

UŽITNÝ VZOR

(11) Číslo dokumentu:

32 757

(13) Druh dokumentu: **U1**

(51) Int. Cl.:

C12Q 1/68 (2018.01)
C12Q 1/686 (2018.01)
C12Q 1/6844 (2018.01)
C12Q 1/6876 (2018.01)
C12Q 1/689 (2018.01)

(19)
ČESKÁ
REPUBLIKA



ÚŘAD
PRŮMYSLOVÉHO
VLASTNICTVÍ

(21) Číslo přihlášky: **2019-35927**
(22) Přihlášeno: **19.02.2019**
(47) Zapsáno: **09.04.2019**

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

(72) Původce:
Ing. Eliška Peňázová, Šumperk, CZ
Ing. Aleš Eichmeier, Ph.D., Rajhrad, CZ
Ing. Lucie Ragasová, Lipovník, SK
Ing. Jana Čechová, Ph.D., Slavkov, CZ
doc. Mgr. Miroslav Baránek, Ph.D., Lednice, CZ

(54) Název užitého vzoru:
**Reakční směs k simultánní molekulární
identifikaci patogenních bakterií rajčat
Clavibacter michiganensis subsp.
michiganensis, Pseudomonas syringae pv.
tomato a rodu Xanthomonas metodou
multiplex Real-time PCR**

CZ 32757 U1

Reakční směs k simultánní molekulární identifikaci patogenních bakterií rajčat *Clavibacter michiganensis* subsp. *michiganensis*, *Pseudomonas syringae* pv. *tomato* a rodu *Xanthomonas* metodou multiplex Real-time PCR

5

Oblast techniky

Testovací metoda pro detekci bakterií *Clavibacter michiganensis* subsp. *michiganensis*, *Pseudomonas syringae* pv. *tomato* a rodu *Xanthomonas* patogenních na rajčatech - využívá postupu Real-time PCR se specifickými primery.

10

Dosavadní stav techniky

Bakterie *Clavibacter michiganensis* subsp. *michiganensis*, *Pseudomonas syringae* pv. *tomato* a komplex rodu *Xanthomonas* (*X. euvesicatoria*, *X. vesicatoria*, *X. gardneri* a *X. perforans*) představují významné patogeny rajčat, které způsobují celosvětově značné ekonomické škody. Jejich výskyt byl potvrzen ve všech hlavních pěstitelských oblastech rajčat, a to v polní i skleníkové produkci (Özdemir, 2009; Jones *et al.*, 2016).

15

Jednou z nejzávažnějších chorob rajčat je bakteriální vadnutí způsobované patogenem *Clavibacter michiganensis* subsp. *michiganensis* (Cmm). V rámci České republiky je bakterie Cmm dle Vyhlášky č. 215/2008 Sb., o opatřeních proti zavlečení a rozšiřování škodlivých organismů rostlin a rostlinných produktů sledována jako karanténní při výskytu na rajčatech určených k pěstování, může se však vyskytnout i na jiných druzích rodu *Solanum* L. nebo *Capsicum* L. Dle databáze organizace EPPO (European Plant Protection Organization) je tato bakterie ve většině zemí Asie, Afriky a Evropy zařazena do tzv. A2 listu organismů, které jsou doporučeny ke kontrole jako karanténní (OEPP/EPPO, 2018). Prvotní příznaky infekce zahrnují žloutnutí až hnědnutí cévních svazků, následované výskytem světle zelených, někdy vodnatých lézí na okrajích listů. Napadené části postupně nekrotizují, listy se jednostranně rolují a ve velmi krátkém časovém úseku dochází k zavadnutí celé rostliny (Blancard, 2012). K rozvoji choroby přispívají teploty mezi 28 a 35 °C a vyšší vzdušná vlhkost (Forster *et* Echandi, 1973; Sharabani *et al.*, 2014).

20

25

30

35

40

45

50

55

60

65

70

75

80

85

90

95

100

105

110

115

120

125

130

135

140

145

150

155

160

165

170

175

180

185

190

195

200

205

210

215

220

225

230

235

240

245

250

255

Podobné podmínky často vedou ke zvýšenému výskytu bakteriálních skvrnitostí rajčete, způsobovaných rodem *Xanthomonas*. Jako původce těchto chorob byla do roku 2004 uváděna bakterie *Xanthomonas campestris* pv. *vesicatoria*. Na základě studie Jones *et al.* (2004) byl tento patogen dále taxonomicky rozlišen do 4 rodů – *X. vesicatoria* (Xv), *X. euvesicatoria* (Xe), *X. gardneri* (Xg) a *X. perforans* (Xp), kdy jsou všechny 4 rody na rajčeti patogenní. V současnosti jsou tyto rody v databázi EPPO vedeny na A2 listu (OEPP/EPPO, 2018). V rámci legislativy České republiky je původce bakteriálních skvrnitostí veden pod označením *X. campestris* pv. *vesicatoria* (*X. vesicatoria*) a je řazen mezi organismy karanténní při výskytu na rostlinách rajčat a paprik. Mezi hlavní symptomy napadení patří drobné, hnědé až černé skvrny na listech, stonku a plodech. Infekce může způsobovat opad listů, významné poškození plodů a s tím související ztráty na výnosu (Pernezny *et al.*, 2003). V počátečních stádiích infekce jsou příznaky velmi podobné bakteriální tečkovitosti rajčete způsobované bakterií *Pseudomonas syringae* pv. *tomato* (Pst). Rozvoj tečkovitosti může být také podpořen vysokou vlhkostí, ale bakterie Pst má teplotní optimum replikace nižší, a to v rozmezí 13 až 25 °C. Nekrotické léze způsobené bakterií se vyskytují na listech, stoncích i plodech. Přestože bakterie Pst není řazena mezi regulované organismy, může její výskyt způsobit značné ekonomické škody (Preston, 2000).

Společným znakem bakterií Cmm, Pst a rodu *Xanthomonas* je jejich přenos osivem, což vede k vysokému riziku jejich šíření. Zvyšující se požadavky na rychlost, citlivost a spolehlivost detekce patogenů vedou vzhledem ke globalizaci mezinárodního obchodu s množitelským

55

materiálem k upřednostňování molekulárních metod založených na PCR (Polymerase chain reaction) před jinými kultivačními, serologickými či hybridizačními metodami. Pro patogeny Cmm, Pst i druhy rodu *Xanthomonas* škodících na rajčeti byly vytvořeny detekční systémy založené na standardní PCR (Cmm - Pastrík *et al.*, 1999; Kokošková *et al.*, 2010; Pst - Zaccardelli *et al.*, 2005; Fath-Allah *et al.*, 2006; Xe/Xv - Koenraadt *et al.*, 2009; Moretti *et al.*, 2009) i Real-time PCR (Bach *et al.*, 2003; Fanelli *et al.*, 2007; Oosterhof *et al.*, 2011; Araujo *et al.*, 2012). Rozšíření možnosti detekce použitím tzv. přístupu multiplex (více patogenů detekovaných v jedné PCR reakci), zajistilo výraznou úsporu vzhledem k časové náročnosti a množství práce k dosažení žádoucí informace o přítomnosti či nepřítomnosti daných patogenů. V tomto ohledu byl pro identifikaci patogenních bakterií rajčat Cmm, Pst a *X. campestris* pv. *vesicatoria* navržen detekční systém multiplex PCR (Özdemir, 2009). Nevýhodou této reakce je nutnost separace produktů na gelu pro vizualizaci výsledků. Použitím nově navrhovaného přístupu multiplex Real-time PCR tento proces odpadá a zapojením fluorescenčně značených sond specifických pro dané patogeny lze navíc dosáhnout vyšší specifity, jednoduché identifikace amplifikovaného organismu i stanovení jeho množství v analyzovaném vzorku.

Podstata technického řešení

Reakční směs k simultánní molekulární identifikaci patogenních bakterií rajčat *Clavibacter michiganensis* subsp. *michiganensis*, *Pseudomonas syringae* pv. *tomato* a rodu *Xanthomonas* metodou multiplex Real-time PCR umožňuje simultánní stanovení uvedených patogenů v testovaných vzorcích přístupem zajišťujícím vysokou citlivost a specifitu detekce. Navržené DNA oligonukleotidy umožňují specifickou detekci jednotlivých bakterií za pomoci fluorescenčně značených TaqMan[®] sond.

Izolace DNA

Použití přístupu multiplex Real-time PCR pro specifickou detekci patogenů vyžaduje izolaci DNA z testovaných vzorků ve vysoké kvalitě. Vhodné je použití izolačního kitu určeného pro rostlinná pletiva či bakteriální kultury v závislosti na testovaném materiálu.

A) V případě izolace DNA z rostlinných pletiv je nutné odebrat vzorek ze symptomatické části rostliny, případně z pletiv zahrnujících cévní svazky, jimiž se cílové patogeny šíří. Hmotnost odebraného vzorku se pohybuje v rozmezí 50 až 100 mg pletiva v závislosti na požadavcích použitého izolačního protokolu.

B) K izolaci DNA z bakteriální kultury pěstované na vhodném kultivačním médiu je vstupním materiálem peleta z bakteriálních buněk vzniklá centrifugací bakteriální suspenze. DNA je následně izolována z cca 40 mg bakteriálních buněk.

Molekulární detekce multiplex Real-time PCR

Nově navržené oligonukleotidy

primer 1: CMM-16-23S_e_fwd 5'-GCACCTTCTGGGTGTGTCTG-3'
 primer 2: CMM-16-23S_e_rev 5'-TGTGATCCACCGAAAACCG-3'
 primer 3: PST-hrpL_e_fwd 5'-TTTCAACATGCCAGCAAACC-3'
 primer 4: PST-hrpL_e_rev 5'-GATGCCCCCTCTACCTGATGA-3'
 TaqMan sonda 2: PST-hrpL_TP 5'-GCTGAACCTGATCCGCAATCAC-3' (FAM -BHQ1)
 primer 5: XE_lepA_aec_fwd 5'-TGATCATCGATTCTGGT-3'
 primer 6: XE_lepA_cea_rev 5'-GTTGATCCAGCCCACTTC-3'
 TaqMan sonda 3: XE_lepA_TP 5'-CCAGCGAGACCACGCCCA-3' (Cy5-BHQ2)

Sonda pro detekci Cmm (převzato ze studie Bach *et al.*, 2003), která je plně funkční s nově navrženými primery CMM-16-23S_e_fwd a CMM-16-23S_e_rev.

TaqMan sonda 1: CMM-TP 5'-TTCCGTCGTCCTGTTGGATG-3' (nově použité značení HEX-BHQ1)

5

Reakční směs pro multiplex Real-time PCR

	2xHoTaq Real-time PCR kit	10,0 µl
	nukleáz prostá voda	2,0 µl
10	primer 1 CMM-16S-23S_e_fwd (10 µM)	0,8 µl
	primer 2 CMM-16-23S_e_rev (10 µM)	0,8 µl
	primer 3 PST-hrpL_e_fwd (10 µM)	0,8 µl
	primer 4 PST-hrpL_e_rev (10 µM)	0,8 µl
	primer 5 XE_lepA_aec_fwd (10 µM)	0,8 µl
15	primer 6 XE_lepA_cea_rev (10 µM)	0,8 µl
	TaqMan sonda 1 CMM-TP (10 µM)	0,4 µl
	TaqMan sonda 2 PST-hrpL_TP (10 µM)	0,4 µl
	TaqMan sonda 3 XE_lepA_TP (10 µM)	0,4 µl
	templátová DNA (0,5 až 5,0 µg)	2,0 µl

20

Podmínky reakce multiplex Real-time PCR

Reakce probíhala v přístroji pro Real-time PCR schopném simultánního snímání fluorescence barviv FAM, HEX a Cy5, které byly použity pro značení sond specifických pro jednotlivé patogeny (Lightcycler 480 Instrument II, Roche Life Science). Teplotní program se skládal z počáteční denaturace po dobu 5 min při teplotě 95 °C následované 45 cykly složenými ze dvou kroků - denaturace při 95 °C po dobu 15 s a hybridizace primerů při 60 °C po dobu 1 min.

25

30 Příklady uskutečnění technického řešení

Zjištění původce bakteriálních skvrnitostí na rostlinách rajčat

Systém byl optimalizovaný na souboru izolátů získaných ze sbírky National Collection of Plant Pathogenic Bacteria ve Velké Británii. Testovací soubor sestával z 6 izolátů Cmm, 6 izolátů Pst, 4 izolátů Xe, 4 izolátů Xv a po jednom izolátu Xg a Xp. Specifita reakce byla dále ověřena na 5 taxonomicky blízké příbuzných izolátech testovaných bakterií (*C. m. subsp. insidiosus*, *C. m. subsp. tessellarius*, *P. syringae* pv. *syringae*, *P. amygdali* pv. *lachrymans* a *X. campestris* pv. *campestris*) a 2 izolátech z jiných druhů bakterií patogenních na rostlinách rajčat (*Pseudomonas corrugata*, *Pectobacterium carotovorum* subsp. *carotovorum*). Navržený detekční systém byl plně validován pro tento soubor izolátů, přičemž dochází ke specifické detekci cílových patogenů bez falešně pozitivních či falešně negativních výsledků.

40

Následně byl navržený detekční systém úspěšně použit k určení původců choroby na rostlinách rajčat vykazujících vizuální příznaky bakteriálního napadení na listech (černé skvrny, postupné vadnutí rostlin). Ze symptomatických listů byly odebrány vzorky, ze kterých byla izolována celková DNA. Testování molekulární metodou proběhlo výše popsaným systémem multiplex Real-time PCR.

45

Včasně zjištění původce choroby a eliminace napadených rostlin z produkčních ploch představuje nezbytný krok pro udržení dobrého zdravotního stavu porostu a monitoringu karanténních organismů. Výzkum probíhal s podporou projektu TAČR TJ01000274.

50

55

Průmyslová využitelnost

Metody na bázi PCR dnes představují základní detekční techniky v diagnostické praxi. Minimalizace pracovních činností a finančních nákladů použitím simultánní detekce více patogenů v jedné reakci umožňuje zefektivnění a zrychlení testování, které je důležité zejména u karanténních patogenů. Vzhledem k vysoké podobnosti symptomů bakteriálního napadení v počátečních fázích infekce je pro výběr správného opatření přesná identifikace kauzálního patogenu nezbytná. Nově navržená kombinace detekčních systémů pro bakterie Cmm, Pst a rod *Xanthomonas* přináší funkční systém rychlé a specifické detekce, který může být používán diagnostickými laboratořemi státní sféry i při preventivní kontrole zakoupeného množitelského materiálu ze zahraničí pěstebními společnostmi.

Použitá literatura

- 15 Araújo, E. R., Costa, J. R., Ferreira, M. A. S. V., Quezado-Duval, A. M. (2012). Simultaneous detection and identification of the *Xanthomonas* species complex associated with tomato bacterial spot using species-specific primers and multiplex PCR. *Journal of Applied Microbiology*, 113, 1479–1490.
- 20 Bach, H.-J., Jessen, I., Schloter, M., Munch, J. C. (2003). A TaqMan-PCR protocol for quantification and differentiation of the phytopathogenic *Clavibacter michiganensis* subspecies. *Journal of Microbiological Methods*, 52, 85–91.
- 25 Blancard, D. (2012). *Tomato Diseases: A Colour Handbook*. 2nd eds. London: Academic Press. 688 s. ISBN 9780123877376.
- Fanelli, V., Cariddi, C., Finetti-Sialer, M. (2007). Selective detection of *Pseudomonas syringae* pv. tomato using dot blot hybridization and real-time PCR. *Plant Pathology*, 56(4), 683–691.
- 30 Fath-Allah, M. M., Ali, M. H., Rasmi, M. R. (2006). Using hrpL gene specific primers to detect *Pseudomonas syringae* pv. Tomato by polymerase chain reaction. *Egyptian Journal of Experimental Biology (Agric.)*, 2: 7-13.
- 35 Forster R. L., Echandi, E. (1973). Relation of age of plants, temperature and inoculum concentration to bacterial canker development in resistant and susceptible *Lycopersicon* spp. *Phytopathology*, 63, 773–777.
- 40 Jones, J. B., Zitter, T. A., Momol, T. M., Miller, S. A. (2016). Part I: Infectious Diseases. In *Compendium of Tomato Diseases and Pests*. 2nd eds. The American Phytopathological Society, s. 15-119. ISBN 978-0-89054-434-1.
- 45 Jones, J. B., Lacy, G. H., Bouzar, H., Stall, R. E., Schaad, N. W. (2004). Reclassification of the *Xanthomonads* associated with Bacterial spot disease of tomato and pepper. *Systematic and Applied Microbiology*, 27(6), 755-762.
- Koenraadt, H., van Betteray, B., Germain, R., Hiddink, G., Jones, J. B., Oosterhof, J., Rijlaarsdam, A., Roorda, P., Wouldt, B. (2009). Development of specific primers for the molecular detection of bacterial spot of pepper and tomato. *Acta Horticulturae*, 808, 99–102.
- 50 Kokošková, B., Mráz, I., Fousek, J. (2010) Comparison of specificity and sensitivity of immunochemical and molecular techniques for determination of *Clavibacter michiganensis* subsp. *michiganensis*. *Folia Microbiologica*, 55 (3), 239–244 .

- Moretti, C., Amatulli, M. T., Buonauro, R. (2009). PCR-based assay for the detection of *Xanthomonas euvesicatoria* causing pepper and tomato bacterial spot. *Letters in Applied Microbiology*, 49(4), 466-471.
- 5 OEPP/EPPO. (2018). EPPO A2 List of pests recommended for regulation as quarantine pests, version 2018-09. Dostupné z: https://www.eppo.int/ACTIVITIES/plant_quarantine/A2_list.
- Oosterhof, J., Berendsen, S. (2011). The development of a specific Real-Time TaqMan for the detection of *Clavibacter michiganensis* subsp. *michiganensis* (Abstr.). *Phytopathology*, 101, S133.
- 10 Özdemir, Z. (2009). Development of a multiplex PCR assay for the simultaneous detection of *Clavibacter michiganensis* subsp. *michiganensis*, *Pseudomonas syringae* pv. *tomato* and *Xanthomonas axonopodis* pv. *vesicatoria* using pure cultures. *Journal of Plant Pathology*, 91, 495 – 497.
- 15 Patrik, K. H., Rainey, F. A. (1999). Identification and differentiation of *Clavibacter michiganensis* subspecies by polymerase chain reaction-based techniques. *Journal of Phytopathology*, 147: 687–693.
- 20 Pernezny, K., Roberts, P. D., Murphy, J. F., Goldberg, N. P. (2003). Compendium of pepper diseases. Minnesota: The American Phytopathological Society. 88 s. ISBN 978-0-89054-300-9.
- Preston, G. (2000). *Pseudomonas syringae* pv. *tomato*: the right pathogen, of the right plant, at the right time. *Molecular Plant Pathology*, 1(5), 263-275.
- 25 Sharabani, G., Manulis-Sasson, S., Chalupowicz, L., Borenstein, M., Shulhani, R., Lofthouse, M., Sofer, M., Frenkel, O., Dror, O., Shtienberg, D. (2014). Temperature at the early stages of *Clavibacter michiganensis* subsp. *michiganensis* infection affects bacterial canker development and virulence gene expression. *Plant Pathology*, 63(5), 1119-1129.
- 30 Zaccardelli, M., Spasiano, A., Bazzi, C., Merighi, M. (2005). Identification and in planta detection of *Pseudomonas syringae* pv. *tomato* using PCR amplification of *hrpZ*(Pst). *European Journal of Plant Pathology*, 111(1), 85-90.
- 35

NÁROKY NA OCHRANU

40

1. Reakční směs pro simultánní detekci a identifikaci patogenů *Clavibacter michiganensis* subsp. *michiganensis*, *Pseudomonas syringae* pv. *tomato* a rodu *Xanthomonas* **vyznačující se tím**, že je tvořena kombinací specifických sekvencí unikátních oligonukleotidů k detekci uvedených bakterií v rámci jedné reakce, přičemž přesné složení směsi je následující:
- 45

Nukleáz prostá voda v objemu 2 µl; 2×HoTaq Real-time PCR kit v objemu 10 µl;
 primer 1 CMM-16-23S_e_fwd GCACCTTCTGGGTGTGTCTG v objemu 0,8 µl;
 primer 2 CMM-16-23S_e_rev TGTGATCCACCGGAAAACCG v objemu 0,8 µl;
 50 primer 3 PST-hrpL_e_fwd TTTCAACATGCCAGCAAACC v objemu 0,8 µl;
 primer 4 PST-hrpL_e_rev GATGCCCTCTACCTGATGA v objemu 0,8 µl;
 primer 5 XE_lepA_aec_fwd TGATCATCGATTCCTGGT v objemu 0,8 µl;
 primer 6 XE_lepA_cea_rev GTTGATCCAGCCCACTTC v objemu 0,8 µl;
 TaqMan sondy 1 CMM-TP TTCCGTCGTCCTGTTGTGGATG v objemu 0,4 µl;
 55 TaqMan sondy 2 PST-hrpL_TP GCTGAACCTGATCCGCAATCAC v objemu 0,4 µl;

TaqMan sondy 3 XElepA_TP CCAGCGAGACCACGCCCA v objemu 0,4 μ l
a testovaná DNA v množství 0,5 až 5 μ g v objemu 2 μ l.