

UŽITNÝ VZOR

(11) Číslo dokumentu:

34 533

(13) Druh dokumentu: **U1**

(51) Int. Cl.:

C12Q 1/689 (2018.01)
C12N 15/31 (2006.01)
C12N 15/11 (2006.01)
C12N 15/55 (2006.01)
C12R 1/64 (2006.01)

(19)
ČESKÁ
REPUBLIKA



ÚŘAD
PRŮMYSLOVÉHO
VLASTNICTVÍ

(21) Číslo přihlášky: **2020-37881**
(22) Přihlášeno: **15.08.2020**
(47) Zapsáno: **16.11.2020**

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

(72) Původce:
Bc. Ing. Eliška Peňázová, Ph.D., Šumperk, CZ
Ing. Lucia Ragasová, Hlohovec, CZ
Ing. Jana Čechová, Ph.D., Slavkov, CZ
Ing. Jan Wohlmuth, Tábor, CZ
Ing. Aleš Eichmeier, Ph.D., Rajhrad, CZ

(54) Název užitého vzoru:
**Sada prumerů pro specifickou detekci
bakterie Xanthomonas hortorum pv.
carotae**

CZ 34533 U1

Sada primerů pro specifickou detekci bakterie *Xanthomonas hortorum* pv. *carotae*

Oblast techniky

5

Předkládané technické řešení se týká detekčního systému metody real-time PCR pro určení přítomnosti bakterie *Xanthomonas hortorum* pv. *carotae* patogenní na mrkvi.

Dosavadní stav techniky

Bakterie *Xanthomonas hortorum* pv. *carotae* (Xhc, synonymum *X. campestris* pv. *carotae*, *X. carotae*) je celosvětově rozšířený patogen způsobující závažné ekonomické ztráty zejména v porostech mrkve (*Daucus carota* L.). Dalšími hostitelskými druhy mohou být rostliny celeru, fenyklu, kopru, koriandru, libečku, petržele či pastináku, přítomnost bakterie však často nevyvolává typické příznaky napadení. Způsobená choroba, bakteriální spála mrkve, se vyznačuje malými, nepravidelnými skvrnami na listech, stoncích a řapících, které mohou vyústit ve vodnaté až nekrotické léze. V případě příznivých klimatických podmínek, které zahrnují teploty 25 až 30 °C a ovlhčení listů, dochází k rychlé kolonizaci listů bakterií, což může vyústit až v úplné odlistění rostlin. Rozvoj choroby v době květu způsobuje infekci osiva, jehož prostřednictvím se patogen šíří do dalších produkčních oblastí.

Obecně se symptomy onemocnění začnou na rostlinách rozvíjet až při výskytu bakterie v množství 10^6 až 10^5 CFU (kolonií tvořících jednotek) v gramu listového pletiva. Asymptomatické rostliny tak slouží jako skrytý zdroj infekce a v období projevu symptomů je použití ochranných opatření již neúčinné. Včasná detekce představuje významný nástroj k odhalení přítomnosti bakterie v porostu či samotném osivu. Tradičními metodami detekce bakterie je kultivace výluhů a oplachů rostlinných pletiv a osiva na živných médiích. Mezinárodní asociace ISTA (International Seed Testing Association) doporučuje pro detekci bakterie Xhc v osivu použití semi-selektivních médií MKM, MD5A a mTBM s následnou detekcí přítomných bakterií metodou real-time PCR (Detection of *Xanthomonas hortorum* pv. *carotae* on carrot seed, Version 2, ISF, 2019).

Doporučený protokol real-time PCR vyžaduje použití kombinace tří primerových párů, tří TaqMan® sond a jedné MGB („minor groove binder“) sondy, navržených pro specifickou detekci části regulátoru transkripce *TetR* skupiny a markeru Xhc3S bakterie Xhc a oblasti 16S ribozomální RNA univerzální pro všechny bakterie. Detekční limit protokolu není uveden. Při použití pouze specifické simplex real-time PCR z tohoto protokolu dle Temple *et al.* (Quantitative molecular detection of *Xanthomonas hortorum* pv. *carotae* in carrot seed before and after hot-water treatment, *Plant Disease*, 2013) je uváděna senzitivita 10^1 CFU/ml vzorku získaného z čisté kultury bakterie Xhc. Využití pro detekci bakterie přímo z rostlinných pletiv nebylo autory testováno. Pro možnost kvantifikace živých buněk Xhc byla optimalizována metoda LAMP (Loop-mediated amplification) s barvivem PMA (propidium monoazid), které interkaluje do DNA buněk s narušenou buněčnou stěnou a svým navázáním na tuto DNA pak umožňuje detekci pouze životaschopných buněk. Tímto způsobem je možné za pomoci pěti primerů detekovat řádově 10^1 CFU/ml vzorku (Temple *et al.*, 2013: Quantitative molecular detection of *Xanthomonas hortorum* pv. *carotae* in carrot seed before and after hot-water treatment, *Plant Disease*).

45

Detekce bakterie Xhc metodou real-time PCR byla publikována pouze pro systém na bázi TaqMan® sondy. Ekonomicky výhodnější přístup s barvivem SYBR Green vykazující dostatečnou specificitu a senzitivitu reakce dosud publikován nebyl.

Podstata technického řešení



Předmětem předkládaného technického řešení je sada pro detekci patogenu mrkve *Xanthomonas hortorum* pv. *carotae* metodou real-time PCR vyznačující se tím, že obsahuje:

5

forward primer o sekvenci CAATTGCCCTCATCTACGCA

a reverse primer o sekvenci CTTTCATGCAACTGCGACGAC

- 10 pro amplifikaci části genu *hpaP* (*hypersensitive response and pathogenicity associated phosphatase*) bakterie *Xanthomonas hortorum* pv. *carotae* o velikosti 177 pb nacházející se v genomu této bakterie (pozice nukleotidů 13800 – 13976 v celogenomové sekvenci izolátu M081 dostupné v databázi GeneBank/NCBI, přístupové číslo AEEU01000082):


 CGCCTCGAGCGATCTGTCGACAATTGCCCTCATCTACGCAAGGGCGTTGCGCTTGG
 CAGCGCTGCGGGTCCGTGATCGTCGCTGGCAGCATCCACCACTTCCGGCAGCGTC
 GGATCGTCGTCGTCGCCGTCCTCCGGCAACACCGTGTCCGGCAATCCGGCCAGCA
 CGCTGCTCAGGCGTTCGTCGTCGAGTTGCATGAAGCTGACACGTTGCGTGGCACG


- 15 Gen *hpaP* hraje významnou roli v regulaci exprese genů sekrečního systému typu III, zejména genů *hrp* klastru (*hypersensitivity response and pathogenicity*), a je nezbytný pro virulenci a patogenitu bakterie *Xhc*. Delece *hpaP* genu vede také ke změnám v motilitě bakteriálních buněk a snížené toleranci ke stresu.
- 20 Uvedené primery lze s výhodou využívat v mastermixu 2X HotSybr qPCR Kit (MCLAB) nebo Luna® Universal qPCR Master Mix (New England Biolabs) spolu s nukleáz prostou vodou. Reakční směs se smíchá s DNA izolovanou z rostlinného pletiva, např. z listů nebo osiva mrkve.
- 25 Navrhovaná metoda detekce bakterie *Xanthomonas hortorum* pv. *carotae* prostřednictvím real-time PCR představuje rychlý, nenáročný způsob detekce vyznačující se vysokou specificitou a senzitivitou. Použití barviva SYBR Green snižuje ekonomickou náročnost testování.

Příklady uskutečnění technického řešení

30

Izolace DNA

Prvním krokem detekce byla izolace DNA z rostlinného pletiva mrkve či osiva podezřelého na přítomnost bakterie *Xanthomonas hortorum* pv. *carotae*.

35

a) Izolace DNA z rostlinného pletiva – např. řapík, list

Z části orgánu vykazující symptomy napadení se odebere 50 až 100 mg pletiva, ze kterého se následně izoluje DNA prostřednictvím kitu DNeasy® Plant Mini Kit (Qiagen) podle instrukcí výrobce.

40

b) Izolace DNA z osiva

- 45 Na Petriho misku s pevným Luria-Bertani médiem obohaceným o cyklohexamid (0,05 g.l⁻¹ média) se vysejí 2 až 3 g testovaného osiva mrkve ve třech opakováních. Po dvou dnech kultivace vzorků ve tmě při 28 °C se z misek odebere osivo i s narostlými koloniemi bakterií a izoluje se DNA pomocí kitu DNeasy® Plant Mini Kit (Qiagen) podle instrukcí výrobce.

Detekce patogenu metodou real-time PCR

Pro detekci bakterie *Xanthomonas hortorum* pv. *carotae* byly použity primery podle předkládaného technického řešení:

5

Název	Označení	Sekvence (5' - 3')
Primer1	hpaP_fwd	CAATTGCCCTCATCTACGCA
Primer2	hpaP_rev2	CTTCATGCAACTGCGACGAC

Reakce byla prováděna s použitím mastermixu následujícího složení:

Reagencie	Množství
2X HotSybr qPCR Kit	10,0 µl
nukleáz prostá voda	6,4 µl
Primer 1 (hpaP_fwd) 10µM	0,8 µl
Primer 2 (hpaP_rev2) 10µM	0,8 µl
templátová DNA (0,5 až 5,0 µg)	2,0 µl

10 Teplotní profil pro reakci

Reakce probíhala v přístroji Rotor Gene 3000. Teplotní profil reakce se skládá z úvodní denaturace při 95 °C po dobu 2 minut a 40 cyklů sestávajících z 95 °C po dobu 15 s a 60 °C po dobu 45 s. Následuje postupné zvyšování teploty pro potřeby melt analýzy v rozsahu od 50 °C do 99 °C s počátečním krokem 30 s při 50 °C a následující teplotní změnou 1 °C každých 5 s.

15

Výsledky

System byl optimalizovaný na souboru 8 izolátů bakterie *Xanthomonas hortorum* pv. *carotae* získaných ze sbírky National Collection of Plant Pathogenic Bacteria ve Velké Británii, National Collection of Agricultural and Industrial Microorganism v Maďarsku a sběrů symptomatických rostlin v rámci České republiky. Specificita reakce byla dále ověřena na 10 taxonomicky blízké příbuzných druzích rodu *Xanthomonas* škodících na zeleninách (*X. axonopodis* pv. *phaseoli*, *X. campestris* pv. *armoraciae*, *X. campestris* pv. *campestris*, *X. campestris* pv. *incanae*, *X. campestris* pv. *raphani*, *X. cucurbitae*, *X. euvesicatoria*, *X. gardneri*, *X. pisi*, *X. vesicatoria*), 5 izolátech dalších bakteriálních patogenů čeledi miříkovitých (*Pseudomonas cichorii*, *P. marginalis* pv. *pastinaceae*, *P. syringae* pv. *apii*, *P. syringae* pv. *coriandricola*, *P. syringae* pv. *syringae*), 1 izolátu blízké příbuzného rodu *Stenotrophomonas* a 2 izolátech skládkových bakterií způsobujících měkkou hnilobu kořenů mrkve (*Pectobacterium atrosepticum*, *Pectobacterium carotovorum* subsp. *carotovorum*).

30 Detekční systém byl také ověřen na genomické DNA izolované dle uvedené metodologie ze zdravých rostlin mrkve (*Daucus carota* L. kultivary Darina, Korina, Sylva), petržele (*Petroselinum crispum* (Mill.) A. W. Hill.), celeru (*Apium graveolens* L.) a libečku (*Levisticum officinale* W. D. J. Koch) a zdravého i infikovaného osiva mrkve (kultivar Sylva). Testování vzorků probíhalo vždy v triplicátu.

35 Reakce byla optimalizována pro koncentrace bakterie Xhc v rozmezí 10⁷ až 10⁰ CFU.ml⁻¹, přičemž senzitivita reakce dosahovala řádu jednotek bakterií v testovaném vzorku s hodnotou Ct = 35 (amplifikace ve 35. cyklu reakce). Standardní křivka reakce byla popsána lineární funkcí $y = -3,29x + 37,35$ a koeficientem R² o hodnotě 0,99381. Účinnost reakce byla 101 %.

40 Navržený detekční systém byl plně validován pro tento soubor izolátů, přičemž byla potvrzena specifická detekce přítomnosti bakterie *Xanthomonas hortorum* pv. *carotae* na základě výsledků melt analýzy s teplotou tání cílového produktu 92,1 ± 0,4 °C.

V případě amplifikace produktů u vzorků DNA získaných z necílových bakterií či zdravých rostlin čeledi Apiaceae se teploty tání přítomných produktů pohybovaly v rozmezí 78 až 81 °C, s výjimkou bakterie *Pectobacterium carotovorum* subsp. *carotovorum*, kdy byl amplifikován produkt s teplotou tání 86 °C.

5

Protokol pro real-time PCR detekci bakterie Xhc doporučený asociací ISTA nebyl s navrhovaným řešením porovnáván, neboť představuje reakci obsahující kombinaci tří TaqMan® sond a jedné MGB sondy a při praktickém testování je jeho použití ekonomicky velmi náročné. Na rozdíl od detekce dle Temple *et al.* (2013), byl navrhovaný protokol optimalizován i pro použití při detekci bakterie Xhc ve vzorcích izolovaných přímo z rostlinných pletiv, a to jak z listů, tak osiva.

10

Průmyslová využitelnost

15 Popsanou reakční směs k detekci bakterie *Xanthomonas hortorum* pv. *carotae* je možné dodávat diagnostickým laboratorům jako kit. Zavedením tohoto postupu diagnostiky lze uvedenou bakterii detekovat v parenchymatických pletivech i osivu mrkve. Včasné zjištění původce choroby a eliminace napadených rostlin z produkčních ploch představuje nezbytný krok pro udržení dobrého zdravotního stavu porostu a zabránění šíření patogenu v semenářských porostech.

20

NÁROKY NA OCHRANU

- 5 1. Sada primerů pro specifickou detekci bakterie *Xanthomonas hortorum* pv. *carotae* metodou real-time PCR vyznačující se tím, že obsahuje nukleotidové sekvence:

Forward primer CAATTGCCCTCATCTACGCA

Reverse primer CTTCATGCAACTGCGACGAC.

10