

UŽITNÝ VZOR

(11) Číslo dokumentu:

34 598

(13) Druh dokumentu: **U1**

(51) Int. Cl.:

C12Q 1/689 (2018.01)

C12R 1/38 (2006.01)

C12N 15/11 (2006.01)

(19)
ČESKÁ
REPUBLIKA



ÚŘAD
PRŮMYSLOVÉHO
VLASTNICTVÍ

(21) Číslo přihlášky: **2020-38052**

(22) Přihlášeno: **01.10.2020**

(47) Zapsáno: **30.11.2020**

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

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

(54) Název užitého vzoru:
**Sada pro molekulární identifikaci patogenní
bakterie celeru *Pseudomonas syringae* pv.
apii metodou real-time PCR**

Sada pro molekulární identifikaci patogenní bakterie celeru *Pseudomonas syringae* pv. *apii* metodou real-time PCR

5 Oblast techniky

Předkládané technické řešení se týká sady pro detekci patogenní bakterie celeru *Pseudomonas syringae* pv. *apii* využívající postupu real-time PCR se specifickými primery.

10

Dosavadní stav techniky

Bakterie *Pseudomonas syringae* pv. *apii* (Jagger) Young, Dye & Wilkie, dále jen *Psa* (syn. *Pseudomonas apii*; *Pseudomonas jaggeri*), poprvé popsána roku 1921 (Jagger, 1921), představuje jeden z nejvýznamnějších bakteriálních patogenů celeru. Jedná se o tyčinkovitou, gram-negativní, aerobní bakterii s jedním polárním bičíkem, která tvoří na KB mediu (King's B) modré fluorescenční kolonie. Napadá celer (*Apium graveolens* L.) i celer řapíkatý (*Apium graveolens* var. *dulce* Mill.). Způsobuje bakteriální skvrnitost listů celeru a projevuje se malými vodnatými skvrnami na listech (o průměru do 5 mm) s okrouhlým nebo hranatým okrajem. Skvrny postupně žloutnou, nekrotizují a usychají. Za příznivých podmínek se skvrny slévají dohromady a celý list odumírá.

Příznaky napadení celeru *Psa* jsou velice podobné napadení bakterií *Pseudomonas syringae* pv. *coriandricola*, která se ale na celeru vyskytuje jen vzácně. Doposud nebyl publikován žádný detekční systém pro identifikaci *Psa* na celeru. Patogen způsobuje významné ztráty na produkci a snížení kvality řapíkatého celeru. Jako u většiny patogenů zelenin je nejúčinnější ochranou prevence, tedy používání patogenů prostého množitelského materiálu.

Navrhovaný detekční systém pro identifikaci patogenu *Psa* na molekulární úrovni za pomoci metody real-time PCR je rychlou a přesnou metodou pro ověření přítomnosti patogenu v množitelském materiálu, která pomůže snížit výskyt tohoto patogenu v zemědělské produkci.

Podstata technického řešení

35

Předmětem předkládaného technického řešení je sada pro detekci patogenu celeru *Pseudomonas syringae* pv. *apii* metodou real-time PCR vyznačující se tím, že obsahuje:

Set pro detekci *Pseudomonas syringae* pv. *apii*:

40

Forward primer o sekvenci AGCCTAAAGTTGCAAGGGCT
Reverse primer o sekvenci TCCTCAAGCAGCGTCTTACC

45 pro amplifikaci části unikátní sekvence *Pseudomonas syringae* pv. *apii* ICMP 11947 PapICMP11947_Contig_107 jako výsledku celogenomového sekvenování (RBUG01000105 GenBank/NCBI) o velikosti 236 bp.



Obr. 1

5 Výše uvedená sekvence zobrazuje amplifikovaný fragment v rámci referenční sekvence RBUG01000105 dostupné v GenBank/NCBI. Velikost fragmentu je 236 bp.

Uvedené primery lze s výhodou využívat v mastermixu 2× HotSybr qPCR Kit (MCLAB) spolu s nukleáz prostou vodou. Reakční směs se smíchá s DNA izolovanou z rostlinného pletiva, např. z listů, řapíku nebo osiva celeru.

10 Navrhovaná metoda detekce bakterie *Pseudomonas syringae* pv. *apii* prostřednictvím real-time PCR představuje rychlý, nenáročný způsob detekce vyznačující se vysokou specifitou a senzitivitou. Použití barviva SYBR Green snižuje ekonomickou náročnost testování.

15 Příklady uskutečnění technického řešení

Extrakce DNA z rostlinného pletiva – list, řapík, osivo

20 Z části napadeného pletiva se odebere 50 až 100 mg rostlinného materiálu, a z toho se pak přímo extrahuje DNA pomocí kitu NucleoSpin Tissue (Macherey Nagel) podle instrukcí výrobce.

Molekulární detekce real-time PCR

25 *Nově designované primery*

Název	Označení	Sekvence (5' - 3')
Primer 1	PSAFG1-fwd	AGCCTAAAGTTGCAAGGGCT
Primer 2	PSAFG1-rev	TCCTCAAGCAGCGTCTTACC

Mastermix

Reagencie	Množství
2× HoTaq Real-Time PCR Kit (McLab)	10,0 µl
Nukleáz prostá voda (Ambion)	6,4 µl
Primer 1 (PSAFG1-fwd)	0,8 µl
Primer 2 (PSAFG1-rev)	0,8 µl
Templát (DNA) 0,5-5,0 µg	2 µl

Teplotní profil pro Real-time instrument

30 Reakce probíhá v přístroji Rotor Gene 3000 (Corbett Research). Teplotní profil pro reakci je: úvodní denaturace při 95 °C po dobu 10 minut, následuje 40 cyklů 95 °C 15 s, 56 °C 40 s a 72 °C 30 s. Křivka tání byla stanovena pomocí Melt analýzy, od 50 °C do 99 °C při změně teploty 1 °C/5 s.

Kontrola detekce

Pro případné ověření detekce je možné PCR produkt vzniklý amplifikací v real-time termocyklieru separovat na agarózovém gelu o koncentraci 1,2% s přidavkem 6 μ l barviva GelRed (Biotium), po dobu 1 hodiny a při napětí 100 V. Na transiluminátoru pak lze vizualizovat vzniklé PCR produkty a potvrdit přítomnost na základě jejich velikosti, přičemž požadovaná velikost produktu pro *Pseudomonas syringae* pv. *apii* je 236 bp.

Výsledky

Systém byl optimalizovaný na dvou *Psa* izolátech (PSA-1636 a PSA-2720) získaných ze sbírky National Collection of Plant Pathogenic Bacteria ve Velké Británii a sběrů symptomatických rostlin v rámci České republiky. Specifita reakce byla ověřena na 4 čistých kulturách taxonomicky blízké příbuzných druhů rodu *Pseudomonas*, které mohou působit patogenně v rámci čeledi miříkovitých (*Pseudomonas cichorii*, *P. marginalis* pv. *pastinaceae*, *P. syringae* pv. *coriandricola*, *P. syringae* pv. *syringae*). *Psa* izoláty PSA-1636 a PSA-2720 byly inokulovány na rostliny pomocí rozprašovacího přístroje v koncentraci 10^8 CFU.ml⁻¹ a vzorky byly odebrány po 10 dnech od inokulace.

Detekční systém byl také ověřen na genomické DNA izolované dle uvedené metodologie ze zdravých rostlin celeru (*Apium graveolens* L.). Testování vzorků probíhalo vždy v triplicátu.

Výsledky detekce s Ct hodnotami a analýzou teploty tání PCR produktu.

Izolát	rostlinný orgán	Ct	Melting temperature (°C)
PSA-1636	list	27,89	89,5
PSA-2720	list	23,93	89,5
CZE-1	list	29,27	89,2
CZE-2	list	29,24	89,3
CZE-3	řapík	28,64	89,6
CZE-4	řapík	26,36	89,7
CZE-5	osivo	28,30	89,5
<i>Pseudomonas cichorii</i>	-	28,38	91,5
<i>P. marginalis</i> pv. <i>pastinaceae</i>	-	21,96	92,0
<i>P. syringae</i> pv. <i>coriandricola</i>	-	26,17	90,5
<i>P. syringae</i> pv. <i>syringae</i>	-	12,61	85,3

Reakce byla optimalizována pro koncentrace bakterie *Psa* v rozmezí 10^7 až 10^0 CFU.ml⁻¹, přičemž senzitivita reakce dosahovala řádu jednotek bakterií v testovaném vzorku s hodnotou Ct = 32,03 (amplifikace ve 32. cyklu reakce). Standardní křivka reakce byla popsána lineární funkcí $y = -3,322x + 37,943$ a koeficientem R2 o hodnotě 0,97919. Účinnost reakce byla 100 %.

Navržený detekční systém byl plně validován pro uvedený soubor *Psa* izolátů, přičemž byla potvrzena specifická detekce přítomnosti bakterie *Pseudomonas syringae* pv. *apii* na základě výsledků melt analýzy s teplotou tání cílového produktu $89,5 \pm 0,3$ °C.

V případě amplifikace PCR produktů vzorů DNA získaných z necílových bakterií či patogenů prostých rostlin celeru se teploty tání přítomných PCR produktů pohybovaly v rozmezí 85,3 až 92,0 °C, přičemž všechny produkty byly zjevně nespecifické.

V současnosti neexistuje jednoznačně vymezený protokol k detekci bakterie *Pseudomonas syringae* pv. *apii*, která infikuje pletiva celeru. Dostupné jsou pouze PCR protokoly využívající amplifikace 16S RNA, které musí být následně sekvencovány pro ověření přítomnosti bakterie.

Navržený protokol byl optimalizován pro detekci *Psa* v různých pletivech rostlin celeru a v osivu.

Průmyslová využitelnost

5

V rutinní diagnostice bakteriálních patogenů napadajících pletiva zelenin se obvykle používá kultivování patogenu na médiu, analýza morfologických znaků (na Petriho misce nebo mikroskopicky), PCR a sekvenace. Navržený postup je výsledkem testování navržených

10

primerů, které poskytovaly spolehlivou detekci patogenu jak v pletivech, tak v osivu celeru. Navržená molekulární detekce je ve srovnání s dříve používanými metodami velmi rychlá a přesná, navíc s možností kvantifikace.

15

Popsanou reakční směs k detekci bakterie *Pseudomonas syringae* pv. *apii* je možné dodávat diagnostickým laboratořím jako kit. Zavedením tohoto postupu diagnostiky lze uvedenou bakterii detekovat v rostlinných pletivech orgánů i v osivu celeru. Včasné zjištění původce choroby a eliminace napadených rostlin z produkčních ploch představuje nezbytný krok pro udržení bezinfekčního zdravotního stavu porostu celeru a zabránění šíření patogenu v semenářských porostech.

NÁROKY NA OCHRANU

1. Sada pro molekulární identifikaci patogenní bakterie celexu *Pseudomonas syringae* pv. *apii*
5 metodou real-time PCR, **vyznačující se tím**, že obsahuje:
- forward primer o sekvenci AGCCTAAAGTTGCAAGGGCT
 - reverse primer o sekvenci TCCTCAAGCAGCGTCTTACC.