou chromatografií na koloně anexu. Na kolonu ekvilibrovanou 50mM Tris HCl pH 8,5 byl aplikován filtrát (upravený 2M Tris–HCl pH 8,5 na výslednou koncentraci 50mM Tris–HCl). Látky nenavázané na kolonu (F0) byly eluovány 50mM Tris HCl pH 8,5, látky zachycené na koloně (F1) byly eluovány lineárním gradientem 2M NaCl v elučním pufru.

50

Složky mycelia připravené shora uvedeným postupem zvyšují odolnost rostlin řepky vůči fómové hnilobě vyvolané houbovým patogenem *Leptosphaeria maculans* a jsou účinné i u dalších rostlin proti jiným patogenům (např. u *Arabidopsis thaliana* proti bakterii *Pseudomonas syringae* pv. *tomato*), současně také v ošetřených rostlinách výrazně aktivují expresi obranných genů. Sledován byl zejména gen PR1 (pathogenesis related protein1) jako markerový gen dráhy kyseliny

55

salicylové a gen ICS (isochorismát syntasa) podílející se na syntese kyseliny salicylové. Účinek námi získané elicitorové frakce označené jako filtrát je ve sledovaných parametrech srovnatelný s účinkem komerčního přípravku BION® (Syngenta, aktivní složka BTH–benzothiazol, analog kyseliny salicylové), jehož používání je vzhledem k jeho vlastnostem značně nevýhodné. Námi izolovaná frakce složek mycelia tyto nevýhodné vlastnosti nemá.

Příklady uskutečnění vynálezu

Příklad 1

Příprava elicitorů z mycelia *Leptosphaeria maculans*

Kultivace *L. maculans*, izolát JN2, probíhala ve 400 ml tekutého media Gamborg B5 po dobu 14 dní při teplotě 24 °C za stálého třepání 130 ot/min ve tmě. Inokulace byla provedena 400 µl suspenze konidií (10⁸ spor/ml). Poté bylo medium zfiltrováno přes papírový filtr a mycelium bylo promyto vodou. Ke 150 g mycelia bylo poté přidáno 400 ml destilované vody a homogenizováno 5 min v mixeru. Homogenizované mycelium bylo zfiltrováno, promyto směsí chloroform:methanol (1:1, obj./obj.) a vysušeno acetonem. K myceliu byl dále přidán roztok proteinázy K (50 U/ml vzorku) v 15 ml 10mM Tris pH 7,2 a směs byla inkubována při 37 °C po dobu 120 min ve tmě. Roztok byl odfiltrován, mycelium bylo následně 3x promyto vodou, k myceliu bylo přidáno 100 ml destilované vody a směs byla autoklávována 180 min při 120 °C. Poté byla směs opět zfiltrována a objem filtrátu byl upraven vodou na 100 ml (F).

Filtrát získaný předchozím postupem byl dále přečištěn ionexovou chromatografií na koloně HiTrap Q–Sephrose. Na kolonu ekvilibrovanou 50mM Tris HCl pH 8,5 bylo aplikováno 20 ml filtrátu (upraveného 2M Tris–HCl pH 8,5 na výslednou koncentraci 50mM Tris – HCl). Látky nenavázané na kolonu (F0) byly eluovány 50mM Tris HCl pH 8,5, látky zachycené na koloně (F1) byly eluovány lineárním gradientem 2M NaCl v elučním pufu.

Příklad 2

Relativní exprese genů *PRI* a *ICSI* po aplikaci filtrátu na rostliny

Filtrát F byl aplikován postřikem na děložní listy 10denních rostlin řepky (3 ml na 6 rostlin). Kontrolní rostliny byly ošetřeny vodou, jako pozitivní kontrola byl aplikován 32µM roztok BTH (0,4 mg komerčního přípravku BION® 50WG do 30 ml vody). Po 24 h byla z rostlinného materiálu izolována mRNA a po reverzní transkripci byla metodou kvantitativní PCR sledována exprese markerových genů indukované rezistence. Expres obou sledovaných genů po ošetření filtrátem dosahuje stejných nebo vyšších hodnot ve srovnání s pozitivní kontrolou ošetřenou BTH (obr. 1 a 2).

Příklad 3

Relativní exprese genu *PRI* a *ICSI* po aplikaci filtrátu inkubovaného s α–glukosidasou

Filtrát F byl upraven fosfátovým pufrem pH 6,8 tak aby výsledná koncentrace byla 50mM. Takto upravený filtrát byl inkubován s α–glukosidasou ze *Saccharomyces cerevisiae* (cca 15 U/10 ml vzorku) po dobu 2 h při 37 °C za stálého třepání. Získal se tak filtrát FG1. Filtrát FG1 byl aplikován postřikem na děložní listy 10ti denních rostlin řepky (3 ml na 6 rostlin). Kontrolní rostliny byly ošetřeny vodou, jako pozitivní kontrola byl aplikován 32µM roztok BTH (0,4 mg komerčního přípravku BION® 50WG do 30 ml vody). Po 24 h byla z rostlinného materiálu izolována

mRNA a po reverzní transkripci byla metodou kvantitativní PCR sledována exprese markerových genů indukované rezistence *PR1* a *ICS1*. Účinnost FG1 se snížila, což naznačuje, že část účinných složek je sacharidové povahy (obr. 1 a 2).

5

Příklad 4

Relativní exprese genu *PR1* a *ICS1* po aplikaci filtrátu inkubovaného s β -glukosidasou

10 Filtrát F byl upraven fosfátovým pufrům pH 5,6 tak aby výsledná koncentrace byla 50mM. Takto upravený filtrát byl inkubován s β -glukosidasou z mandlí (cca 3 U/10 ml vzorku) po dobu 2 h při 37 °C za stálého třepání. Získal se tak filtrát FG2. Filtrát FG2 byl aplikován postříkem na děložní listy 10denních rostlin řepky (3 ml na 6 rostlin). Kontrolní rostliny byly ošetřeny vodou, jako pozitivní kontrola byl aplikován 32 μ M roztok BTH (0,4 mg komerčního přípravku BION® 50WG

15 do 30 ml vody). Po 24 h byla z rostlinného materiálu izolována mRNA a po reverzní transkripci byla metodou kvantitativní PCR sledována exprese markerových genů indukované rezistence *PR1* a *ICS1*. Účinnost FG2 se snížila, což naznačuje, že část účinných složek je sacharidové povahy (obr. 1 a 2).

20

Příklad 5

Relativní exprese *PR1* a *ICS1* po aplikaci frakce F0 na rostliny

25 Frakce F0 byla aplikovány postříkem na děložní listy desetidenních rostlin řepky (3 ml na 6 rostlin). Kontrolní rostliny byly ošetřeny vodou, jako pozitivní kontrola byl aplikován 32 μ M roztok BTH (0,4 mg komerčního přípravku BION® 50WG do 30 ml vody). Po 24 h byla z rostlinného materiálu izolována mRNA a po reverzní transkripci byla metodou kvantitativní PCR sledována exprese markerových genů indukované rezistence. Expresse sledovaných genů po ošetření frakcí

30 F0 a porovnání s účinkem F a F1 je uvedena na obrázku 1 a 2.

Příklad 6

35 Relativní exprese *PR1* a *ICS1* po aplikaci frakce F1 na rostliny

Frakce F1 byla aplikovány postříkem na děložní listy desetidenních rostlin řepky (3 ml na 6 rostlin). Kontrolní rostliny byly ošetřeny vodou, jako pozitivní kontrola byl aplikován 32 μ M roztok BTH (0,4 mg komerčního přípravku BION® 50WG do 30 ml vody). Po 24 h byla z rostlinného

40 materiálu izolována mRNA a po reverzní transkripci byla metodou kvantitativní PCR sledována exprese markerových genů indukované rezistence. Expresse sledovaných genů po ošetření frakcí F1 a srovnání s F a FO je uvedena na obrázku 1 a 2.

45 Příklad 7

Indukce rezistence u řepky proti *Leptosphaeria maculans* filtrátem F

Filtrát F byl aplikován postříkem na děložní listy desetidenních rostlin řepky (3 ml na 6 rostlin). Kontrolní rostliny byly ošetřeny vodou, jako pozitivní kontrola byl aplikován 32 μ M roztok BTH (0,4 mg komerčního přípravku BION® 50WG do 30 ml vody). 4 dny po ošetření byly děložní listy infiltrovány injekční stříkačkou bez jehly suspenzí spor o koncentraci 10⁵ spor/ml tak, aby byla vyplněna celá plocha listu (cca 0,1 ml najeden list). Jedenáct dní po inokulaci byla vyhodno-

50

cena plocha lézí programem APS Assess 2.0, Aplikace filtrátu F statisticky významně zvyšuje odolnost rostlin k infekci patogenem *Leptosphaeria maculans*, viz obrázek 3.

5 Příklad 8

Indukce rezistence u řepky proti *Leptosphaeria maculans* filtrátem FG1

10 Filtrát FG1 byl aplikován postřikem na děložní listy desetidenních rostlin řepky (3 ml na 6 rostlin). Kontrolní rostliny byly ošetřeny vodou, jako pozitivní kontrola byl aplikován 32 μ M roztok BTH (0,4 mg komerčního přípravku BION® 50WG do 30 ml vody). 4 dny po ošetření byly děložní listy infiltrovány injekční stříkačkou bez jehly suspenzí spor o koncentraci 10⁵ spor/ml tak, aby byla vyplněna celá plocha listu (cca 0,1 ml najeden list). Jedenáct dní po inokulaci byla vyhodnocena plocha lézí programem APS Assess 2.0. Aplikace filtrátu FG1 statisticky významně
15 zvyšuje odolnost rostlin k infekci patogenem *Leptosphaeria maculans*, viz obrázek 3.

Příklad 9

20 Indukce rezistence u řepky proti *Leptosphaeria maculans* filtrátem FG2

Filtrát FG2 byl aplikován postřikem na děložní listy desetidenních rostlin řepky (3 ml na 6 rostlin). Kontrolní rostliny byly ošetřeny vodou, jako pozitivní kontrola byl aplikován 32 μ M roztok BTH (0,4 mg komerčního přípravku BION® 50WG do 30 ml vody). 4 dny po ošetření byly
25 děložní listy infiltrovány injekční stříkačkou bez jehly suspenzí spor o koncentraci 10⁵ spor/ml tak, aby byla vyplněna celá plocha listu (cca 0,1 ml na jeden list). Jedenáct dní po inokulaci byla vyhodnocena plocha lézí programem APS Assess 2.0. Aplikace filtrátu FG2 statisticky významně zvyšuje odolnost rostlin k infekci patogenem *Leptosphaeria maculans*, viz obrázek 3.

30

Příklad 10

Indukce rezistence u řepky proti *Leptosphaeria maculans* frakcí F0

35 Frakce F0 byla aplikována postřikem na děložní listy desetidenních rostlin řepky (3 ml na 6 rostlin). Kontrolní rostliny byly ošetřeny vodou, jako pozitivní kontrola byl aplikován 32 μ M roztok BTH (0,4 mg komerčního přípravku BION® 50WG do 30 ml vody). 4 dny po ošetření byly děložní listy infiltrovány injekční stříkačkou bez jehly suspenzí spor o koncentraci 10⁵ spor/ml tak, aby byla vyplněna celá plocha listu (cca 0,1 ml najeden list). Jedenáct dní po inokulaci byla
40 vyhodnocena plocha lézí programem APS Assess 2.0. Aplikace frakce F0 statisticky významně zvyšuje odolnost rostlin k infekci patogenem *Leptosphaeria maculans*, viz obrázek 3.

Příklad 11

45

Indukce rezistence u řepky proti *Leptosphaeria maculans* frakcí F1

Frakce F1 byla aplikována postřikem na děložní listy desetidenních rostlin řepky (3 ml na 6 rostlin). Kontrolní rostliny byly ošetřeny vodou, jako pozitivní kontrola byl aplikován 32 μ M roztok
50 BTH (0,4 mg komerčního přípravku BION® 50WG do 30 ml vody). 4 dny po ošetření byly děložní listy infiltrovány injekční stříkačkou bez jehly suspenzí spor o koncentraci 10⁵ spor/ml tak, aby byla vyplněna celá plocha listu (cca 0,1 ml na jeden list). Jedenáct dní po inokulaci byla vyhodnocena plocha lézí programem APS Assess 2.0. Aplikace frakce F1 statisticky významně zvyšuje odolnost rostlin k infekci patogenem *Leptosphaeria maculans*, viz obrázek 3.

55

Příklad 12

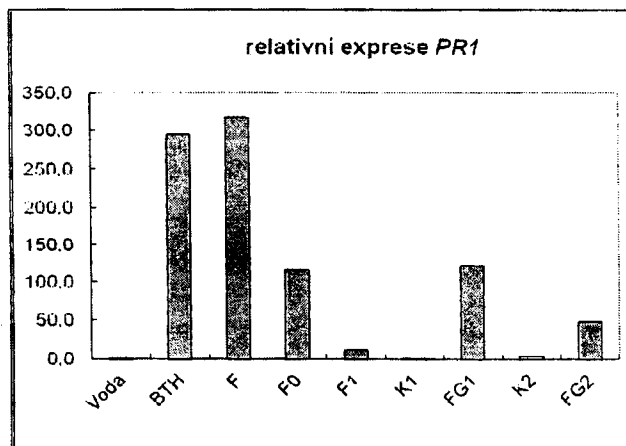
Indukce rezistence u *Arabidopsis thaliana* proti *Pseudomonas syringae* filtrátem F

5 Na listy 5týdenních rostlin *Arabidopsis thaliana* byl postříkem aplikován filtrát F. 4 dny po ošetření byly listy inokulovány ponořením do suspenze bakterií *Pseudomonas syringae* pv. *tomato* DC3000 v 10mM MgCl₂ o OD₆₀₀ = 0,5. Dva dny po inokulaci byly inokulované listy homogenizovány ve FastPrep®–24 Instrument (MP Bio) a homogenát byl v příslušných ředěních aplikován na kultivační médium KingB s rifampicinem (50 mg/l). Po 48 h inkubace při 26 °C byl nárůst bakterií v listech *A. thaliana* kvantifikován jako počet formujících se kolonií na médiu vztažený na mg čerstvé váhy listů (log₁₀CFU/mg čerstvé váhy). Aplikace filtrátu statisticky významně zvyšuje odolnost rostlin *A. thaliana* k infekci patogenem *Pseudomonas syringae* pv. *tomato* DC3000, viz obrázek 4.

PATENTOVÉ NÁROKY

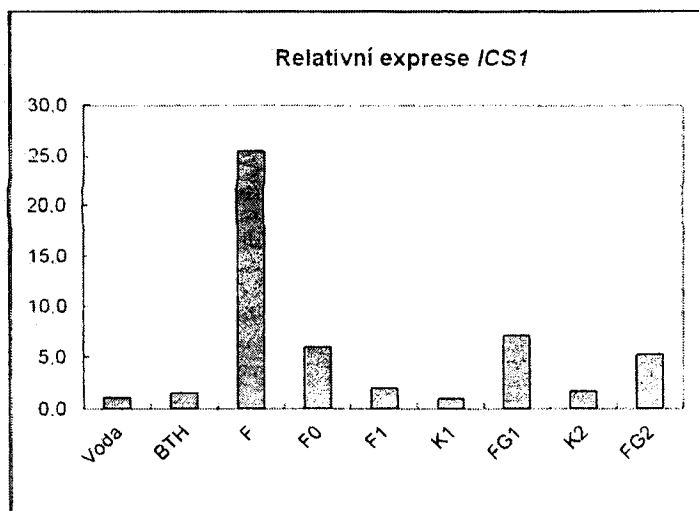
- 20
1. Přípravek na ochranu rostlin proti houbovým a bakteriálním patogenům, zejména řepky proti fómové hnilobě, **v y z n a č u j í c í s e t í m**, že obsahuje elicitory z mycelia *Leptosphaeria maculans*.
 - 25
 2. Způsob výroby přípravku na ochranu rostlin podle nároku 1, **v y z n a č u j í c í s e t í m**, že se *Leptosphaeria maculans* kultivuje v mediu alespoň 7 dnů při teplotě 20 až 28 °C, myceliem se homogenizuje, odstraní se lipidy, k homogenátu se přidá roztok proteinázy a směs se inkubuje 1 až 5 hodin při teplotě 20 až 40 °C, načež se po zfiltrování směs autoklávuje nejméně 1 hodinu při 120 °C a pak se znovu zfiltruje.
 - 30
 3. Způsob výroby podle nároku 2, **v y z n a č u j í c í s e t í m**, že se mycelium před homogenizací zfiltruje.
 - 35
 4. Způsob výroby podle nároku 2 nebo 3, **v y z n a č u j í c í s e t í m**, že se inkubace provádí za tmy.
 5. Způsob výroby podle kteréhokoli z nároků 2 až 4, **v y z n a č u j í c í s e t í m**, že se konečný filtrát upraví ředidlem.
 - 40
 6. Způsob výroby podle nároku 5, **v y z n a č u j í c í s e t í m**, že se jako ředidlo použije voda.
 - 45
 7. Způsob výroby podle kteréhokoli z nároků 2 až 6, **v y z n a č u j í c í s e t í m**, že se filtrát přečistí chromatografií na ionexu.

Obr. 1



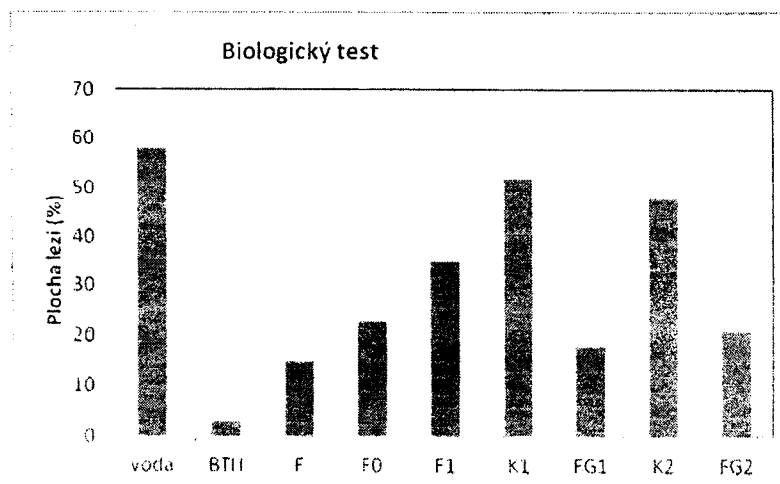
Relativní exprese genu *PR1* po ošetření rostlin řepky filtrátem F, frakcemi F0 a F1 a filtrátem FG1 a FG2. Positivní kontrola byla ošetřena BTH, negativní kontrola byla ošetřena vodou. K1 a K2 jsou kontroly ošetřené pouze roztokem α a β -glukosidasy (kontrola k frakci FG1 a FG2)

Obr. 2



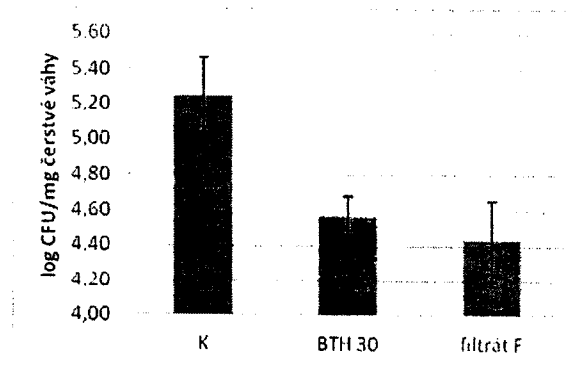
Relativní exprese genu *ICS1* po ošetření rostlin řepky filtrátem F, frakcemi F0 a F1 a filtrátem FG1 a FG2. Positivní kontrola byla ošetřena BTH, negativní kontrola byla ošetřena vodou. K1 a K2 jsou kontroly ošetřené pouze roztokem α a β -glukosidasy (kontrola k frakci FG1 a FG2)

Obr. 3



Indukce rezistence u rostlin řepky inokulovaných sporami *Leptosphaeria maculans* jednotlivými preparáty F, F0, F1, FG1 a FG2. Positivní kontrola byla ošetřena BTH, negativní kontrola byla ošetřena vodou. K1 a K2 jsou kontroly ošetřené pouze roztokem α a β -glukosidasy (kontrola k frakci FG1 a FG2).

Obr. 4



Indukce rezistence filtrátem F u rostlin *Arabidopsis thaliana* proti *Pseudomonas syringae*, K – kontrola byla inokulována 10 mM MgCl₂.

Konec dokumentu
