

UŽITNÝ VZOR

(11) Číslo dokumentu:

32 225

(13) Druh dokumentu: **U1**

(51) Int. Cl.:

C12Q 1/68 (2018.01)
C12Q 1/6895 (2018.01)
C12Q 1/686 (2018.01)
C12Q 1/6844 (2018.01)
C12Q 1/6876 (2018.01)
C12N 15/11 (2006.01)

(19)
ČESKÁ
REPUBLIKA



ÚŘAD
PRŮMYSLOVÉHO
VLASTNICTVÍ

(21) Číslo přihlášky: **2018-35145**
(22) Přihlášeno: **04.07.2018**
(47) Zapsáno: **29.10.2018**

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

(72) Původce:
Ing. Aleš Eichmeier, Ph.D., Rajhrad, CZ
Ing. Filip Gazdík, Dolná Strehová, SK
Ing. et Bc. Eliška Peňázová, Šumperk, CZ
Ing. Jakub Pečenka, Choryně, CZ
Ing. Jana Čechová, Ph.D., Slavkov, CZ
doc. Mgr. Miroslav Baránek, Ph.D., Lednice, CZ

(54) Název užitého vzoru:
**Reakční směs k molekulární identifikaci
patogenní bakterie okurek Pseudomonas
amygdali pv. Iachrymans**

CZ 32225 U1

Reakční směs k molekulární identifikaci patogenní bakterie okurek *Pseudomonas amygdali* pv. *lachrymans*

5 Oblast techniky

Testovací metoda pro detekci *Pseudomonas amygdali* pv. *lachrymans* – velmi významného patogenu okurek - využívá postupu real-time PCR se specifickými primery.

10

Dosavadní stav techniky

Pseudomonas amygdali pv. *lachrymans* (PAL), syn. *Pseudomonas syringae* pv. *lachrymans* je gramnegativní bakterie patřící do skupiny *P. syringae*. Bakterie je tyčinkovitého tvaru o velikosti 15 0,5 až 1,0 a 1,0 až 3,0 µm. K pohybu bakteriálních buněk slouží flagellum (bičík). Zda patovar produkuje toxiny jako ostatní bakterie ze skupiny *P. syringae* je stále nejasné (Olczak-Woltman et al. 2009). Bakterie vyvolávají hypersenzitivní reakci, pokud jsou inokulovány na listy okurek (Agrios 2005).

20 PAL je patovarem, který způsobuje závažná onemocnění okurek, které se nazývá Bakteriální skvrnitost okurek. PAL je jedním z nejzávažnějších patogenů okurek v celosvětovém měřítku, a to i na území České republiky (Kúdela a Lebel 1997; Olczak-Woltman et al. 2008; Meng et al. 2016). Bakterie způsobuje symptomy jako ostře vyhraněné skvrny na listech, které časem 25 žloutnou. Symptomy infekce se mohou projevit na listech, stoncích i plodech okurek. Při vhodných environmentálních podmínkách pro život bakterie napadené rostliny rychle odumírají. Ve vlhkém počasí je bakterie šířena prostřednictvím kapek bakteriálního slizu, který je exudován z napadených částí listu na jeho spodní straně. V suchém počasí se exudát stává bělavým povlakem. Později infikované části odumírají. Bakterie přežívá zimu v osivu a také na rostlinných zbytcích. Z těchto míst je v následujícím roce bakterie šířena na děložní lístky a listy, 30 které bakterii přijímají prostřednictvím stomat a poranění a mohou se systematicky šířit do ostatních rostlinných částí a orgánů. Kontrola spočívá v užívání neinfikovaného osiva, rezistentních odrůd, dodržování střídání plodin, a využití baktericidů obsahujících měď (Agrios 2005). V Evropě není možné využívat k ochraně rostlin antibiotika.

35 Bakterie je přenosná osivem, a je tedy zapotřebí disponovat kvalitní a citlivou metodou detekce tohoto patogenu, která bude vhodná k detekci bakterie v osivu či v sadbě. V případě, že bakterie je diseminována osivem a její biologický cyklus je úspěšně zahájen, je velmi náročné bakteriální onemocnění léčit. V současnosti jsou detekční metody PAL závislé zejména na izolaci patogenu a biochemické identifikaci, což je časově velmi náročné. Molekulární techniky k identifikaci 40 fytopatogenních organismů jako je PCR, real-time PCR nebo BIO-PCR, jsou využívány poměrně často (Schaad et al. 2007; Cottyn et al. 2011; Fan et al. 2015). Ekonomická významnost onemocnění se násobí zvýšenou produkcí okurek v podmínkách skleníků a fóliovníků, kde převládá vysoká relativní vzdušná vlhkost a vysoká teplota (Elwakil et al. 2001).

45 Všechny zmiňované metody analýzy fytopatogenních bakterií jsou velmi náročné, jsou závislé na zkušenostech a dovednostech experimentátora a pro detekci PAL v osivu nedisponují dostatečnou přesností. Další využitelnou metodou je masivně paralelní sekvenace úseku 16S, která je časově náročná a stále poměrně nákladná.

50 Metoda real-time PCR je díky malým reakčním objemům méně náročná jak na objem investované práce, tak na množství potřebných zkušeností. Navíc je tato metoda mnohonásobně citlivější než metody založené na klasické PCR.

55

Podstata technického řešení

5 Reakční směs k molekulární identifikaci patogenní bakterie okurek *Pseudomonas amygdali* pv. *lachrymas* je řešením problematiky diagnostiky závažného onemocnění okurek.

Izolace DNA

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

1) Izolace DNA z pletiva rostlinného orgánu – kořene, stonku, listu

Je nutné analyzovat rostlinný orgán, který je napaden. Z části napadeného orgánu odebrat cca 100 mg pletiva, z tohoto množství pak přímo izolovat DNA.

15 2) Izolace DNA z osiva

Je třeba mít k dispozici alespoň 50 semen. Semena vyset na Petriho misku obsahující vhodné medium, např. NA (nutrient agar) s přidavkem 0,5 g.L⁻¹ cyklohexamidu, po 10 kusech. Po 3 dnech ze všech 5 Petriho misek odebrat osivo i narostlé bakteriální kolonie a izolovat DNA.

20 Pro oba způsoby je vhodné využít dostupný kit, určený pro pletiva, tkáně či buněčné kultury.

MOLEKULÁRNÍ DETEKCE REAL-TIME PCR

NOVĚ DESIGNOVANÉ PRIMERY

25

Primer 1	Pal_Fwd_nfrB	GTACGGTATGCAAGCGATCTTC
Primer 2	Pal_Rev_nfrB	CCGAAACAGCAGGTAACGGT

MASTERMIX

30

2× HotSybr qPCR Kit	10,0 µl
Nukleáz prostá voda	6,4 µl
Primer 1 Pal_Fwd_nfrB, 10µM	0,8 µl
Primer 2 Pal_Rev_nfrB, 10µM	0,8 µl
DNA	0,5 až 5,0 µg

35

TEPLOTNÍ PROFIL PRO REAL-TIME INSTRUMENT

40 Reakce probíhala v přístroji pro real-time PCR. Teplotní profil pro reakci: úvodní denaturace 95 °C po dobu 3 minut, následuje 35 cyklů 95 °C 40 s, 51 °C 40 s a 72 °C 40 s. Účinnost reakce je 77 %. Analýza křivky tání spočívá ve využití teplot od 50 °C do 99 °C, kdy probíhá změna o 1 °C/5 s.

KONTROLA DETEKCE

45

Kontrola velikosti produktu, a tím specifity PCR reakce, spočívá v analýze teploty tání vzniklého PCR produktu. Teplota tání vzniklého produktu by měla odpovídat hodnotě 88,8 °C. Pro případné ověření detekce je možné PCR produkt vzniklý amplifikací v real-time termocykleru separovat na agarózovém gelu. Gel připravit v koncentraci 1,2 % s přidavkem 6 µl barviva GelRed na 150 ml 1% TAE pufru, separace by měla proběhnout po dobu 1 hodiny, v podmínkách 100 V. Prostřednictvím transiluminátoru lze pak ověřit, zda jsou PCR produkty přítomny, velikost požadovaného produktu je 241 pb.

55

Příklady uskutečnění technického řešení

5 ZJIŠTĚNÍ PŘÍTOMNOSTI PATOGENU V ROSTLINÁCH OKUREK

Byly testovány okurky, které vykazovaly některé z příznaků typické pro Bakteriální skvrnitost okurek. Z různých částí vybraných rostlin byly odebrány symptomatické části, prostřednictvím řezu, dále byla použita metodika pro izolaci DNA popsaná výše. Byla provedena vlastní detekce
10 ve vzorcích z listových pletiv.

K evaluaci detekčního systému byly využity tři bakteriální izoláty z UK (467, 3544, 3967), dva z USA (542, 543) a dva z Maďarska (1096, 1436), izoláty byly získány z The National Collection of Plant Pathogenic Bacteria (Sand Hutton, UK). Navržený detekční systém je na všechny
15 uvedené referenční bakteriální izoláty a reálné vzorky napadených rostlin okurek plně optimalizovaný.

Šíření tohoto závažného bakteriálního patogenu lze zabránit jedině používáním patogenů prostého množitelského materiálu a rychlým odstraněním pozitivních rostlin z výsadeb. Výzkum probíhal s podporou projektu TAČR TJ01000274.
20

Průmyslová využitelnost

V rutinní diagnostice bakteriálních patogenů napadajících pletiva zelenin se obvykle používá kultivace patogenu na médiu, morfologická analýza (na Petriho misce, mikroskopie) a PCR. Navržený postup je výsledkem testování různých kombinací primerů odvozených z různých částí
25 genomu PAL, které vykazovaly různou citlivost a specifitu. Finálně použitá kombinace primerů poskytovala nejspolehlivější detekci bakterie v napadených rostlinách i v napadeném osivu.
30 Navržený postup optimalizuje i další problematické body v obvykle používaných protokolech, které mohou způsobovat variabilitu anebo dokonce nesprávnost výsledků. Navržená molekulární analýza detekce je ve srovnání s dříve používanými metodami velmi rychlá a přesná, navíc s možností kvantifikace.

Popsanou reakční směs pro precizní a rychlou detekci závažného bakteriálního patogenu okurek je možné dodávat diagnostickým laboratorům jako kit. Zavedením tohoto inovovaného postupu diagnostiky patogenní bakterie okurek lze spolehlivě a citlivě detekovat *Pseudomonas amygdali*
35 pv. *lachrymans*. Tím je možné hned v prvních fázích napadení odhalovat a odstraňovat infikované rostliny nebo osivo pro výsev, a tím snižovat riziko dalšího šíření tohoto hospodářsky významného patogenu.
40

Použité literární zdroje

Agrios, G. N. (2005). Plant Pathology. 5th eds. *Department of Plant Pathology. University of Florida. United States of America.*
45

Cottyn, B., Baeyen, S., Pauwelyn, E., Verbaendert, I., De Vos, P., Bleyaert, P., ... & Maes, M. (2011). Development of a real-time PCR assay for *Pseudomonas cichorii*, the causal agent of midrib rot in greenhouse-grown lettuce, and its detection in irrigating water. *Plant pathology*, 60(3), 453-461.
50

Elwakil, M. A., & Farag, A. Nabil, I. Hanna and A. Gomah (2001) Court of Infection with *Pseudomonas syringae* pv. *Lachrymans* in Cucumber. *Pakistan Journal of Biological Sciences*, 4(6), 635-638.
55

- 5 Fan, X., Zhang, J., Yang, L., Wu, M., Chen, W., & Li, G. (2015). Development of PCR-based assays for detecting and differentiating three species of *Botrytis* infecting broad bean. *Plant Disease*, 99(5), 691-698.
- Kúdela, V., & Lebeda, A. (1997). Response of wild *Cucumis* species to inoculation with *Pseudomonas syringae* pv. *lachrymans*. *Genetic Resources and crop evolution*, 44(3), 271-275.
- 10 Olczak-Woltman, H., Schollenberger, M., Mądry, W., & Niemirowicz-Szczytt, K. (2008). Evaluation of cucumber (*Cucumis sativus*) cultivars grown in Eastern Europe and progress in breeding for resistance to angular leaf spot (*Pseudomonas syringae* pv. *lachrymans*). *European journal of plant pathology*, 122(3), 385-393.
- 15 Olczak-Woltman, H., Schollenberger, M., & Niemirowicz-Szczytt, K. (2009). Genetic background of host-pathogen interaction between *Cucumis sativus* L. and *Pseudomonas syringae* pv. *lachrymans*. *Journal of applied genetics*, 50(1), 1-7.
- 20 Meng, X., Chai, A., Chen, L., Shi, Y., Xie, X., Ma, Z., & Li, B. (2016). Rapid detection and quantification of viable *Pseudomonas syringae* pv. *lachrymans* cells in contaminated cucumber seeds using propidium monoazide and a real-time PCR assay. *Canadian journal of plant pathology*, 38(3), 296-306.
- 25 Schaad, N. W., Berthier-Schaad, Y., & Knorr, D. (2007). A high throughput membrane BIO-PCR technique for ultra-sensitive detection of *Pseudomonas syringae* pv. *phaseolicola*. *Plant pathology*, 56(1), 1-8.

30

NÁROKY NA OCHRANU

- 35 **1.** Reakční směs k molekulární identifikaci patogenní bakterie *Pseudomonas amygdali* pv. *lachrymans*, **vyznačující se tím**, že je tvořena specifickými a pro daný rod unikátními sekvencemi oligonukleotidů, vhodnými pro amplifikaci cílového fragmentu genu *nfrB* kódovaného popisovaným bakteriálním patogenem – přesné složení směsi je následující: nukleáz
 40 prostá voda v objemu 6,4 µl; 2× HotSybr qPCR Kit v objemu 10,0 µl;
 Primer 1 - GTACGGTATGCAAGCGATCTTC, 10µM v objemu 0,8 µl;
 Primer 2 - CCGAAACAGCAGGTAACGGT, 10µM v objemu 0,8 µl a testovaná DNA
 v množství 0,5 až 5,0 µg v objemu 2,0 µl.

45