


UŽITNÝ VZOR

(11) Číslo dokumentu:

30 587

<p>(19) ČESKÁ REPUBLIKA</p>  <p>ÚŘAD PRŮMYSLOVÉHO VLASTNICTVÍ</p>	<p>(21) Číslo přihlášky: 2016-33002 (22) Přihlášeno: 02.11.2016 (47) Zapsáno: 18.04.2017</p>	<p>(13) Druh dokumentu: U1 (51) Int. Cl.: <i>C12Q 1/68</i> (2006.01) <i>C12N 15/11</i> (2006.01)</p>
--	---	---

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

(72) Původce:
Ing. Aleš Eichmeier, Ph.D., Rajhrad, CZ
Ing. Bc. Eliška Peňázová, Šumperk, CZ
Ing. Jakub Pečenka, Choryně, CZ

(54) Název užitého vzoru:
**Směs chemikálií k molekulární identifikaci
dřevokazných hub *Phomopsis* a
Phaeoacremonium sp. v pletivech révy vinné**

CZ 30587 U1

Směs chemikálií k molekulární identifikaci dřevokazných hub *Phomopsis* a *Phaeoacremonium* sp. v pletivech révy vinné

Oblast techniky

Směs pro detekci *Phomopsis* a *Phaeoacremonium* sp. – velmi významných patogenů révy vinné - využívá postupu real-time PCR se specifickými sondami.

Dosavadní stav techniky

Phomopsis je rodem hub, který způsobuje závažná onemocnění ve dřevě révy vinné, které se nazývá Phomopsisové odumírání révy (*Phomopsis* Dead Arm). *Phomopsis* se zdá být závažným patogenem severnějších oblastí, kde se pěstuje réva vinná jako je Česká republika nebo Německo (Eichmeier et al. 2016; Fischer a Kassemeyer 2003). *Phaeoacremonium* sp. je jedním ze zásadních patogenů, které způsobují onemocnění známé jako ESCA (Gramaje et al. 2015). 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. Jako první přivádí pozornost pěstitele k rozpoznání onemocnění symptomatické či odumírající výhony, potvrzení podezření spočívá v odhalení nekrotické hniloby po jejich rozřezání. U révy se symptomy neprojevují i několik let od počátku infekce, onemocnění není v polním měřítku zřejmé až do 8. roku (réva) od vysazení.

Přestože jsou tyto rody hub v současnosti jedním z neškodlivějších faktorů ve vinicích, jejich regulace není upravena vyhláškou ani zákonem. Celosvětové roční finanční náklady na nahrazení odumřelých rostlin révy ve vinohradech z důvodu napadení chorobami komplexu tzv. Trunk Diseases se odhadují na více než 1,132 miliardy euro (Hofstetter et al. 2012).

Houby rodu *Phaeoacremonium* způsobují díky obrovské rozmanitosti symptomů na listech a dřevě dvě formy onemocnění, chronickou a akutní. Hlavním hlediskem rozdělení je jejich kritičnost a rozsah poškození (Lecomte et al. 2012).

Chronická forma postihuje kmen, ramena, letorosty, listy i plody. K nejčastějšímu symptomu řadíme bílou hnilobu (Mugnai et al. 1999), způsobenou stopkovýtrusnými houbami (Lecomte et al. 2012), která způsobuje změnu z tvrdého dřeva na měkkou houbovou formu měnící barvu do krémově žluté až bělavé. Na příčném řezu lze pozorovat oddělení zdravého pletiva od shnilého tlustou černou až tmavě hnědou čarou. Tlení dřeva se rozšiřuje jak směrem nahoru, tak i dolů podél kmenu. Málokdy pokračuje přes místo roubování do kořenů. Malé, tmavě hnědé nebo černé tečky se shromažďují ve skupinách okolo letokruhů, ve dřevě v blízkosti dřeně. Na příčném řezu se skupiny teček jeví jako pruhy a na podélném jako sloupce. Z černých teček se často vyvíjejí růžovo hnědá až tmavě červeno hnědá místa především v centrálním sloupci kmenu a po okrajích poškozeného pletiva, čímž odděluje zdravé pletivo od napadeného. Hnědé útvary různých tvarů a struktur se objevují s výše zmíněnými změnami zbarvení na povrchu velkých řezných ran (Mugnai et al. 1999). Symptomy na listech se začínají objevovat na přelomu jara a léta (Lecomte et al. 2012). Na listech se objevují světle zelené až chlorotické tečky, které se zvětšují až do nekrotických skvrn ohraničené žilnatinou a okrajem listů, tzv. tygrovitost.

Vadnutí letorostů a plodů je způsobeno nefunkčností dřevních vodivých svazků (Mugnai et al. 1999) a možným stresem způsobeným nedostatkem vody v důsledku cévních okluzí (Van Alfen 1989). Na pokožce bobulí vznikají povrchové černé skvrny, výraznější u bílých odrůd, od toho odvozeno používané pojmenování „černé neštovice“. Symptomy na listech a plodech se nemusí projevit každý rok na stejném místě. Rozsáhlost poškození není specifická – často jsou poškozeny pouze některé bobule v hroznu, všechny hrozny na letorostu či část letorostů (Mugnai et al. 1999).

Akutní forma, označovaná jako apoplexie, nastává na přelomu jara a léta, kdy zprvu u zdravě vypadající rostliny začne bazipetálně uvadat listová stěna a třapina s plody sesychat. Během několika dní se zdravé zelené listy změni přes bledě zelenou až šedo zelenou na kompletně uschlé. Možnou příčinou rozvoje apoplexie je teplé léto, popř. konec jara, kdy po vydatných srážkách

následuje sucho. Tím se zahustí obsah toxických metabolitů a zvýší se jejich aktivita související se zvýšenou transpirací (Mugnai et al. 1999).

Do zapěstované rostliny se infekce dostává vzduchem přes neošetřené rány a při výrobě sazenic (Gramaje et al. 2015).

- 5 *Phomopsis* sp. na jaře působí typický slabý růst. Patogeny napadají všechny zelené části rostliny. Na listech se objevují malé světle zelené až žluté skvrny s nekrotickým středem. Při četnějším zastoupení skvrn odumírá celý list. Na letorostech se tvoří hnědé až černé nekrotické nepravidelně tvarované léze, které se během vegetace prodlužují a mohou i podélně praskat. Skvrny se nejčastěji objevují ve spodní části letorostu. Houby způsobují zesvětlení až vybělení borky vy-
- 10 zrávajících letorostů. Na světlé borce lze pozorovat nápadné černé plodničky pyknid. Infikované dřevo je na povrchu černé a na příčném řezu lze vidět klínovité nekrózy. Pletivo může být zasaženo i v kmenu a ramenech. Patogeny způsobují zkrácená internodia a odumírání letorostů. Tmavé nekrotické skvrny se mohou objevit na květenství a později i na zelených plodech. Při vyšší intenzitě infekce způsobují apoplektické odumírání. Výjimečně se může infekce projevit na
- 15 podzim, kdy se po deštivé periodě před sklizní objevují na plodech světle hnědé skvrny, které se zvětšují a hnědnou (Úrbez-Torres et al. 2013; Pine 1958).

Ke klasickým přístupům detekce patří odběr napadeného dřeva a kultivace dřevních částí na agarových médiích jako je PDA, PGA nebo MEA. Houby musí začít sporulovat a pak je vizuálně určen druh a rod hub dle projevu na agarových médiích a dle velikosti tvarů spor pod mikroskopem. V současnosti jsou využívány metody molekulární detekce, zaměřené zejména na oblast ribozomální sekvence ITS (internal transcribed spacer). Sekvenací tohoto úseku je možné přesně určit druh patogenu.

20

Všechny zmiňované metody analýzy houbových patogenů využívající morfologických pozorování jsou velmi náročné a jsou závislé na zkušenostech a dovednostech experimentátora. Sekvence ITS je časově náročná a stále poměrně nákladná.

25

Metody molekulární detekce jsou díky malým reakčním objemům náročné méně jak na objem investované práce, tak na množství potřebných zkušeností. Navíc jsou tyto metody mnohonásobně přesnější. Klíčovým prvkem pro tuto metodu je směs, která je podstatou přihlášky tohoto užitého vzoru.

30 Podstata technického řešení

Izolace patogenu

Pro přesnou detekci na molekulární detekci je nutné vhodně izolovat DNA patogenu.

- 1) Izolace patogenu ze symptomatického dřeva na Petriho misku
 - 2) Přímá izolace DNA patogenu ze symptomatického dřeva
- 35 1) Izolace patogenu ze symptomatického dřeva na Petriho misku

Je nutné analyzovat část kmenu, který je napaden. Pomocí pily a svěráku je třeba kmen příčně rozřezat. Z asi 1 cm plátků dřeva, které byly omyty 1 až 2 minuty v chlornanu sodném 4,7% je odebrána asi 5 mm×5 mm část napadeného dřeva. Těchto částí je na Petriho misku umístěno 5 až 7. Petriho miska obsahuje MEA s obsahem 0,5 g.L⁻¹ streptomycinu. Z rozrostlých kultur po 4 až

40 10 dnech je možné odebrat část pletiva k izolaci DNA.

- 2) Přímá izolace DNA patogenu ze symptomatického dřeva

Z části napadeného kmenu je odebrána část dřeva, asi 100 mg, ze kterého je přímo izolována DNA.

Izolace DNA

- 45 DNA je nejvhodnější izolovat komerčně dostupným kitem, určeným pro pletiva, tkáně či buněčné kultury, např. NucleoSpin Tissue (Macherey Nagel).

Simultánní molekulární detekce real time pcr

Nově designované primery a sondy

Primer 1	PHM_AE_ACT_q_fwd	TGTTTTCCGTAAGTCACCCC
Primer 2	PHM_AE_ACT_q_rev	ACCGATTCGTGTTGTTTCAT
5 Primer 3	PAE_B_q_fwd	GAACCCAACGCGACATCGATACTAA
Primer 4	PAE_B_q_rev	CCCACTGCCTACATACCT
Sonda 1	PHOMO-Taq	AGCGAGCATCAAGGCTAAC (FAM-BHQ1)
Sonda 2	PAE-Taq	AAACCATCTCTGGCGAGCAC (HEX-BHQ1)

Směs chemikálií k molekulární identifikaci dřevokazných hub *Phomopsis* a *Phaeoacremonium* sp

10	Nukleáz prostá voda (Ambion)	10,5 µl
	5X GoTaq® Flexi Buffer (Promega)	4,0 µl
	MgCl ₂ Solution, 25 mM (Promega)	1,2 µl
	GoTaq® G2 Flexi DNA Polymerase (5u/µl) (Promega)	0,2 µl
	Mix of 4 dNTPs (MCLab), 10mM each	0,2 µl
15	Primer 1 PHM_AE_ACT_q_fwd, 10 µM	1,0 µl
	Primer 2 PHM_AE_ACT_q_rev, 10 µM	1,0 µl
	Primer 3 PAE_B_q_fwd, 10 µM	1,0 µl
	Primer 4 PAE_B_q_rev, 10 µM	1,0 µl
	Sonda 1 PHOMO-Taq, 10 µM	0,4 µl
20	Sonda 2 PAE-Taq, 10 µM	0,4 µl
	DNA 0,5 až 5,0 µg	4,0 µl

TEPLOTNÍ PROFIL PRO REAL TIME INSTRUMENT

Reakce probíhala v přístroji Rotor Gene 3000 (Corbett Research). Teplotní profil pro reakci: úvodní denaturace 95 °C po dobu 3 minuty, následuje 40 cyklů 95 °C 40 s, 54 °C 40 s a 72 °C 40 s. Účinnost reakce pro rod *Phomopsis* (kanál pro FAM) je 91 % a účinnost reakce pro rod *Phaeoacremonium* (kanál pro HEX) je 89 %.

Kontrola detekce

Pro případné ověření detekce je možné PCR produkt vzniklý amplifikací v real time termocyklieru separovat na agarózovém gelu, a to o koncentraci 1,2 % s přídavkem 6 µl barviva GelRed (Biotium), po dobu 1 hodiny, 100 V. Na transiluminátoru lze pak ověřit, zda jsou PCR produkty přítomny, *Phaeoacremonium* sp. 202 bp, *Phomopsis* sp. 193 bp.

Příklady uskutečnění technického řešení

Zjištění přítomnosti patogenu v rostlinách révy vinné

Byly testovány keře révy vinné z různých lokalit Jižní Moravy, které vykazovaly některé z příznaků typické pro onemocnění ESCA a *Phomopsis*ového odumírání. Z různých částí vybraných kmenů révy vinné byly odebrány symptomatické části, prostřednictvím řezu, viz metodika výše - izolace houby a DNA.

Byla provedena vlastní detekce jak v dřevitých vzorcích, tak ve vzorcích z čistých kultur.

K evaluační detekci systému byly využity izoláty z České republiky a to, *Phomopsis fukushii* (NCBI Acc. Nos. KP255352), *Diaporthe rudis*, *Diaporthe eres*, *Phomopsis viticola* a *Phaeoacremoniu minimum*. Navržený detekční systém je na všechny uvedené druhy plně optimalizovaný.

Šíření těchto závažných houbových patogenů lze zabránit jedině používáním patogenů prostého množitelského materiálu a rychlé odstraňováním pozitivních rostlin z výsadeb.

Výzkum probíhal s podporou projektu MŠMT LD5140071, který je řešen v rámci akce COST FA1303.

5 Průmyslová využitelnost

V rutinní diagnostice houbových patogenů napadající dřevo révy vinné se obvykle používá kultivace patogenu na médiu, morfologická analýza (na misce, mikroskopicky) a PCR.

Navržený postup je výsledkem testování kombinací primerů a sond, které vykazovaly různou citlivost a specificitu. Kombinace finálně použité v tomto postupu poskytovaly nejspolehlivější detekci u napadených rostlin pěstovaných v podmínkách ČR. Navržený postup je výsledkem optimalizace i dalších problematických míst v obvykle používaných protokolech, které mohou způsobovat variabilitu anebo dokonce nesprávnost výsledků. Navržený postup také reflektuje aktuální poměr vyskytujících se houbových dřevokazných patogenů révy v ČR, kdy většina rostlin vykazujících příznaky napadení houbovým patogenem je napadená houbou rodu *Phomopsis* nebo *Phaeoacremonium*. Navržená molekulární analýza detekce je ve srovnání s dřívě používanými metodami velmi rychlá a přesná, navíc s možností kvantifikace patogenů v jediné reakci. Tím umožňuje rychle odhalovat infikované keře, a po jejich vykloučení snižovat riziko dalšího šíření těchto hospodářsky významných onemocnění v rámci dosud zdravých keřů.

Použité literární zdroje

- 20 Eichmeier, A., Peňázová, E., Pečenka, J., Baránková, K., Mynarzová, Z. (2016). First report on molecular detection of fungal trunk pathogens in grapevine wood focusing on Moravian certified mother plants. *Mitteilungen Klosterneuburg*, 66, 153-163.
- Fischer, M., & Kassemeyer, H. H. (2015). Fungi associated with Esca disease of grapevine in Germany. *VITIS-Journal of Grapevine Research*, 42(3), 109.
- 25 Gramaje, D., Mostert, L., Groenewald, J. Z., & Crous, P. W. (2015). *Phaeoacremonium*: from esca disease to phaeohyphomycosis. *Fungal biology*, 119(9), 759-783.
- Hofstetter, V., Buyck, B., Croll, D., Viret, O., Couloux, A., & Gindro, K. (2012). What if esca disease of grapevine were not a fungal disease?. *Fungal Diversity*, 54(1), 51-67.
- Lecomte, P., Darrieutort, G., Liminana, J. M., Comont, G., Muruamendiaraz, A., Legorburu, F. J., ... & Fermaud, M. (2012). New insights into esca of grapevine: the development of foliar symptoms and their association with xylem discoloration. *Plant Disease*, 96(7), 924-934.
- 30 Mugnai, L., Graniti, A., & Surico, G. (1999). Esca (black measles) and brown wood-streaking: two old and elusive diseases of grapevines. *Plant disease*, 83(5), 404-418.
- Pine, L., & Peacock, C. L. (1958). STUDIES ON THE GROWTH OF HISTOPLASMA CAPSULATUM IV.: Factors Influencing Conversion of the Mycelial Phase to the Yeast Phase. *Journal of bacteriology*, 75(2), 167.
- 35 Úrbez-Torres, J. R., Peduto, F., Smith, R. J., & Gubler, W. D. (2013). *Phomopsis dieback*: A grapevine trunk disease caused by *Phomopsis viticola* in California. *Plant Disease*, 97(12), 1571-1579.
- 40 Van Alfen, N. K. (1989). Reassessment of plant wilt toxins. *Annual Review of Phytopathology*, 27(1), 533-550.

NÁROKY NA OCHRANU

1. Směs chemikálií k molekulární identifikaci dřevokazných hub *Phomopsis* a *Phaeoacremonium* sp., vyznačující se tím, že je tvořena specifickými a pro dané rody unikátními sekvencemi oligonukleotidů, které jsou vhodné pro simultánní amplifikaci dvou sledovaných fragmentů dvou genů přítomných v popisovaných houbových patogenech – přesné složení směsi je následující:
- 5 Nukleáz prostá voda v objemu 10,5 jednotky (μ l); 5X pufr pro polymerázu v objemu 4,0 jednotek (μ l); $MgCl_2$ roztok 25 mM v objemu 1,2 jednotky (μ l); *Thermus aquaticus* DNA polymeráza (5u/ μ l) v objemu 0,2 jednotek (μ l); ekvimolární směs 4 deoxyribonukleotidtrifosfátů 10 mM každá báze) v objemu 0,2 jednotek (μ l); Primer 1 - (TGTTTTCCGTAAGTCACCCC), 10 μ M
- 10 v objemu 1,0 jednotky (μ l); Primer 2 - (ACCGATTCGTGTTGTTTCAT), 10 μ M v objemu 1,0 jednotky (μ l); Primer 3 - (GAACCCAACGCGACATCGATACTAA), 10 μ M v objemu 1,0 jednotky (μ l); Primer 4 - (CCCACTGCCTACATACCT), 10 μ M v objemu 1,0 jednotky (μ l); Sonda s fluorescenční značkou 6-karboxylfloresein - AGCGAGCATCAAGGCTAAC, 10 μ M
- 15 v objemu 0,4 jednotky (μ l); Sonda s fluorescenční značkou hexachloro-fluorescein - AAACCATCTCTGGCGAGCAC, 10 μ M v objemu 0,4 jednotky (μ l); DNA 0,5 až 5,0 μ g v objemu 4,0 jednotky (μ l).

Konec dokumentu
