

UŽITNÝ VZOR

(11) Číslo dokumentu:

34 420

(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: **2020-37880**

(22) Přihlášeno: **15.08.2020**

(47) Zapsáno: **29.09.2020**

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

(72) Původce:
Ing. Filip Gazdík, Dolná Strehová 99102, SK
Ing. Aleš Eichmeier, Ph.D., Rajhrad, CZ
Ing. Jana Čechová, Ph.D., Slavkov, CZ
doc. Mgr. Miroslav Baránek, Ph.D., Lednice, CZ

(54) Název užitého vzoru:
**Sada pro simultánní molekulární
identifikaci patogenů celeru *Septoria
apiicola* a *Plenodomus libanotidis***

Sada pro simultánní molekulární identifikaci patogenů celeru *Septoria apiicola* a *Plenodomus libanotidis*

5 Oblast techniky

Předkládané technické řešení se týká sady pro simultánní detekci významných houbových patogenů celeru, *Septoria apiicola* a *Plenodomus libanotidis*, metodou real-time PCR.

10

Dosavadní stav techniky

Septoria apiicola Spegazzini je houbový patogen z čeledi Leptosphaeriaceae způsobující tečkovitost listů celeru, jednu z nejvýznamnějších houbových onemocnění celeru (*Apium graveolens* L.). Projevuje se nekrotizujícími skvrnami na listech a řapících celeru, které postupně splývají dohromady. Pro rozvoj tohoto onemocnění je potřebné vlhké počasí, za kterého se šíří pyknidiosporami a může způsobit velké škody v polní produkci. Existuje několik možností prevence, a to ošetření osiva horkou vodou tzv. hot-water treatment s přídavkem thiramu, použití osiva staršího tří let, kdy pyknidiospory už nejsou považovány za životaschopné, sterilizace půdy, nebo pravidelné používání fungicidů.

Plenodomus libanotidis (Fuckel) Gruyter, Aveskamp & Verkley - teleomorfa *Leptosphaeria libanotis* resp. *libanotidis* - (syn. *Plenodomus libanotis*, *P. rostrupii*, *Phoma rostrupii*, *Pleospora libanotis*) je houbové onemocnění způsobující hnědou hnilobu kořenové zeleniny. Projevuje se tmavě hnědou hnilobou na kořenech, nekrotizujícími skvrnami na listech s viditelnými černými pyknidami a padáním klíčnicích rostlin. Šíří se rozstříkem na okolité rostliny za deštivého počasí a přežívá na osivu. Jako v předešlém případě je nejlepší strategií pro preventivní ochranu používání zdravého osiva a rostlinného materiálu a rychlá a přesná detekce patogenu.

30 Až dosud byly metody detekce těchto dvou patogenů založeny zejména na pozorování morfologie hub, což vyžaduje velkou odbornou zkušenost, a je pomalé.

V rutinní diagnostice houbových patogenů napadajících pletiva zelenin se obvykle používá kultivace patogenů na médiu, morfologická analýza (na Petriho misce, mikroskopicky) a PCR.

35

Pro zlepšení možností prevence patogenů *Septoria apiicola* a *Plenodomus libanotidis* je potřebná detekce, která přesně a rychle detekuje patogeny ve vzorku, při snížení náročnosti pro pracovníky, i při snížení nákladů.

40

Podstata technického řešení

Předmětem předkládaného technického řešení je sada pro detekci patogenů celeru *Septoria apiicola* a *Plenodomus libanotidis* metodou duplexní real-time PCR, vyznačující se tím, že obsahuje:

45

set pro detekci *Septoria apiicola*:

forward primer o sekvenci CACCACCCACAAAATCAA

50

reverse primer o sekvenci GCACCTTACGAGAAATCA

sondu o sekvenci CCCCCAGAACCCAAAAA;

55 a set pro detekci *Plenodomus libanotidis*

forward primer o sekvenci CTCTTGCTCTGTGTGTTG

reverse primer o sekvenci GTGGTTTTGGTTTTGCCT

5

sondu o sekvenci ATTTGTTTCCTTGGTGGGCTT.

Objasnění výkresů

10

Obrázek č. 1. Cílová amplifikovaná sekvence s vyznačením míst nasedání primerů a sondy pro detekci *Septoria apiicola*. Jako referenční sekvence je využit sbírkový kmen CBS 400.54, sekvence 18S malé podjednotky ribozomálního RNA genu.

15

Obrázek č. 2. Cílová amplifikovaná sekvence s vyznačením míst nasedání primerů a sondy pro detekci *Plenodomus libanotidis*. Jako referenční sekvence je využit sbírkový kmen CBS 113795, sekvence ribozomálního RNA genu.

20

Ve výhodném provedení je jedna sonda označena kombinací fluoroforu HEX a zhášedce BHQ1, a druhá sonda je označena kombinací fluoroforu FAM a zhášedce BHQ1.

25

Uvedené primery a sondy lze s výhodou využívat v Mastermixu s HoTaq Real-Time PCR Kitem a nukleáz prostou vodou. Reakční směs se smíchá s templátovou DNA extrahovanou z rostlinného pletiva, např. stonku, listu, kořene zeleniny, nebo z osiva.

25

Navrhovaná metoda simultánní detekce obou patogenů s využitím duplex real-time PCR představuje nenáročný, nenákladný a rychlý způsob detekce. Metoda je citlivější než metody založené na klasické PCR.

30

Navržený postup je výsledkem testování různých kombinací primerů a sond, které vykazovaly různou specifitu k amplifikaci referenčních sekvencí cílových patogenů. Zvolená finální kombinace čtyř primerů a dvou sond poskytovala nejspolehlivější simultánní detekci obou patogenů jak v rostlinném pletivu, tak v osivu. Navržená metoda detekce je rychlá a oproti jiným metodám poskytuje možnost simultánní detekce dvou patogenů v jedné reakci.

35

Příklady uskutečnění technického řešení

40

1. Extrakce DNA z rostlinného pletiva – stonek, list, kořen.

Z části napadeného orgánu 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.

45

2. Extrakce DNA z osiva.

Vyseje se alespoň 50 semen na Petriho misky (10 semen na misku) obsahující médium NA (Nutrient Agar) s přísávkem $0,5 \text{ g} \cdot \text{l}^{-1}$ streptomycinu pro eliminaci růstu bakterií. Po 3 dnech se odebere z Petriho misek osivo i s narostlými koloniemi hub a izoluje se DNA pomocí kitu NucleoSpin Tissue (Macherey Nagel) podle instrukcí výrobce.

50

Detekce patogenů metodou real-time PCR v duplexním provedení:

Pro samotnou detekci byly použity primery a sondy podle předkládaného technického řešení:

Název	Označení	Sekvence (5'-3')
Forward Primer 1	SAA-A1	CACCACCCACAAAATCAA
Reverse Primer 2	SAA-E1	GCACCTTACGAGAAATCA
Forward Primer 3	PL-AE1	CTCTTGCTCTGTGTGTTG
Reverse Primer 4	PL-EA1	GTGGTTTTGGTTTGCCT
Sonda 1	SA-TP1	CCCCCAGAACCCAAAAA (HEX-BHQ1)
Sonda 2	PL-TP1	ATTTGTTTCCTTGGTGGGCTT (FAM-BHQ1)

5

Reakce byla prováděna s použitím mastermixu o následujícím složení:

Reagencie	Množství
2× HoTaq Real-Time PCR Kit	10,0 µl
Nukleáz prostá voda	6,0 µl
Forward Primer 1 (SAA-A1) 10µM	0,4 µl
Reverse Primer 2 (SAA-E1) 10µM	0,4 µl
Forward Primer 3 (PL-AE1) 10µM	0,4 µl
Reverse Primer 4 (PL-EA1) 10µM	0,4 µl
Sonda 1 (SA-TP1) 10µM	0,2 µl
Sonda 2 (PL-TP1) 10µM	0,2 µl
Templát (DNA) 0,5-5,0 µg	2,0 µl

Teplotní profil pro Real-time instrument

10

Reakce probíhala v přístroji Rotor Gene 3000. Teplotní profil pro reakci: úvodní denaturace při 95 °C po dobu 3 minuty, následuje 40 cyklů 95 °C 40 s, 50 °C 40 s a 72 °C 40 s. Účinnost reakce pro *Septoria apiicola* (kanál pro HEX) je 85 % a účinnost reakce pro *Plenodomus libanotidis* (kanál pro FAM) je 99 %.

15

Kontrola detekce

Pro ověření detekce je možné PCR produkty vzniklé amplifikací v real-time termocyklu separovat na agarózovém gelu (1,2%) s přidavkem fluorescenčního barviva, po dobu cca 1 hodiny při napětí 100 V. Na transiluminátoru pak lze vizualizovat vzniklé PCR produkty a potvrdit přítomnost na základě jejich velikosti, 198 pb (párů bází) pro *Septoria apiicola* a 107 pb pro *Plenodomus libanotidis*.

20

Výsledky

25

Byly testovány rostliny celeru (celer 6 až 10) a mrkve (mrkev 1 až 5) náhodně odebrané na území ČR, které vykazovaly symptomy napadení patogeny *Septoria apiicola* a *Plenodomus libanotidis*. Z listů těchto rostlin byla izolována DNA, podle již zmíněné metodologie a byla provedena vlastní detekce pomocí simultánní molekulární identifikace real-time PCR.

30

Dále bylo otestováno osivo celeru získané od různých dodavatelů (OS1 až OS5). Pro evaluaci detekčního systému byly využity dva izoláty *Septoria apiicola* (CBS 116465) a *Plenodomus libanotidis* (CBS 113795). Jako negativní kontrola byla použita DNA extrahovaná z rostliny mrkve kultivované *in vitro*. Detekční systém je plně optimalizovaný pro detekci obou houbových patogenů celeru.

35

Tabulka č. 1 popisující výsledné detekce patogenů v rámci výše popsaných vzorků.

Rostlina	<i>Septoria</i>	<i>Plenodomus</i>
mrkev-1	-	+
mrkev-2	-	-
mrkev-3	-	-
mrkev-4	-	-
mrkev-5	-	-
celer-6	+	+
celer-7	+	+
celer-8	+	+
celer-9	+	+
celer-10	+	+
kontrola bez DNA	-	-
negativní kontrola	-	-

Izolát	<i>Septoria</i>	<i>Plenodomus</i>
OS1	-	+
OS2	+	+
OS3	+	+
OS4	+	+
OS5	-	-
kontrola bez DNA	-	-
negativní kontrola	-	-

- 5 Šíření těchto závažných houbových patogenů lze zabránit jedině používáním patogenů prostého množitelského materiálu a včasným odstraňováním infikovaných rostlin z výsadeb. Výzkum probíhal s podporou projektu TAČR TJ02000356.

Průmyslová využitelnost

- 10 Popsanou reakční směs pro precizní a rychlou duplexní detekci dvou významných houbových patogenů celeru je možné dodávat diagnostickým laboratorům jako kit. Zavedením tohoto inovovaného postupu diagnostiky patogenních hub celeru lze precizně detekovat *Septoria apiicola* a *Plenodomus libanotidis* v pletivech nebo osivu celeru. Tímto způsobem je možné identifikovat
 15 infikované rostliny na poli a rovněž detekovat infekci ještě před výsevem a předejít tak významným ztrátám v produkci.

NÁROKY NA OCHRANU

- 5 1. Sada pro simultánní molekulární identifikaci patogenů celeru *Septoria apiicola* a *Plenodomus libanotidis* metodou real-time PCR, **vyznačující se tím**, že obsahuje:

set pro detekci *Septoria apiicola*:

10 forward primer o sekvenci CACCACCCACAAAATCAA

reverse primer o sekvenci GCACCTTACGAGAAATCA

sondu o sekvenci CCCCCAGAACCCAAAAA;

- 15 a set pro detekci *Plenodomus libanotidis*:

forward primer o sekvenci CTCTTGCTCTGTGTGTTG

20 reverse primer o sekvenci GTGGTTTTGGTTTGCCT

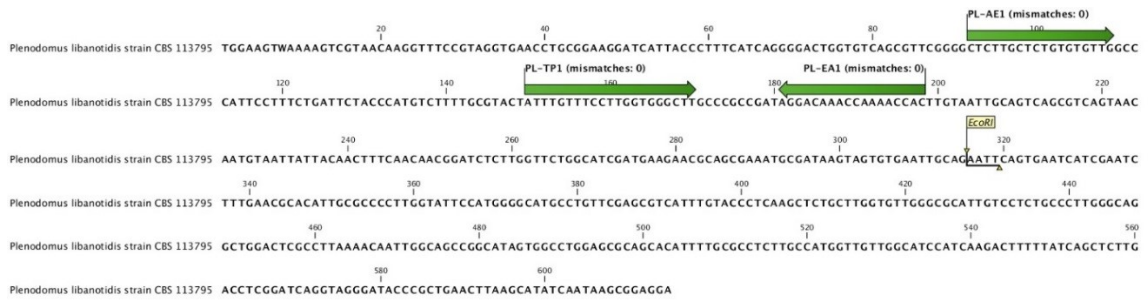
sondu o sekvenci ATTTGTTTCCTTGGTGGGCTT.

- 25 2. Sada podle nároku 1, **vyznačující se tím**, že jedna sonda je označena kombinací fluoroforu HEX a zhášeče BHQ1, a druhá sonda je označena kombinací fluoroforu FAM a zhášeče BHQ1.

2 výkresy



Obr. 1



Obr. 2