

# UŽITNÝ VZOR

(11) Číslo dokumentu:

## 34 729

(13) Druh dokumentu: **U1**

(51) Int. Cl.:

*C12Q 1/689* (2018.01)

*C12Q 1/6895* (2018.01)

*C12N 15/11* (2006.01)

(19)  
ČESKÁ  
REPUBLIKA



ÚŘAD  
PRŮMYSLOVÉHO  
VLASTNICTVÍ

(21) Číslo přihlášky: **2020-37883**

(22) Přihlášeno: **15.08.2020**

(47) Zapsáno: **29.12.2020**

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

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

(54) Název užitého vzoru:  
**Sada pro masivně paralelní detekci  
patogenu mrkve - *Candidatus Liberibacter  
solanacearum***



Výše uvedená sekvence zobrazuje amplifikovaný fragment ribozomálního genu (rrn operonu) v rámci referenční sekvence KX431890 dostupné v GenBank/NCBI. Velikost fragmentu je 4002 pb (párů bází). Cílová oblast je doporučována také pro rozlišení jednotlivých haplotypů bakterie.

5

Uvedené primery lze s výhodou používat v mastermixu s Q5 High-Fidelity DNA Polymerase kitem a nukleáz prostou vodou. Reakční směs se smíchá s templátovou DNA extrahovanou z rostlinného pletiva, např. stonku, kořene zeleniny nebo z osiva. Získaný amplikon pak je doporučeno sekvenovat pomocí metody masivně paralelního sekvenování, kdy lze s výhodou používat indexovací kit Nextera a přístroj MiniSeq.

10

Navrhovaná metoda detekce patogenu mrkve – *Candidatus Liberibacter solanacearum*, využívající postup molekulární identifikace masivně paralelním sekvenováním představuje precizní způsob detekce. Metoda je citlivější než dosud známé metody identifikace patogenu CLso.

15

Navržený přístup je výsledkem testování různých kombinací primerů, které vykazovaly různou specifitu k amplifikaci sekvencí cílového patogenu. Zvolená finální kombinace dvou primerů poskytovala nespolehlivější simultánní detekci obou patogenů jak v rostlinném pletivu, tak v osivu. Navržená metoda je rychlá a oproti jiným metodám poskytuje možnost haplotypizace patogenu.

20

#### Příklady uskutečnění technického řešení

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

25 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.

2. Extrakce DNA z osiva.

30 Extrakce z osiva se provede podle International Seed Federation (2019) ([https://www.worldseed.org/wp-content/uploads/2019/11/Carrot\\_Lso\\_Nov\\_2019.pdf](https://www.worldseed.org/wp-content/uploads/2019/11/Carrot_Lso_Nov_2019.pdf)) s využitím kitu NucleoSpin Tissue (Macherey Nagel) podle instrukcí výrobce.

#### Detekce patogenu CLso metodou masivně paralelní sekvenace

35 Pro samotnou detekci byly použity primery podle předpokládaného technického řešení:

Název	Označení	Sekvence (5'-3')
forward primer 1	CLSAE1	GTGCTAGCTGTTGGGTGGTT
reverse primer 2	CLSAE2	TTTCAGCGGTTATCCATTC

40 Reakce byla prováděna s použitím mastermixu o následujícím složení:

Reagencie	Množství
5× Pufr	5,0 µl
Nukleáz prostá voda	10,0 µl
Polymeráza 2,5 jednotek/µl	0,5 µl
MgCl <sub>2</sub> roztok, 25mM	1,0 µl
dNTPs 10mM	0,2 µl
Primer 1 (CLSAE1) 10µM	1,0 µl
Primer 2 (CLSAE2) 10µM	1,0 µl
Templát (DNA) 50 až 250 ng	2,0 µl

*Teplotní profil PCR instrument*

Reakce probíhala v termocykleru, např. TProfessional Standard Gradient, Biometra. Teplotní profil pro reakci: úvodní denaturace při 98 °C po dobu 2 minuty, následuje 30 cyklů 98 °C 15 s, 55 °C 15 s a 72 °C 40 s, a finální elongace při 72 °C 5 minut.

*Kontrola detekce*

Pro ověření detekce je možné PCR produkty vzniklé amplifikací v termocykleru 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 o velikosti 4002 bp.

*Purifikace PCR produktu*

PCR produkt je nutno purifikovat, např. kitem NucleoSpin Gel and PCR Clean-up (Macherey Nagel).

*Příprava knihoven pro masivně paralelní sekvenování DNA (High-throughput sequencing)*

Purifikovaný PCR produkt je vhodný k sekvenaci masivně paralelním způsobem, a navíc také k determinaci konkrétního haplotypu bakterie. Příprava knihovny je založena na technologii Nextera, která umožňuje sekvenaci velkých ampliconů a celých genomů mikroorganismů. Finální knihovny je třeba zkontrolovat pomocí např. High Sensitive DNA kit (Agilent Technologies) a stanovit koncentrace. Knihovny jsou následně smíchány dohromady ve finální koncentraci 1,8pM.

*Sekvenování*

Připravené knihovny byly osekvenovány pomocí kitu MiniSeq Mid Output Kit (300-cycles) na přístroji MiniSeq (Illumina). K sekvenování takto připravených knihoven lze použít i jiné přístroje využívající technologii sekvenace syntézou.

*Výsledky*

Byly testovány dva roztoky pozitivní DNA (haplotyp D a E), které byly získány v rámci spolupráce s institucí ANSES (L'Agence nationale de Sécurité Sanitaire de l'Alimentation, de l'environnement et du travail) ve Francii. Dále byly testovány dvě rostliny mrkve (mrkev 1-2) a čtyři šarže osiva (OS1-4) poskytnuté společností MoravoseedCZ a.s.

Tabulka č. 1 popisující výsledné detekce patogenů, nts – nukleotidy, SNP – jednonukleotidový polymorfismus.

Izolát	Výsledek amplifikace primerů	Indexy pro masivně paralelní sekvenování	Počet čtení na vzorek v nts	Délka konsenzuální sekvence v nts	Rozdíly k rozšířenému haplotypu C v SNP
CLso D	+	AAGAGGCA/A GAGGATA	5879670 z toho cílových 5428183	3999	16
CLso E	+	GCTCATGA/CT CCTTAC	4126242 z toho cílových 3806217	4000	24
mrkev-1	-	-	-	-	-
mrkev-2	-	-	-	-	-
OS-1	-	-	-	-	-
OS-2	-	-	-	-	-
OS-3	-	-	-	-	-
OS-4	-	-	-	-	-

5 Vysledky negativní detekce CLso v pletivech a osivu mrkví z České republiky je logické. Patogen není prozatím v České republice významně rozšířen, avšak ÚKZÚZ zaznamenal několik šarží infikovaného osiva při importu do České republiky. Šíření tohoto závažného patogenu lze zabránit pouze používáním patogenů prostého množitelského materiálu a včasným odstraňováním infikovaných rostlin z výsadeb.

#### Průmyslová využitelnost

10 Popsanou reakční směs pro precizní detekci a haplotypizaci patogenu CLso je možné dodávat diagnostickým laboratořím jako kit. Zavedením tohoto inovovaného postupu diagnostiky lze precizně detekovat a haplotypizovat *Candidatus Liberibacter solanacearum* v pletivech nebo osivu zelenin, které napadá. Tímto způsobem je možné identifikovat infikované rostliny na poli a rovněž  
15 detekovat infekci ještě před výsevem a předejít tak významným ztrátám v produkci.

## NÁROKY NA OCHRANU

- 5 1. Sada pro masivně paralelní detekci patogenu mrkve *Candidatus Liberibacter solanacearum*,  
**vyznačující se tím**, že obsahuje:

forward primer tvořený sekvencí GTGCTAGCTGTTGGGTGGTT

reverse primer tvořený sekvencí TTTCAGCGGTTATCCATTCC.