

Metodika diagnostiky bakterií *Pectobacterium atrosepticum* a *Dickeya solani* pomocí real-time PCR

Ing. Martin Kmoch Ph.D. a kolektiv

CERTIFIKOVANÁ METODIKA

2020

VÝZKUMNÝ ÚSTAV BRAMBORÁŘSKÝ HAVLÍČKŮV BROD, s. r. o.

KOLEKTIV AUTORŮ

- Ing. Martin Kmoch, Ph.D. – Výzkumný ústav bramborářský Havlíčkův Brod, s. r. o. (50%)
Ing. Denisa Binderová – Výzkumný ústav bramborářský Havlíčkův Brod, s. r. o. (20%)
Ing. Viktor Kopačka – VESA Velhartice, a. s. (10%)
Ing. Josef Vacek, Ph.D. – Výzkumný ústav bramborářský Havlíčkův Brod, s. r. o. (5%)
Ing. Sára Brázdová – Biologické centrum AV ČR, v.v.i., České Budějovice (5%)
prof. RNDr. Karel Petrzik, CSc. – Biologické centrum AV ČR, v.v.i., České Budějovice (5%)
doc. Ing. Rudolf Ševčík, Ph.D. – Vysoká škola chemicko-technologická v Praze (5%)

OPONENTI

RNDr. Anna Kryštofová, Ph.D. (oponent z odborného orgánu státní správy)

Ústřední kontrolní a zkušební ústav zemědělský
Odbor diagnostiky škodlivých organismů rostlin
Šlechtitelů 773/23, 779 00 Olomouc 9
e-mail: anna.krystofova@ukzuz.cz

Ing. Jana Víchová, Ph.D. (odborný oponent)

Mendelova univerzita v Brně
Agronomická fakulta
Ústav pěstování, šlechtění rostlin a rostlinolékařství
Zemědělská 1665/1, 613 00 Brno
e-mail: jana.vichova@mendelu.cz

Metodika byla vypracována v rámci podpory od Ministerstva zemědělství ČR – projektu NAZV QK1910028 „Biologická ochrana brambor proti vybraným patogenním bakteriím“.

Publikaci bylo Ústředním kontrolním a zkušebním ústavem zemědělským uděleno osvědčení o uznání metodiky UKZUZ 217957/2020, vydané se souhlasem Odboru vědy, výzkumu a vzdělávání MZe.

Poděkování patří Sběrce fytopatogenních a zemědělsky prospěšných bakterií – Výzkumný ústav rostlinné výroby Praha (Národní program genetických zdrojů mikroorganismů a drobných živočichů hospodářského významu) za poskytnutí potřebných kmenů bakterií (pozitivních kontrol).

OBSAH

1. CÍL METODIKY	4
2. VLASTNÍ POPIS METODIKY	4
2.1 Úvod	4
2.2 Podstata použitých diagnostických metod	8
2.3 Vlastní postup	11
2.3.1 Izolace DNA	11
2.3.2 PCR reakce	14
2.3.3 Vyhodnocení real-time PCR reakce	19
2.4 Příklad praktického využití	23
3. SROVNÁNÍ „NOVOSTI POSTUPŮ“	25
4. POPIS UPLATNĚNÍ CERTIFIKOVANÉ METODIKY	25
5. EKONOMICKÉ ASPEKTY	26
6. SEZNAM POUŽITÉ SOUVISEJÍCÍ LITERATURY	27
7. SEZNAM VYBRANÝCH PUBLIKACÍ, KTERÉ PŘEDCHÁZELY METODICE	30

Metodika diagnostiky bakterií

Pectobacterium atrosepticum a *Dickeya solani* pomocí Real-time PCR

1. CÍL METODIKY

Cílem certifikované metodiky je optimalizace molekulárních metod diagnostiky pektinolytických bakterií *Pectobacterium atrosepticum* a *Dickeya solani*, které jsou významnými patogeny bramboru z čeledi *Enterobacteriaceae*. Způsobují onemocnění bakteriální černání stonku bramboru a měkkou hnilobu bramboru. Použité metody založené na PCR, tj. TaqMan real-time PCR a SybrGreen real-time PCR, zvýší citlivost detekce uvedených bakterií v pletivech bramboru i v čisté kultuře a zajistí vyšší spolehlivost diagnostiky. Protokoly budou optimalizovány pro použití v běžné diagnostické laboratoři vybavené zařízením pro molekulární biologii.

2. VLASTNÍ POPIS METODIKY

2.1 ÚVOD

Brambory (*Solanum tuberosum* L.) jsou globálně nejpěstovanější zeleninou a čtvrtou nejvýznamnější plodinou na světě, která je vystavena mnoha patogenům (Lebecka *et al.*, 2018). Významnými patogeny bramboru jsou bakterie čeledi *Enterobacteriaceae*, do kterých patří rody *Pectobacterium* a *Dickeya* (Lebecka *et al.*, 2018; Salem *et al.*, 2018; Skelsey *et al.*, 2018). Druhy rodů *Pectobacterium* a *Dickeya* jsou gramnegativní, fakultativně anaerobní, nesporeující bakterie, tyčinkovitého tvaru. Způsobují ekonomicky významné ztráty na široké škále plodin na orné půdě, ale i na okrasných rostlinách (Buttmer *et al.*, 2018).

Velkou roli ve výskytu bakterií a vzniku onemocnění rozhoduje teplota prostředí. Bylo prokázáno, že *Pectobacterium* spp. rostou lépe a jsou více patogení při nižších teplotách (25 °C), zatímco *Dickeya* spp. při vyšších (>25 °C). Tyto patogeny se nacházejí v infikovaném rostlinném pletivu jako smíšené populace, kdy mj. teplota určuje, jaký druh bude převažovat a jeho míru patogenity. Důležitým faktorem pro vznik hniloby je také hladina vody v půdě. Přítomnost vodního filmu na povrchu hlízy vyvolá rozvoj anaerobních podmínek, zvýší se

množení bakterií a začne se vytvářet hniloba (Ahmed *et al.*, 2018, Skelsey *et al.*, 2018). Bakterie způsobující hnilobu hlíz pak produkují širokou škálu hydrolytických enzymů, jako jsou celulózy, pektinázy, xylázy a proteázy, které jsou zodpovědné za degradaci rostlinné buněčné stěny a maceraci rostlinných pletiv (Ndivo *et al.*, 2018). Bakterie mohou přežít v půdě, z které jsou přenášeny vodou, hmyzem nebo technikou (Hachoud *et al.*, 2019). Doba přežití bakterií v půdě se pohybuje od jednoho týdne až do šesti měsíců, v závislosti na podmínkách prostředí, jako je teplota půdy, vlhkost a pH (Czajkowski *et al.*, 2011). Vlivem výskytu rodů *Pectobacterium* a *Dickeya* pak může docházet v extrémních případech až k 25% snížení výnosu a až 30% ztrátám při skladování (Maliko *et al.*, 2019). Bakterie pronikají do hostitelských rostlin přirozeně póry (stomata, lenticely) nebo poraněním. Jakmile infikují rostlinu, mohou se cévními svazky šířit v celé rostlině (Raoul des Essarts *et al.*, 2015). Nemocné nebo latentně infikované hlízy mohou mít za následek šíření bakterií (Akter *et al.*, 2018; Carstens *et al.*, 2019).

Jedním z ekonomicky nejvýznamnějších druhů tohoto rodu je *Pectobacterium carotovorum*, které způsobuje měkkou hnilobu hlíz ve skladech a na poli bakteriální černání stonku bramboru. Infekce může vzniknout během pěstování, sklizně, manipulace a přepravy hlíz, či během skladování, což má za následek značné snížení výnosů a špatnou kvalitu produkce (Muturi *et al.*, 2019). *P. carotovorum* je rozdělen do pěti poddruhů: *atrosepticum*, *beta-vasculorum*, *carotovorum*, *odoriferum* a *wasabiae* (Abu-obeid *et al.*, 2018). *P. carotovorum* subsp. *carotovorum* je nejběžnějším původcem bakteriální měkké hniloby s širokým spektrem hostitelských rostlin, např. různých druhů zeleniny, jako jsou brambory, mrkev, zelí nebo salát (Khlaif *et al.*, 2018; Zaczek-Moczydlowska *et al.*, 2019). *P. carotovorum* subsp. *atrosepticum* způsobuje především bakteriální černání stonku v chladnějším prostředí při teplotách mezi 20–25 °C, zatímco při vysokých teplotách nad 30 °C se patogen vyskytuje na hlízách a způsobuje měkkou hnilobu (Czajkowski *et al.*, 2015; Ngadze, 2018). *P. carotovorum* subsp. *atrosepticum* se liší od ostatních patogenů způsobujících měkké hniloby v jeho relativně úzkém rozsahu hostitelů, kdy je omezen na čeleď *Solanaceae*, na rozdíl od *P. carotovorum* subsp. *carotovorum* nebo *Dickeya* spp. (Ma *et al.*, 2018). *P. carotovorum* subsp. *atrosepticum* je schopna přežít v půdě a infikované rostlině déle než jeden rok. Patogen vylučuje enzymy degradující buněčné stěny rostlin (pektát lyáza, polygalakturonáza, proteáza a celulóza) zodpovědné za maceraci rostlinných pletiv a vývoj infekce (Ma *et al.*, 2018; Hajian-Maleky *et al.*, 2019).

Bakterie rodu *Dickeya* (původně druh *E. chrysanthemi*, nyní samostatný rod), zahrnující mj. *D. dianthicola*, *D. dadanti* nebo *D. solani*, způsobují hnilobu brambor na poli a měkkou hnilobu hlíz při skladování a přepravě v mírných, tropických i subtropických oblastech po celém světě (Buttimer *et al.*, 2018; Czajkowski *et al.*, 2015). Byly izolovány z mnoha rostlinných druhů, proto se jedná o patogeny s širokým hostitelským spektrem (Šalplachta *et al.*, 2015). Snadno se šíří přes cévní svazky rostliny a při vyšších teplotách způsobují silnější mokrou hnilobu než *P. atrosepticum* (Safenkova *et al.*, 2017). Do mnoha evropských zemí byly tyto patogeny zavlečeny prostřednictvím mezinárodního obchodu se sadbou brambor (Czajkowski *et al.*, 2011).

D. dianthicola má široký rozsah hostitelů, ale hlavním hostitelem jsou brambory (Czajkowski *et al.*, 2013). Infikované rostliny jsou zvadlé, zakrslé a s hnilobou stonků či hlíz. Patogen je vysoce virulentní a vyžaduje méně inokula pro vyvolání závažných příznaků než *Pectobacterium atrosepticum* a *Pectobacterium carotovorum* (Toth *et al.*, 2011). V půdě a podzemní vodě může žít jako epifyt nebo saprofyt, dokud se nedostane ke svému hostiteli. Jedná se o bakterie, které dokáží silně konkurovat ostatním pomocí mechanismů inhibice růstu. Druhy rodu *Dickeya* může šířit hmyz. Mezi hlavní kroky infekce rostlin bakteriemi rodu *Dickeya* patří přilnutí k rostlinnému povrchu a penetrace do rostlinných pletiv (přes poranění nebo přirozenými otvory, stomata), vniknutí do apoplastů a degradace buněčné stěny (Reverchon *et al.*, 2013). Bakterie se mohou zdržovat v rostlinných mezibuněčných prostorech, což způsobuje latentní infekci bez jakýchkoli příznaků (Lebeau *et al.*, 2008). Vývoj onemocnění může mimo jiné ovlivnit množství inokula, citlivost odrůdy a rychlost migrace přes cévní systém rostlin. *Dickeya dianthicola* má relativně nízkou maximální růstovou teplotu ve srovnání s jinými druhy *Dickeya* a zdá se, že je tak lépe přizpůsobena evropským klimatickým podmínkám (Tsrer *et al.*, 2011). Při vyšších teplotách (mezi 25 až 30 °C) způsobuje *D. dianthicola* viditelné příznaky, ale při nízkých teplotách může být vizuálně nezjistitelná. *D. dianthicola* přežívá v půdě a vodě několik měsíců, což zvyšuje pravděpodobnost rozšíření a kontaminace potenciálních hostitelů (Ocenar *et al.*, 2019).

D. solani způsobuje stále větší problémy při produkci brambor ve velké části Evropy. Kmeny *D. solani* izolované z brambor se dosud ukázaly jako geneticky úzce příbuzné, i když jsou izolovány ze zeměpisně vzdálených míst, což ukazuje na velmi omezenou diverzitu (Carstens *et al.*, 2018). Nyní se obecně uznává, že *D. solani* způsobuje na bramborách těžké symptomy, může přežít

v povrchových vodách poměrně dlouhou dobu a je schopna šíření a systémové infekce hostitele v rozmanitých přírodních podmínkách. Konkurenční výhodu vytváří pro *D. solani* širší rozsah teplot příznivých pro vývoj onemocnění než v případě jiných druhů rodu *Dickeya* a malé množství inokula dostačující pro efektivní šíření infekce. Navzdory rozsáhlým studiím je však dosud málo znám proces infekce, zejména v časných stádiích interakce mezi bakterií a rostlinou (Fikowicz-Krosko *et al.*, 2017; Golanowska *et al.*, 2018).

Rostoucí globalizace a mezinárodní obchod, klimatické změny vedoucí k invazi patogenů a škůdců brambor do nových oblastí výrazně zvýšily potřebu nástrojů pro jejich rychlou, přesnou a spolehlivou diagnostiku (Ward *et al.*, 2014). V první polovině 20. století se pro zjištění výskytu pektinolytických bakterií spoléhalo hlavně na vizuální hodnocení příznaků a tradiční kultivační metody a biochemické testy.

Zjišťování přítomnosti *Pectobacterium* spp. a *Dickeya* spp. v rostlinných pletivech je náročné, protože patogeny vytvářejí na bramboru podobné symptomy. Diagnostické nástroje, které mohou rychle diferencovat *Pectobacterium* spp. od *Dickeya* spp., jsou nezbytné, jak pro sledování epidemiologie těchto onemocnění, tak i pro stanovení zdrojů kontaminace (Ahmed *et al.*, 2018). Neexistují žádné odrůdy brambor rezistentní vůči hnilobě (Buttimer *et al.*, 2018; Lee *et al.*, 2017).

Současné přístupy k detekci a identifikaci zahrnují klasické, sérologické a molekulární metody (Horká *et al.*, 2013). Použité diagnostické testy musí být citlivé, specifické (nevytvoří falešně pozitivní výsledky pro necílové skupiny) a rychlé. Klasické diagnostické metody, jako je mikroskopická identifikace nebo kultivace patogenů, jsou časově náročné a vyžadují vysoce kvalifikovaný personál a aplikace fenotypových a biochemických testů pro identifikaci těchto bakterií se již nepoužívá z důvodu vysoké variability mezi jednotlivými izoláty v rámci stejné taxonomické skupiny (Nikitin *et al.*, 2018). Mezi široce používané molekulární metody pro detekci bakteriálních fytopatogenů, které jsou specifické a citlivé pro detekci a diferenciaci druhů, patří polymerázová řetězová reakce (PCR), izotermální amplifikace zprostředkovaná smyčkou (Loop mediated isothermal amplification – LAMP-PCR) a multilokusová sekvenční analýza – MLST (Karim *et al.*, 2019). Sérologické metody, jako je ELISA aj., jsou rovněž využívané, avšak problematické s ohledem na specifčnost a citlivost. V současnosti jsou tak bakterie obvykle detekovány metodami PCR (Horká *et al.*, 2013). PCR a další metody založené na analýze DNA jsou preferovány pro jejich citlivost,

specifičnost a snadnost, s jakou lze získat požadované výsledky. Tisíce dostupných genomů bakterií umožnily srovnávací genomické analýzy jako prostředek pro stanovení specifičnosti detekčních testů založených na PCR (Vijaya Satya *et al.*, 2010). Konvenční metody PCR poskytují vysokou citlivost a specifičnost diagnostiky, ačkoli vyžadují termocyklování a následnou elektroforetickou analýzu PCR produktů (Gill *et al.* 2008). Velký potenciál mají testy založené na PCR v reálném čase (real-time PCR) (Pritchard *et al.*, 2015). Na rozdíl od běžné PCR umožňují kvantifikaci templátu v každém cyklu (Czajkowski *et al.*, 2015). Na druhé straně tento postup zvyšuje celkové náklady v důsledku požadovaných fluorescenčních barviv, sond a zařízení. Technika Real-time PCR nevyžaduje elektroforetickou analýzu produktů PCR po dokončení reakce, čímž je zajištěno nízké riziko kontaminace a zkrácení doby potřebné pro analýzu (Okubara *et al.*, 2005). Kromě toho vysoká citlivost vyžaduje zvláštní pozornost podmínkám, za nichž se testování provádí (Mirmajlessi *et al.*, 2015). Možnost použití různých fluorescenčních barviv umožňuje realizaci multiplexní PCR pro detekci více bakterií v jedné reakci, čímž se snižuje celkový čas a náklady na analýzu. V praxi počet patogenů detekovaných multiplexní PCR zřídka přesahuje dva, aby se zamezilo zvýšenému riziku nespecifických reakcí (Nikitin *et al.*, 2018). Použití technologie založené na izotermální amplifikaci DNA (LAMP-PCR) umožňuje vyhnout se použití nákladných termocyklerů a výrazně zkrátit reakční dobu. Tato technologie navíc zvyšuje účinnost a specifičnost reakce a usnadňuje interpretaci výsledků. Ve většině případů však technologie LAMP-PCR vyžaduje rozšířenou sadu primerů (Okubara *et al.*, 2005).

2.2 PODSTATA POUŽITÝCH DIAGNOSTICKÝCH METOD

Real-time PCR (qPCR)

Real-time PCR (Real Time Polymerase Chain Reaction) metoda je založena na klasické PCR s tím rozdílem, že termocykler umožňuje kontinuálně monitorovat (v reálném čase) přírůstky DNA během každého cyklu (u klasické PCR se detekuje až finální produkt). Základní podmínkou je přítomnost fluorescenčního substrátu, který se váže na syntetizovanou DNA. Úroveň detekované fluorescence, která v průběhu PCR roste, je přímo úměrná množství nasyntetizované nukleové kyseliny (vzniklého produktu). Data jsou sbírána během celého PCR procesu na speciálních termocyklerech s optikou umožňující excitaci sub-

strátů a následnou detekci fluorescence v každé jamce. Přístroj po každém cyklu změří fluorescenci a výsledek předá řídicímu softwaru, který zobrazuje průběžně množství uvolněné fluorescence (Raclavský, 2003; Mičuda *et al.*, 2006).

Typická amplifikační křivka má esovitě zakřivený tvar a lze ji rozdělit na 3 části:

1. **„background“ fázi**, kdy je amplifikátu tak málo, že jeho fluorescence ještě nedosahuje měřitelných hodnot
2. **exponenciální fázi**, kdy množství produktu exponenciálně roste (trvá asi 4–8 cyklů)
3. **lineární fázi** (množství produktu přibývá lineárně)
4. **plateau fázi**, kdy dochází k saturaci systému, množství amplifikovaného produktu se dále nemění a fluorescenční signál zůstává konstantní.

Platí, že čím dříve amplifikační křivka dosáhne exponenciální fáze, popř. překročí určitý fluorescenční práh umístěný do této fáze, tím více startovních templátových molekul bylo přítomno ve vzorku na počátku reakce (Mičuda *et al.*, 2006; Raclavský, 2003).

Detekce probíhá při real-time PCR v exponenciální fázi, kdy jsou ve vzorcích zachovány kvantitativní poměry a reakce je precizní a specifická. Oproti tomu u klasické PCR probíhá detekce v plató fázi, při níž nelze rozlišit množství matricové DNA ve vzorku.

Kvantifikace DNA se provádí prostřednictvím matematické analýzy amplifikačních křivek vzniklých vynesením naměřené fluorescence oproti pořadovému číslu příslušného cyklu. Pro detekci PCR produktů lze využít nespecifické fluorescenční barvivo (SYBR[®] Green real-time PCR) nebo specifické sondy (TaqMan real-time PCR).

SYBR Green real-time PCR

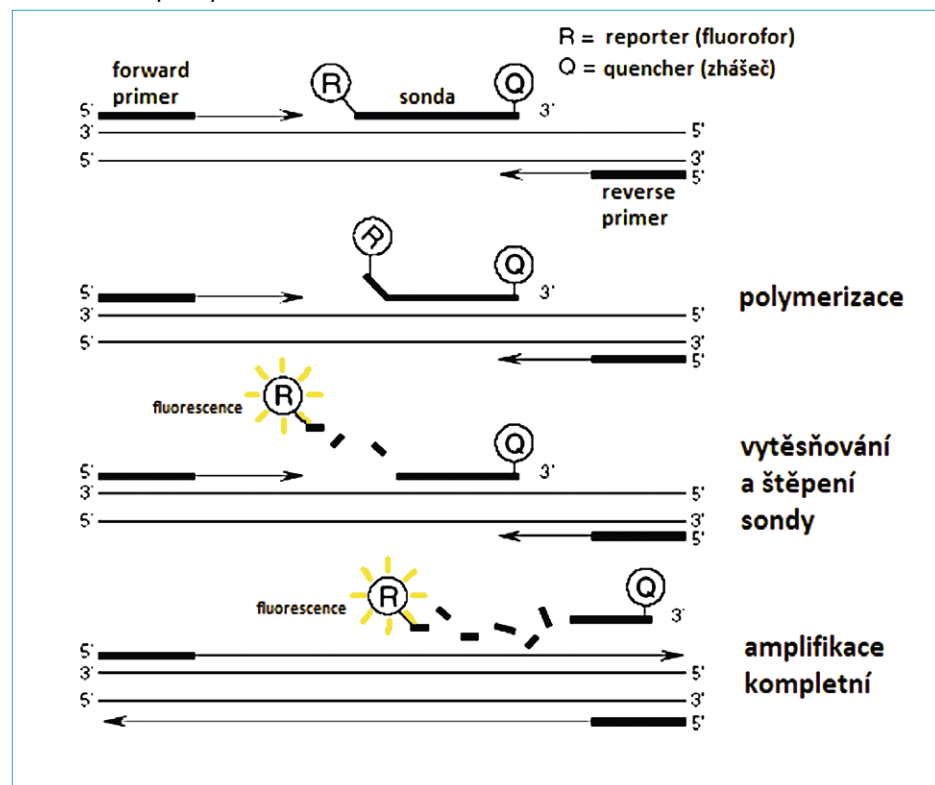
Pro detekci PCR produktů se nejčastěji využívá nespecifické interkalační barvivo SYBR[®] Green I., které se během cyklů váže na vznikající ds DNA. Vazbou na DNA se aktivuje – emituje fluorescenční záření, které je průběžně snímáno a vyhodnocováno. Nárůst fluorescenčního signálu vidíme na obrazovce jako narůstající křivku.

TaqMan real-time PCR

Pro detekci PCR produktů lze použít kromě barviva SYBR[®] Green specifické sondy (próby), nejčastěji TaqMan. Kromě primerů se do reakce vkládá další oligonukleotid, který dosedá na amplifikovaný úsek. Tento oligonukleotid je na

jednom konci označený fluorescenční značkou (fluorofor) a na druhém konci nese tzv. zhášec (quencher) [obr. 1]. Pokud je fluorescenční látka v těsné blízkosti zhášec, je její fluorescence potlačena. Vlastní PCR probíhá obvyklým způsobem až do okamžiku, kdy DNA polymeráza při syntéze nového řetězce narazí na fluorescenčně značený nukleotid (sondu). V tom okamžiku jej začne vytěšňovat z templátového vlákna, štěpí jej a do roztoku se uvolňuje fluorescenční barvivo, jehož fluorescenci je možné měřit v průběhu amplifikace. Intenzita fluorescence je úměrná množství nasyntezovaného PCR produktu (Mičuda *et al.*, 2006; Raclavský, 2003).

Obr. 1: Princip TaqMan real-time PCR



2.3 VLASTNÍ POSTUP

2.3.1 Izolace DNA

DNA o požadované kvalitě (bez inhibitorů PCR) a kvantitě lze izolovat z rostlinných pletiv nebo kultur bakterií na živné půdě pomocí standardních metod nebo pomocí komerčních izolačních a purifikačních kitů. DNA z bakteriálních kultur se běžně uvolňuje pouhou inkubací při 95 °C. Izolovanou DNA lze použít přímo pro vlastní testování. Pro izolace DNA z rostlinných a hlízových vzorků bramboru lze doporučit zejména kity DNeasy Plant Mini Kit (Qiagen, 69104) a dle vlastních pokusů též kit GenElute Plant Genomic DNA Kit (Sigma), který uvádíme dále.

Odebraný vzorek stonku nebo hlíz bramboru o hmotnosti 5 g se homogenuje v homogenizačním sáčku (Bioreba) za použití 0,05 M fosfátového pufru (PB) a ložiskového homogenizátoru. DNA se dále extrahuje pomocí extrakční sady GenElute™ Plant Genomic DNA Miniprep Kit. DNA z kultur bakterií na živné půdě lze izolovat bez použití homogenizačního sáčku, kdy se odebraný vzorek vloží přímo do lyzační zkumavky z extrakční sady. Po extrakci se ve vzorcích změří množství a kvalita DNA pomocí spektrofotometru.

Technické vybavení pro izolaci DNA z pletiv bramboru a pro její uchování

- Laboratorní váhy – na navážky vzorků (Mettler AE 160)
- Homogenizační sáček (Bioreba, cat. č. 430 100)
- Skalpel, pinzety (odběr vzorků)
- Ložiskový homogenizátor (Bioreba)
- Termoblok (Major Science, MD-01)
- Centrifuga s otáčkami $\geq 16\ 000 \times g$, s rotorem na plastové mikrozukavky o objemu 2,0 ml (Hettich Zentrifugen EBA 12R)
- Vortex (Techno Kartell TK3S)
- Pipety (2–20 μ l, 20–200 μ l a 100–1000 μ l) a kompatibilní sterilní RNase-free špičky
- Plastové mikrozukavky 1,5 ml, 2,0 ml (Eppendorf)
- Spektrofotometr (NanoDrop 2000c nebo Perkin Elmer MBA 2000)
- Mrazicí box (-20 °C)
- Hlubokomrazicí box (-80 °C) – pro dlouhodobé skladování vzorků
- Jednorázové rukavice

Chemikálie potřebné pro izolaci DNA z pletiv bramboru

- Fosfátový pufr – PB (0,05 M, pH 7,0, 1 litr): 4,26 g Na_2HPO_4 , 2,22 g KH_2PO_4
- Tekutý dusík
- Extrakční kit GenElute™ Plant Genomic DNA Miniprep Kit (Sigma-Aldrich, G2N70)
- RNase A Solution (Sigma-Aldrich, R6148-25ML nebo R4642).
- Etanol (96–100%), analytický stupeň čistoty (Sigma-Aldrich, E7023, E7148 nebo 459836) – do pufrů
- Technicky etanol (70%) – sterilizace pracovních prostor

Pozn.: Stejným postupem jako je uvedeno pro izolaci DNA z extraktů rostlin bramboru lze pracovat též s extrakty připravenými standardními postupy z výkrojků hlíz.

Postup izolace DNA pomocí kitu GenElute™ Plant Genomic DNA Miniprep Kit

Před zahájením vlastní izolace je nutno připravit:

- Přidat do pufru Wash Solution požadované množství 95–100% etanolu – 72 ml na 30 ml pufru (70 extrakcí)
- Předehřát termoblok na 75 °C
- Důkladně promíchat reagentie, v případě precipitátu v reagentiích zahřát na 55–65 °C ve vodní lázni, po rozpuštění precipitátu zchladit na laboratorní teplotu
- Předehřát eluční pufr (Elution Solution) na 65 °C

Vlastní postup

- Navážit 5 g pletiva bramboru, vložit do homogenizačního sáčku, přidat 5 ml 0,5 M PB a důkladně homogenizovat za použití ložiskového homogenizátoru.
- Odebrat 1 ml přefiltrovaného homogenátu do 1,5 ml mikrozkušavky, centrifugovat při 16 000 × g 10 min (vytvoření pelety), vylít supernatant.
- Do mikrozkušavky napipetovat k peletě 350 µl Lysis Solution [part A], 50 µl Lysis Solution [part B] a 4 µl RNase (50 U), důkladně promíchat (vortex). Pokud se extrahuje DNA z čisté bakteriální kultury, odebere se vzorek bakterie (cca 50 mg) z Petriho misky pomocí špachtle a vloží do mikrozkušavky se 350 µl Lysis Solution [part A], 50 µl Lysis Solution [part B] a 4 µl RNase (50 U) a důkladně promíchá (vortex).

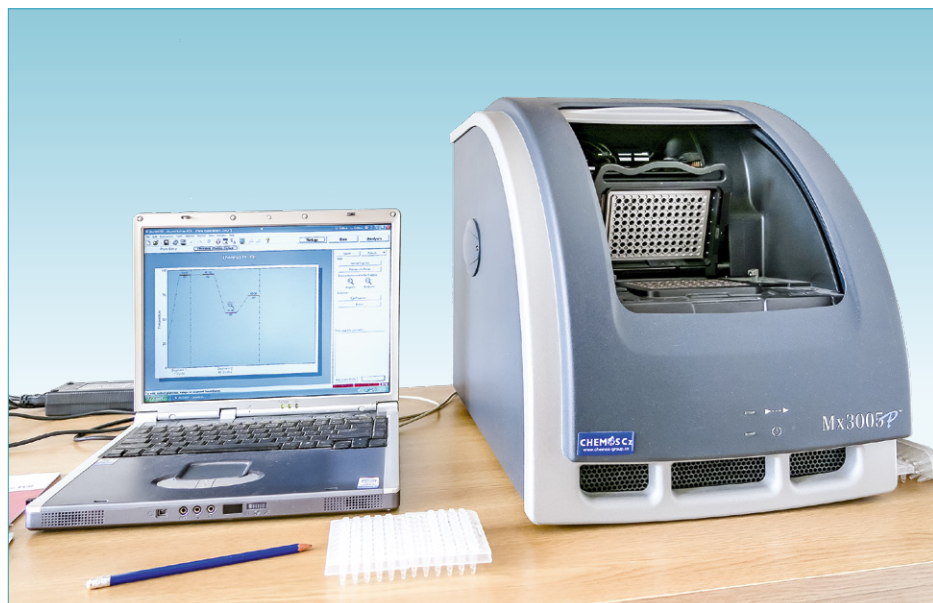
- Inkubovat mix při 75 °C 30 min, během inkubace rozvolnit peletu pomocí pipety a obracet mikrozkušavku.
- Přidat 130 µl Precipitation Solution, promíchat převrácením mikrozkušavky, umístit na led po dobu 5 min.
- Centrifugovat 16 000 × g 5 min (*vytvoření pelety zbytků buněk, proteinů a polysacharidů*).
- Opatrně přelít supernatant do filtrační kolonky (GenElute filtration column, modrá, s 2 ml záchytnou zkušavkou).
- Centrifugovat 1 min při max. otáčkách (16 000 × g).
- Vyhodit filtrační kolonku a k filtrátu přidat 700 µl Binding Solution a promíchat otáčením mikrozkušavky.
- Připravit Binding Column – vložit GenElute Miniprep Binding Column (s červeným kroužkem) do mikrozkušavky (pokud již není sestavené), přidat 500 µl Column Preparation Solution do každé kolonky, centrifugovat 12 000 × g 1 min, vylít filtrát.
- Opatrně přelít (přepipetovat) mix z kroku i) a centrifugovat při max. otáčkách (16 000 g) 1 min, vylít filtrát.
- Přelít zbytek mixu z kroku i) a opakovat centrifugaci, vylít filtrát.
- Přidat 500 µl Wash Solution (pozor – přidat požadované množství etanolu do pufru!) na kolonku, centrifugovat při max. otáčkách (16 000 × g) 1 min, vylít filtrát.
- Přidat dalších 500 µl Wash Solution na kolonku a centrifugovat při max. otáčkách 3 min (vysušení kolonky), filtrát se nesmí dostat na kolonku! (setřít filtrát, který se drží vně kolony).
- Přenést kolonku s membránou do nové 2,0 ml mikrozkušavky, opatrně přidat 100 µl předehřátého (65 °C) elučního pufru (Elution Solution) přímo na střed membrány a centrifugovat při max. otáčkách (16 000 × g) 1 min, vyhodit membránu (*eluze DNA*).
- Po extrakci DNA je nezbytné stanovení její kvality a kvantity pomocí spektrofotometru. Čistota DNA se hodnotí na základě stanovení poměru absorbance při 260 a 280 nm (čistá DNA má A_{260}/A_{280} 1,7–1,9).
- Zamrazit vzorky DNA (při –20 °C, pro dlouhodobé uchování při –80 °C).

2.3.2 PCR reakce

Technické vybavení potřebné pro real-time PCR

- Termocykler (Mx3005P qPCR System – Agilent Technologies) – obr. 2
- Počítač – řídicí jednotka termocykleru (součástí termocykleru)
- Software na vyhodnocení PCR reakcí (součástí termocykleru)
- Laminární RNA/DNA box (Captair Biocap RNA/DNA nebo Köttermann 8580)
- Minicentrifuga (Biosan Multi-Spin MSC-6000)
- Vortex (Techno Kartell TK3S)
- Centrifuga (na destičky) – není nezbytná (zkvalitnění práce)
- Plastové RNase-free mikrozkušavky 1,5 ml (Eppendorf) – příprava premixu
- Pipety – 0,2–2,0 µl, 2–20 µl, 20–200 µl a 100–1000 µl (Finnpipette), kompatibilní sterilní RNase-free špičky (nejlépe s filtrem – zabránění kontaminaci)
- Autokláv – sterilizace špiček, pipet, mikrozkušavek (Stolní laboratorní autokláv OT 032)
- Chladicí podložka nebo polyesterová nádoba na led
- PCR destičky – 96 jamek (Bio-Rad)
- Jednorázové rukavice

Obr. 2: Termocykler Mx3005P qPCR



Chemikálie potřebné pro real-time PCR

- Druhově specifické primery a TaqMan sonda (syntéza firmou Generi Biotech, s.r.o. podle sekvencí popsanych v uvedené publikacích) – tab. 1
- FastStart Universal Probe Master (ROX) [Roche Diagnostics, Mannheim, Germany, kat. č. 04913949001]
- FastStart Universal SYBR Green Master (ROX) [Roche Diagnostics, Mannheim, Germany, kat. č. 04 913 850 001]
- DNase/RNase Free dH₂O (Sigma-Aldrich, kat. č. W4502)

Tab. 1: Sekvence použitých primerů a TaqMan sond pro bakterie a interní kontrolu

Název primeru	Sekvence primeru, sondy (5´–3´)	Poznámka
ECA-CSL-1F	CGGCATCATAAAAACACGCC	<i>Pectobacterium atrosepticum</i> Brierley <i>et al.</i> , 2008
ECA-CSL-89R	CCTGTGTAATATCCGAAAGGTGG	
ECA-CSL-36T-P	[Cy5] ACATTCAGGCTGATATCCCCCTGCC [BHQ2]	
SOL-C F	GCCTACACCATCAGGGCTAT	<i>Dickeya solani</i> Pritchard <i>et al.</i> , 2013
SOL-C R	ACACTACAGCGGCATAAAC	
SOL-C P	[FAM] CCAGGCCGTGCTCGAAATCC [BHQ2]	
MultiPot-F	GGTTTCGTAATGTTTCCTCACCAA	housekeeping gen (interní kontrola) Massart <i>et al.</i> , 2014
MultiPot-R	AAAGGTATTTATCCAGCAGTAGATCCTT	
MultiPot-P	[VIC] CATGGTTGACGTTGAAT [MGBNFQ]	

Legenda: FAM – 6-carboxyfluorescein; Cy5 – 1-(5-karboxypentyl)-1'-methylindodikarboxyaninhalid N hydroxysukcinimidylester; VIC – 4,7,2'-trichloro-7'-phenyl-6-carboxyfluorescein; MGBNFQ – Minor Groove Binder Nonfluorescent Quencher

Před zahájením přípravy PCR reakce nutno připravit:

- Naředit primery a sondu na pracovní koncentraci (10 µM) pomocí RNase-free dH₂O
- Rozpustit na ledu primery a sondu (pokud jsou již naředěné)
- Rozpustit na ledu složky reakčního kitu

Vlastní postup real-time PCR reakce

Všeobecné pokyny:

- všechny složky kitu FastStart Universal Probe Master (ROX) uchovávat v mrazničce, chránit před světlem

- používané chemikálie rozmrazit až těsně před použitím, promíchat (zvortexovat)
- rozmrazené vzorky DNA udržovat při 0 °C na ledu, před odebráním určitého množství vždy promíchat
- namíchané vzorky udržovat při 0 °C na ledu nebo chladicí podložce
- pracovat sterilně (předcházení kontaminace reakcí)

Příprava reakční směsi (premixu)

Nejprve se do mikrozkušavky (1,5 ml) připraví tzv. premix (namíchaná reakční směs pro všechny hodnocené vzorky bez DNA). Objemy jednotlivých komponent se musí vypočítat podle počtu analyzovaných vzorků. Do reakce se navíc zařadí pozitivní kontrola (standard) a negativní kontrola (NTC – bez templátu a DNA z negativní – zdravé rostliny). Reakce probíhaly v duplikátech pro eliminaci chybných výsledků. Je nutné počítat s rezervou 10 % pro kompenzaci možných chyb pipetováním. Po napipetování všech složek se premix pipetou dobře promíchá a krátce odstředí.

Složení a objemy reakční směsi pro *P. atrosepticum*, *D. solani* a interní kontrolu (jedna reakce, 25 µl)

TaqMan real-time PCR:

■ FastStart Universal Probe Master (ROX)	12,5 µl (1×)
■ Primer ECA-CSL-1F/SOL-C F (10 µM)	0,75 µl (300 nM)
■ Primer ECA-CSL-89R/SOL-C R (10 µM)	0,75 µl (300 nM)
■ Primer ECA-CSL-36T-P/SOL-C P (10 µM)	0,25 µl (100 nM)
■ Primer MultiPot-F (10 µM)	0,75 µl (300 nM)
■ Primer MultiPot-R (10 µM)	0,75 µl (300 nM)
■ Sonda MultiPot-P (10 µM)	0,63 µl (250 nM)
■ RNase Free dH ₂ O	6,62 µl
■ DNA (5–10 ng/µl, ředěno 10×)	2,0 µl

Sybr Green real-time PCR:

■ FastStart Universal SYBR Green Master (ROX)	12,5 µl (1×)
■ Primer ECA-CSL-1F/SOL-C F/MultiPot-F (10 µM)	0,75 µl (300 nM)
■ Primer ECA-CSL-89R/SOL-C R/MultiPot-R (10 µM)	0,75 µl (300 nM)
■ PCR-grade dH ₂ O	9,0 µl
■ DNA (5–10 ng/µl, ředěno 10×)	2,0 µl

Nanesení reakční směsi (premixu) na destičku (96 jamek)

- Ze zásobního reakčního mixu napipetovat do každé jamky na destičce určené množství reakční směsi a k tomu přidat určený objem naředěné DNA hodnoceného vzorku. Pipetou DNA opatrně promíchat s premixem. PCR reakce probíhá v objemu 25 µl reakční směsi.
- Do několika jamek ke každému premixu přidat místo DNA pouze vodu (slepý vzorek = NTC – *no template control*) a DNA z negativní (zdravé) rostliny.
- Destičku uzavřít průhledným krytem.
- Destičku vhodné následně krátce stočit na centrifuze (1 500 × g) ve speciálním rotoru, aby stekl reakční mix ze stěn a odstranily se případné vzduchové bublinky.
- Pokud není možné provést PCR amplifikaci bezprostředně po přípravě, nutné napipetovanou destičku uložit krátkodobě v chladničce, eventuálně v mrazničce.

Nastavení pozice vzorků, popis vzorků a nastavení protokolu podmínek reakcí

Reakce se provede v termocykleru Mx3005P qPCR System. Nastavení pozice testovaných vzorků, negativní a pozitivní kontroly v jednotlivých jamkách PCR-destičky (obr. 3), popis vzorků a nastavení protokolu podmínek reakcí (obr. 4) se provede v příslušném softwaru, který je součástí termocykleru. Při použití jiného typu termocykleru se může vzhled a používání software lišit.

Reakční podmínky pro *P. atrosepticum* a interní kontrolu

TaqMan real-time PCR:

1×	95 °C, 15 min
40×	95 °C, 25 s
	60 °C, 60 s
	72 °C, 20 s

Sybr Green real-time PCR:

1×	95 °C, 15 min
40×	95 °C, 25 s
	60 °C, 60 s
	72 °C, 20 s
1×	95 °C, 30 s
	60 °C, 60 s
	95 °C, 30 s

Reakční podmínky pro *D. solani* a interní kontrolu

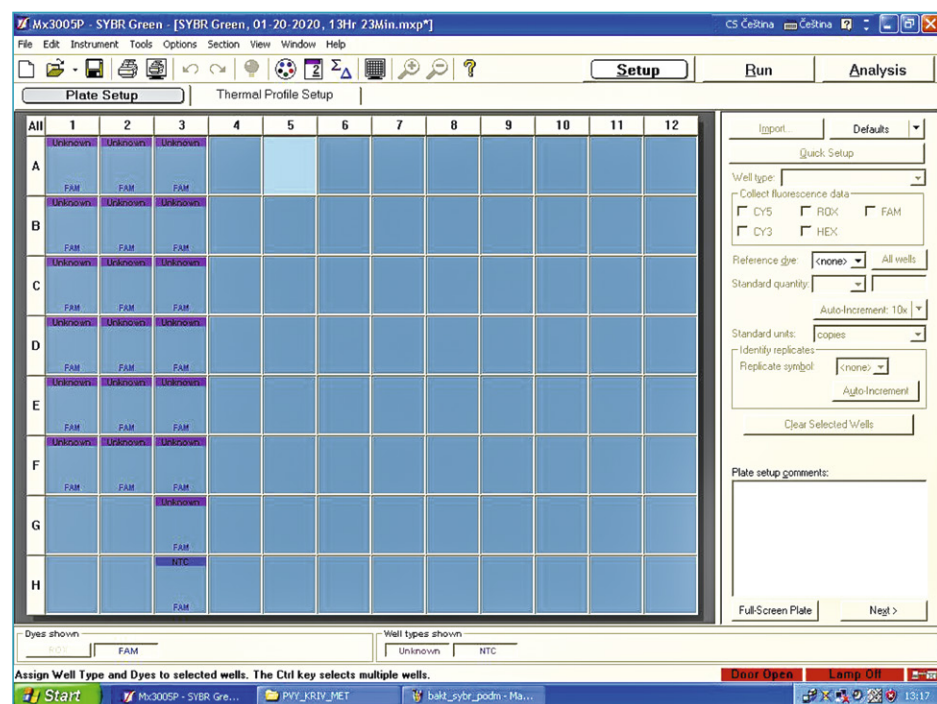
TaqMan real-time PCR:

- 1× 95 °C, 15 min
- 40× 95 °C, 25 s
- 55 °C, 60 s
- 72 °C, 20 s

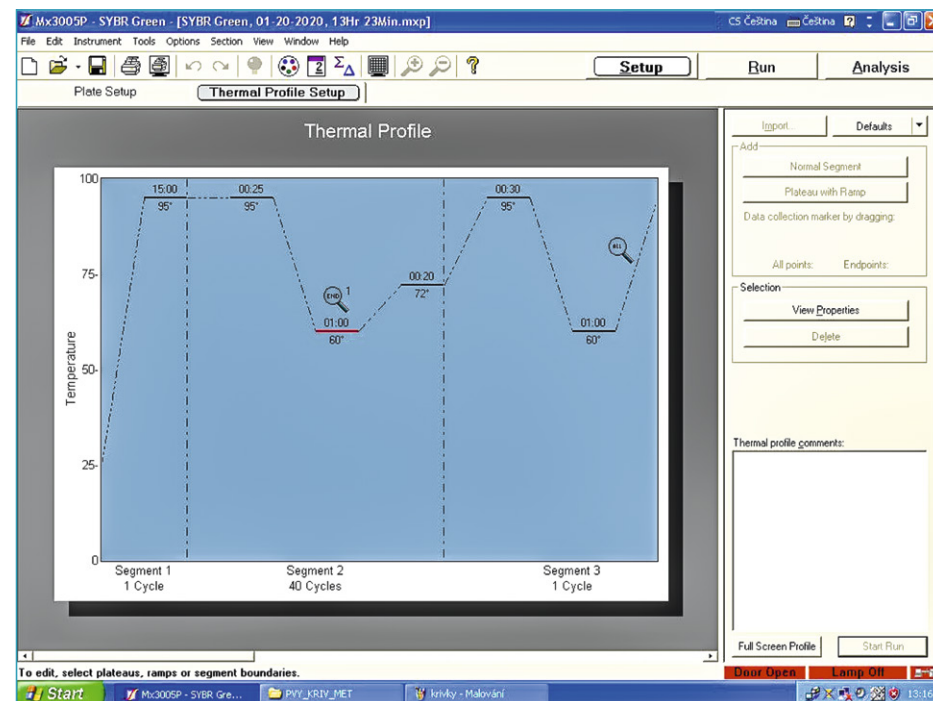
Sybr Green real-time PCR:

- 1× 95 °C, 15 min
- 40× 95 °C, 25 s
- 55 °C, 60 s
- 72 °C, 20 s
- 1× 95 °C, 30 s
- 55 °C, 60 s
- 95 °C, 30 s

Obr. 3: Nastavení pozice vzorků a popis vzorků v softwaru termocyklieru



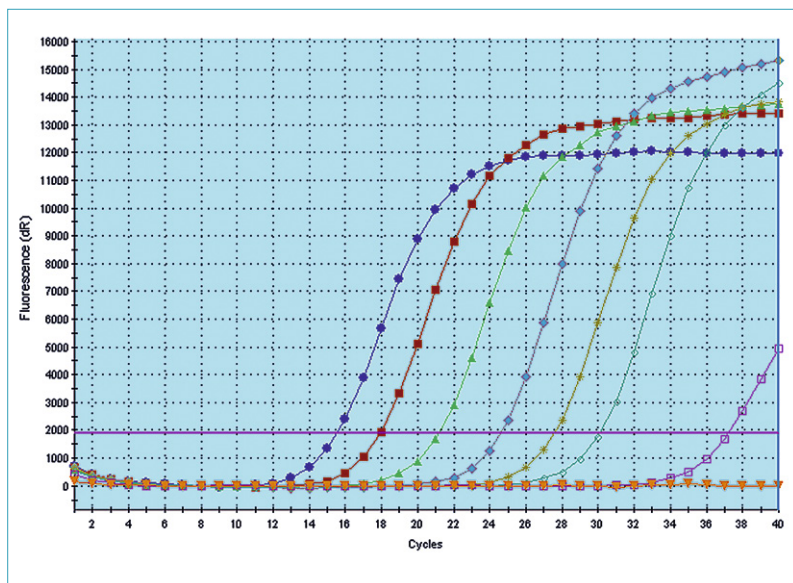
Obr. 4: Nastavení protokolu podmínek Sybr Green real-time PCR reakcí v softwaru termocyklieru



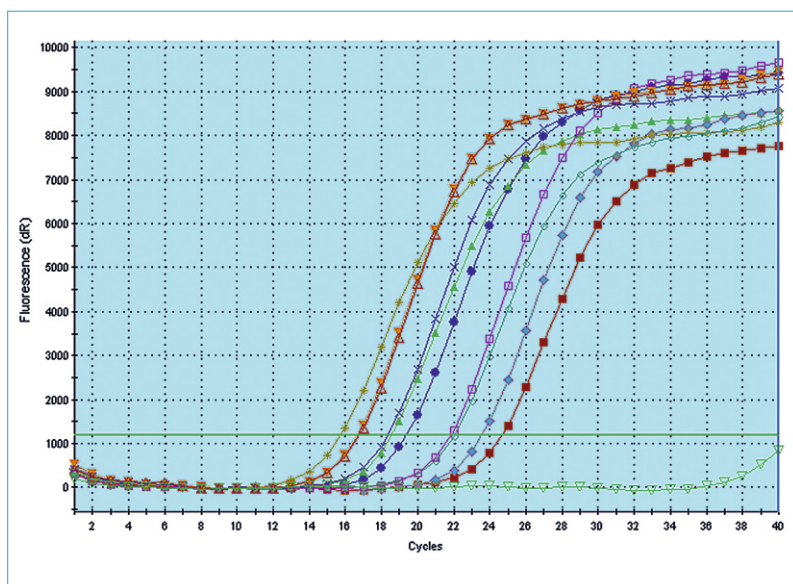
2.3.3 Vyhodnocení real-time PCR reakce

Na základě hodnot C_T (Threshold cycle) sledovaných vzorků, pozitivní kontroly (standard), interní kontroly a negativní kontroly (zdravá rostlina) se vyhodnotí real-time PCR reakce (obr. 5–7 a 9). Stanoví se, zda je testovaný vzorek daného druhu negativní nebo pozitivní na *P. atrosepticum* nebo *D. solani*. Veškeré hodnoty C_t nižší než 35 jsou považovány za pozitivní. Vzorky na hranici detekce ($C_t = 35$) musí být překontrolovány opakováním PCR reakce. Interní standard (obr. 6) zařazený do testů, jehož C_t se pohybuje od 15 do 25 (průměrná hodnota C_t je 20) slouží ke kontrole kvality extrahované DNA a vzniku falešně negativních výsledků. U metody Sybr Green se ověří specifita a čistota produktů po posledním cyklu pomocí analýzy teploty tání (*melting analyse*) (obr. 8 a 10).

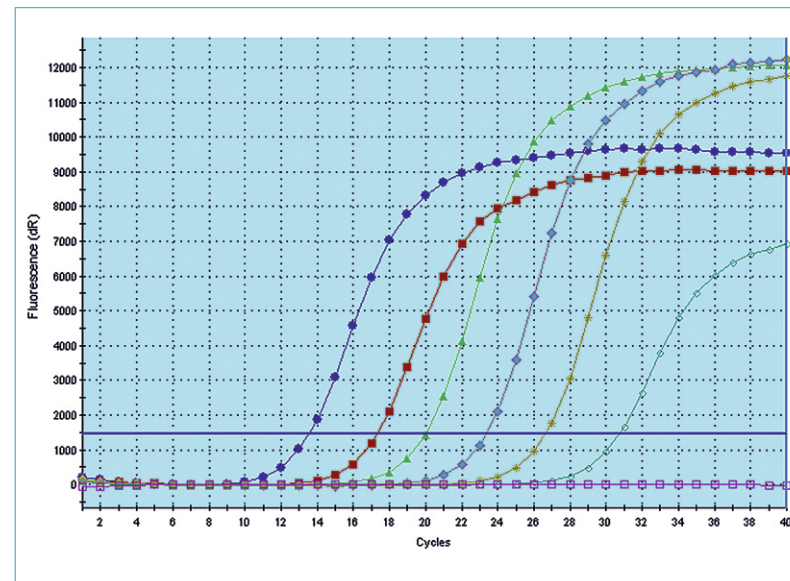
Obr. 5: Detekce *Pectobacterium atrosepticum* pomocí TaqMan real-time PCR (amplifikační křivky ředící řady, 1 : 1, 1 : 10, 1 : 10², 1 : 10³, 1 : 10⁴ a 1 : 10⁵, fialová – negativní kontrola, Ct 37; oranžová – blank, premix)



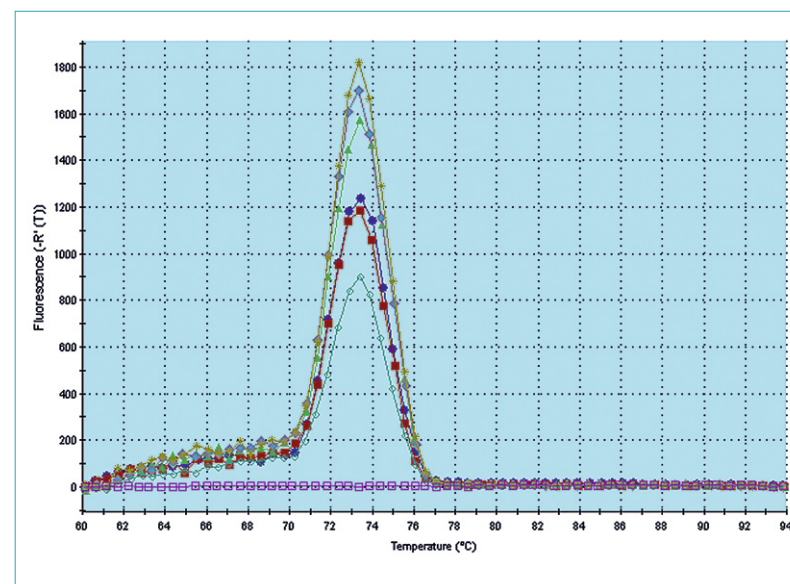
Obr. 6: Reakce vnitřního standardu v TaqMan real-time PCR (amplifikační křivky)



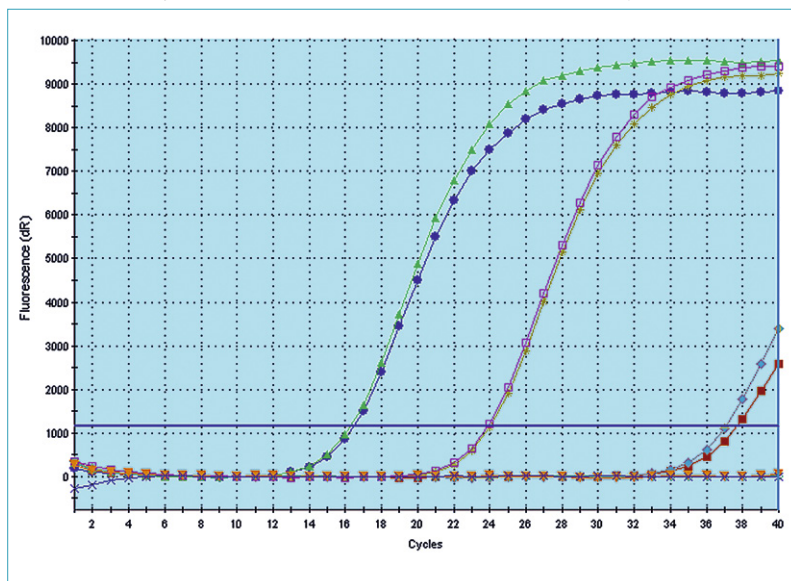
Obr. 7: Detekce *Pectobacterium atrosepticum* pomocí Sybr Green real-time PCR (amplifikační křivky ředící řady (1 : 1, 1 : 10, 1 : 10², 1 : 10³, 1 : 10⁴ a 1 : 10⁵))



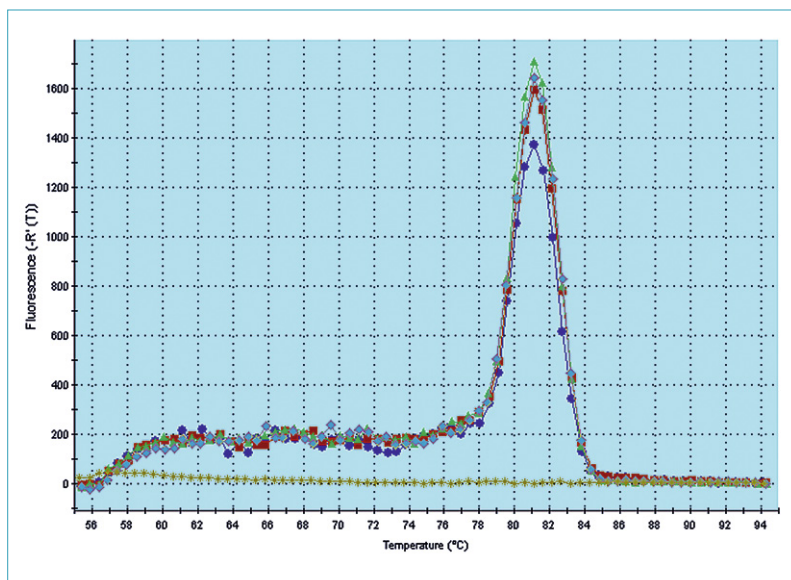
Obr. 8: Detekce *Pectobacterium atrosepticum* metodou Sybr Green real-time PCR (disociační křivky)



Obr. 9: Detekce *Dickeya solani* metodou TaqMan real-time PCR (amplifikační křivky)



Obr. 10: Detekce *Dickeya solani* metodou Sybr Green real-time PCR (disociační křivky)



2.4 PŘÍKLAD PRAKTICKÉHO VYUŽITÍ

Do experimentů byly zařazeny stonky a hlízy bramboru s mokrou hnilobou a kultury *P. atrosepticum* a *D. solani* pocházející ze sbírky bakterií. Při extrakci DNA, zvláště při použití silikagelových kolonek komerčních extrakčních sad, vystává riziko jejich ucpávání bobtnavým škrobem, kterého hlízy bramboru obsahují velké množství. Z tohoto důvodu je nezbytné optimalizovat hmotnost navážky vzorku, aby nedocházelo k jejímu předimenzování a následnému ucpávání kolonek. Při těchto potížích může docházet k extrakci DNA o nízké kvalitě a kvantitě a následná PCR analýza může potom vykazovat falešně negativní výsledky. Pro správný průběh PCR reakcí byla stanovena koncentrace primerů a sond. Dalším úkolem bylo zjištění hranice detekce optimalizované real-time PCR metody. Pro toto zjištění byla vytvořena ředící řada (1:1, 1:10, 1:10², 1:10³, 1:10⁴ a 1:10⁵). Byla ředěna purifikovaná DNA z přirozeně infikovaných hlíz.

Na základě všech provedených analýz byly všechny testované vzorky zařazené do experimentů specificky a spolehlivě diagnostikovány (tab. 3 a 4). Po vyhodnocení ředící řady byly veškeré hodnoty C_t nižší než 35 považovány za pozitivní a vyšší za negativní. Pro multiplex PCR reakce je vždy nezbytná optimalizace koncentrací primerů a sond. Po provedení PCR reakcí s různými poměry množství primerů a sond byla stanovena jejich optimální finální koncentrace, tj. 300 nM každého primeru pro danou bakterii, 100 nM TaqMan sondy pro bakterii a 300 nM každého primeru pro vnitřní standard, 250 nM TaqMan sondy pro vnitřní standard.

Tab. 2: Detekce bakterií *Pectobacterium atrosepticum* a *Dickeya solani* pomocí real-time PCR (průměrné hodnoty C_t)

Ředění	<i>Pectobacterium atrosepticum</i>		<i>Dickeya solani</i>	
	TaqMan	Sybr Green	TaqMan	Sybr Green
1:1	14,8	+	15,3	+
1:10	18,0	+	18,4	+
1:10 ²	20,5	+	21,7	+
1:10 ³	24,2	+	24,2	+
1:10 ⁴	26,8	+	27,6	+
1:10 ⁵	30,0	+	30,5	+
K ⁻	36,8	-	37,2	-
Blank (pufr)	-	-	-	-

Výsledky ředící řady (tab. 2) dále ukázaly velmi vysokou citlivost použité real-time PCR metody. Z výsledků je patrné, že testované vzorky byly všemi metodami specificky a spolehlivě detekovány. Mezi oběma variantami real-time PCR nebyly prokázány významné rozdíly za předpokladu odpovídající *melting* analýzy u varianty s využitím nespecifického barviva SYBR Green. Kvalita DNA a případná inhibice real-time PCR reakcí byla kontrolována zařazením vnitřního standardu do PCR. Reakce interního standardu prokázala kvalitní extrakci DNA. Použitý postup extrakce nukleových kyselin pomocí silikagelových kolonek byl vhodný pro získání DNA z hlíz bramboru o odpovídajících parametrech. Z hlediska kvality a kvantity DNA potřebné do PCR je výběr správného postupu extrakce DNA stěžejní a ovlivňuje exaktnost následných PCR analýz. Hlavním omezením pro použití diagnostických technik založených na PCR je výskyt falešně negativních výsledků kvůli nežádoucímu účinku inhibitorů PCR, reagentů nebo dysfunkcí termocyklu (Abu Al-soud *et Rådström*, 1998; Malorny *et al.*, 2004). Problémy může potencionálně způsobit kompetitivní amplifikační účinek, kdy velké množství jednoho DNA produktu inhibuje amplifikaci jiných DNA produktů (Boivin *et al.*, 2004). K ověřování negativních reakcí slouží tzv. vnitřní standard (Paterson, 2006), protože PCR může být inhibována přítomností polysacharidů a fenolických sloučenin obsažených v hlízách bramboru (van der Wolf *et al.*, 2001).

Tab. 3: Porovnání detekce *P. atrosepticum* pomocí TaqMan a SybrGreen real-time PCR

Testovaný vzorek	TaqMan real-time PCR		SybrGreen real-time PCR	
kultura 11	12,8	+	13,1	+
kultura 12	13,7	+	12,5	+
kultura 13	12,4	+	12,8	+
stonek 001	18,5	+	17,2	+
stonek 002	17,4	+	18,6	+
stonek 003	17,8	+	17,9	+
K ⁺ (CPPB-081)	14,6	+	13,8	+
K ⁻	37,2	-	36,6	-
Blank (pufr)	-	-	-	-

Tab. 4: Porovnání detekce *Dickeya solani* pomocí TaqMan a SybrGreen real-time PCR

Testovaný vzorek	TaqMan real-time PCR		SybrGreen real-time PCR	
kultura 8	13,2	+	12,7	+
kultura 9	13,6	+	12,8	+
kultura 10	12,6	+	13,2	+
stonek 006	16,7	+	17,1	+
hlíza 018	18,5	+	18,1	+
hlíza 019	19,1	+	17,5	+
hlíza 020	18,1	+	19,2	+
K ⁺ (CPPB-050)	12,8	+	13,5	+
K ⁻	36,7	-	37,1	-
Blank (pufr)	-	-	-	-

3. SROVNÁNÍ NOVOSTI POSTUPŮ

V metodice jsou uvedeny podrobné ověřené a optimalizované laboratorní manuály postupů detekce pektinolytických bakterií *P. atrosepticum* a *D. solani* v pletivech bramboru nebo čisté kultuře pomocí real-time PCR (TaqMan a Sybr Green), které zahrnují přípravu vzorků, izolaci DNA, vlastní postup přípravy reakcí, kontrolu specifity a vyhodnocení výsledků. Kvalitu extrahované DNA a případný vznik možných falešně negativních výsledků lze snadno kontrolovat pomocí vnitřní kontroly zařazené do testů. Použité metody zvýší především rychlost a citlivost detekce uvedených bakterií a zajistí vyšší spolehlivost diagnostiky. Příznaky vyvolané *D. solani* na bramboru jsou nerozeznatelné od *P. atrosepticum*, *P. carotovorum* subsp. *carotovorum*, *D. dianthicola* atd., a proto mají význam exaktní laboratorní diagnostické metody nezávislé na vizuální kontrole. Zmíněné metody mohou pro svoji citlivost odhalit i latentní infekce, které by byly jinak přehlíženy. Protokoly byly optimalizovány pro použití v běžné diagnostické laboratoři vybavené zařízením pro molekulární biologii.

4. POPIS UPLATNĚNÍ CERTIFIKOVANÉ METODIKY

Optimalizované molekulární metody diagnostiky *P. atrosepticum* a *D. solani* založené na PCR (tj. Sybr Green a TaqMan real-timePCR) uvedené v metodice jsou v současnosti velmi perspektivní nejen z hlediska citlivosti, specifčnosti a rychlosti detekce, ale i lepší záruky eliminace nežádoucích technických chyb.

S ohledem na tyto přednosti lze předpokládat jejich širší uplatnění například v kontrolní praxi. Certifikovaná metodika je určena pro pracoviště, která se zabývají diagnostikou patogenů rostlin, především pro akreditované diagnostické laboratoře státní správy, šlechtitelské organizace, výzkumné ústavy a zemědělskou praxi. Podrobné laboratorní protokoly uvedené v metodice mohou sloužit studentům středních a vysokých škol při výuce fytopatologických předmětů zaměřených na diagnostické metody patogenů.

5. EKONOMICKÉ ASPEKTY

Zavedení metodiky do laboratorní praxe (laboratoře přístrojově vybavené na molekulární metody) vyžaduje tyto náklady:

- Pro detekci *P. atrosepticum* a *D. solani* je nezbytné pořízení speciálního přístrojového vybavení jako je termocykler pro real-time PCR (400–900 tis. Kč)
- Cena za extrakci DNA z jednoho vzorku pletiva bramboru potřebné pro real-time PCR je 50–160 Kč (dle zvolené extrakční sady).
- Vlastní náklady na detekci *P. atrosepticum* a *D. solani* pomocí real-time PCR jsou 100–140 Kč (TaqMan, jeden test; dle zvolené reakční sady) nebo 20–50 Kč (Sybr Green; jeden test; dle zvolené reakční sady).

Ceny jsou kalkulovány na základě nejlevnější nabídky spotřebního materiálu, nezahrnují režie a jsou bez DPH. Metoda Sybr Green real-time PCR je v současnosti levnější z důvodu absence sondy, kterou vyžaduje TaqMan real-time PCR. Konvenční PCR je cenově srovnatelná s metodou Sybr Green real-time PCR. Vyžaduje však analýzu konečného produktu pomocí gelové elektroforézy.

Bakterie způsobující bakteriální černání stonku a měkkou hnilobu hlíz bramboru mohou výrazně snížit výnos a kvalitu hlíz. Výskyt černání stonku bramboru v porostu nad 5 až 10 % znamená tzv. sestupnění nebo zamítnutí sadbových brambor v certifikačním řízení. Výrazné ztráty mohou vzniknout během skladování a při manipulaci s hlízami. Ztráty způsobené pektinolytickými bakteriemi během skladování se odhadují na cca 5 % (cca 50 kg/1 t). Při průměrné ceně konzumních nepraných brambor 5,50 Kč/kg se jedná o ztrátu 275 Kč/t. Při průměrné ceně sadbových brambor 9,0 Kč/kg se jedná o ztrátu 450 Kč/t. Při současné ploše konzumních brambor 14 tis. ha a průměrné výtěžnosti hlíz 27 t/ha

se jedná o ztrátu cca 103 mil. Kč. Při ploše sadbových brambor 2,8 tis. ha a průměrné výtěžnosti hlíz 20 t/ha se jedná o ztrátu cca 25 mil. Kč.

Za vhodných podmínek při manipulaci s hlízami (např. vyskladňování, balení, transport) může dojít k namnožení bakterií, které byly přítomné v nezachytitelné koncentraci současnými diagnostickými metodami. Včasná a citlivá detekce *P. atrosepticum* a *D. solani* pomocí real-time PCR ve šlechtitelských a sadbových materiálech přispěje k eliminaci infekce pektinolytickými bakteriemi zamezením dalšího přenosu a tím ke snížení ekonomických ztrát daného podniku.

6. SEZNAM POUŽITÉ SOUVISEJÍCÍ LITERATURY

- Abu Al-Soud, W., Rådström, P. (1998). Capacity of nine thermostable DNA polymerases to mediate DNA amplification in the presence of PCR-inhibiting samples. *Applied and Environmental Microbiology*, 64 (10): 3748–3753.
- Abu-Obeid, I., Khlaif, H., Salem, N. (2018). Detection and Identification of Potato Soft Rot *Pectobacterium carotovorum* subspecies *carotovorum* by PCR Analysis of 16S rDNA in Jordan. *Agricultural Sciences*, 9 (5): 546–556.
- Abu-Obeid, I., Khlaif, H., Salem, N. (2018). Identification and genetic diversity of Jordanian potato soft rot isolates, *Pectobacterium carotovorum* subspecies *carotovorum* (DYE 1969). *African Journal of Biotechnology*, 17 (24): 753–759.
- Ahmed, F.A., Larrea-Sarmiento, A., Alvarez, A.M., Arif, M. (2018). Genome-informed diagnostics for specific and rapid detection of *Pectobacterium* species using recombinase polymerase amplification coupled with a lateral flow device. *Scientific Reports*, 8 (15972): 1–11.
- Akter, S., Sultana, N. (2018). *In-vitro* Management of *Erwinia carotovora* the Causal Organism of Potato Soft Rot Disease, 4 (10): 30–34.
- Boivin, G., Côté, S., Déry, P., De Serres, G., Bergeron, M.G. (2004). Multiplex real-time PCR assay for detection of influenza and human respiratory syncytial viruses. *Journal of Clinical Microbiology*, 42 (1): 45–51.
- Brierley, J., Lees, A., Hilton, A., Wale, S., Peters, J., Elphinstone, J., Boonham, N. (2008): Improving decision making for the management of potato diseases using real-time diagnostics. Potato Council Final Report R253 2008/6.
- Buttimer, C., Hendrix, H., Lucid, A., Neve, H., Noben, J.P., Franz, Ch., O'Mahony, J., Lavigne, R., Coffey, A. (2018). Novel N4-Like Bacteriophages of *Pectobacterium atrosepticum*. *Pharmaceuticals*, 11 (45).
- Carstens, A.B., Djurhuus, A.M., Kot, W., Hansen, L.H. (2019). A novel six-phage cocktail reduces *Pectobacterium atrosepticum* soft rot infection in potato tubers under simulated storage conditions. *FEMS Microbiology Letters*, 366 (9): 1–8.
- Carstens, A.B., Djurhuus, A.M., Kot, W., Jacobs-Sera, D., Hatfull, G.F., Hansen, L.H. (2018). Unlocking the Potential of 46 New Bacteriophages for Biocontrol of *Dickeya solani*. *Viruses*, 10 (11): 1–12.
- Czajkowski, R., De Boer, W. J., Van der Zouwen, P.S., Kastelein, P., Jafra, S., De Haan, E.G. (2013). Virulence of "*Dickeya solani*" and *Dickeya dianthicola* biovar-1 and -7 strains on potato (*Solanum tuberosum*). *Plant Pathology*, 62 (3): 597–610.

- Czajkowski, R., Pérombelon, M.C.M., van Veen, J.A., van der Wolf, J.M. (2011). Control of blackleg and tuber soft rot of potato caused by *Pectobacterium* and *Dickeya* species: a review. *Plant Pathology*, 60 (6): 999 – 1013.
- Czajkowski, R., Pérombelon, M., Jafra, S., Lojkowska, E., Potrykus, M., van der Wolf, J., Sledz, W. (2015). Detection, identification and differentiation of *Pectobacterium* and *Dickeya* species causing potato blackleg and tuber soft rot: a review. *Annals of Applied Biology*, 166 (1): 18–38.
- Fikowicz-Krosko, J., Czajkowski, R. (2017). Fast and reliable screening system to preselect candidate *Dickeya solani* Tn5 mutants in plant tissue-induced genes. *European Journal of Plant Pathology*, 149 (4): 1023–1027.
- Fujimoto, T., Yasuoka, S., Aono, Y., Nakayama, T., Ohki, T., Sayama, M., Maoka, T. (2018). Biochemical, physiological, and molecular characterization of *Dickeya dianthicola* (formerly named *Erwinia chrysanthemi*) causing potato blackleg disease in Japan. *Journal of General Plant Pathology*, 84: 124–136.
- Gill, P., Ghaemi, A. (2008). Nucleic acid isothermal amplification technologies - a review. *Nucleosides Nucleotides Nucleic Acids*, 27: 224–243.
- Golanowska, M., Potrykus, M., Motyka-Pomagruk, A., Kabza, M., Bacci, G., Galardini, M., Bazzicalupo, M., Makalowska, I., Smalla, K., Mengoni, A., Hugouvieux-Cotte-Pattat, N., Lojkowska, E. (2018). Comparison of Highly and Weakly Virulent *Dickeya solani* Strains, With a View on the Pangenome and Panregulon of This Species. *Frontiers in Microbiology*, 9 (1940): 1–19.
- Horká, M., Šalplachta, J., Karásek, P., Kubesová, A., Horký, J., Matoušková, H., Šlais, K., Roth, M. (2013). Combination of capillary isoelectric focusing in a tapered capillary with MALDI-TOF MS for rapid and reliable identification of *Dickeya* species from plant samples. *Analytical Chemistry*, 85: 6806–6812.
- Hosseinzadeh, S., Shams-Bakhsh, M., Sadeghizadeh, M. (2016). Attenuation and quantitation of virulence gene expression in quorum-quenched *Dickeya chrysanthemi*. *Archives of Microbiology*, 199 (1): 51–61.
- Karim, S., McNally, R.R., Nasaruddin, A.S., DeReeper, A., Mauleon, R.P., Charkowski, Leach, J.E., Ben-Hur, A., Triplett, L.R. (2019). Development of the automated primer design workflow uniprimer and diagnostic primers for the broad-host-range plant pathogen *Dickeya dianthicola*. *Plant Diseases*, 103 (11): 2893–2902.
- Khlaif, H., Wreikat, B.I. (2018). The Relationship of Potato Bacterial Soft Rot Disease with Reduced Sugar Content of Potato Tubers and Calcium. *Jordan Journal of Agricultural Sciences*, 14 (1): 81–90.
- Lebeau, A., Reverchon, S., Gaubert, S., Kraepiel, Y., Simond-Cote, E., Nasser, W., Van Gijsegem, F. (2008). The GacA global regulator is required for the appropriate expression of *Erwinia chrysanthemi* 3937 pathogenicity genes during plant infection. *Environmental Microbiology*, 10: 545–559.
- Lebecka, R., Flis, B., Murawska, Z. (2018). Comparison of temperature effects on the in vitro growth and disease development in potato tubers inoculated with bacteria *Pectobacterium atrosepticum*, *P. carotovorum* subsp. *carotovorum* and *Dickeya solani*. *Journal of Phytopathology*, 166 (9): 1–9.
- Lee, J., Kim, S., Park, T.H. (2017). Diversity of bacteriophages infecting *Pectobacterium* from potato fields. *Journal of Plant Pathology*, 99 (2): 453–460.
- Ma, X., Schloop, A., Swingle, B., Perry, K.L. (2018). *Pectobacterium* and *Dickeya* Responsible for Potato Blackleg Disease in New York State in 2016. *Plant Disease*, 102 (9): 1834–1840.
- Malorny, B., Paccasoni, E., Fach, P., Bunge, C., Martin, A., Helmuth, R. (2004). Diagnostic real-time PCR for detection of *Salmonella* in food. *Applied and Environmental Microbiology*, 70 (12): 7046–7052.
- Massart, S., Nagy, C., Jijakli, M.H. (2014). Development of the simultaneous detection of *Ralstonia solanacearum* race 3 and *Clavibacter michiganensis* subsp. *sepedonicus* in potato tubers by a multiplex real-time PCR assay. *Eur J Plant Pathol*, 138: 29–37.
- Mirmajlessi, S.M., Loit, E., Mand, M., Mansouripour, S.M. (2015). Real-time PCR applied to study on plant pathogens: potential applications in diagnosis – a review. *Plant Protect Science*, 51: 177–190.
- Muturi, P., Yu, J., Maina, A. N., Kariuki, S., Mwaura, F. B., Wei, H. (2019). Bacteriophages Isolated in China for the Control of *Pectobacterium carotovorum* Causing Potato Soft Rot in Kenya. *Virologica Sinica*, 34 (3): 287–294.
- Ndivo, F.M., Njeru, E.M., Birgen, J. (2018). Efficacy of Neem, Garlic and Aloe Extracts in the Management of Postharvest Potato Soft Rot Caused by *Erwinia carotovora*. *Asian Journal of Research in Crop Science*, 1 (2): 1–7.
- Ngadze, E. (2018). Calcium soil amendment increases resistance of potato to blackleg and soft rot pathogens. *African Journal of Food, Agriculture, Nutrition and Development*, 18 (01): 12975–12991.
- Nikitin, M.M., Statsyuk, N.V., Frantsuzov, P.A., Dzhevakhya, V.G., Golikov, A.G. (2018). Matrix approach to the simultaneous detection of multiple potato pathogens by real-time PCR. *Journal of Applied Microbiology*, 124 (3): 797–809.
- Ocenar, J., Arizala, D., Boluk, G., Dhakal, U., Gunarathne, S., Paudel, S., Dobhal, S., Arif, M. 2019. Development of a robust, field-deployable loop-mediated isothermal amplification (LAMP) assay for specific detection of potato pathogen *Dickeya dianthicola* targeting a unique genomic region. *PLoS One*, 14 (6): 0218868.
- Okubara, P.A., Schroeder, K.L., Paulitz, T.C. (2005). Real-time polymerase chain reaction: applications to studies on soilborne pathogens. *Canadian Journal of Plant Pathology*, 27: 300–313.
- Paterson, R.R.M. (2006). Internal amplification controls have not been employed in fungal PCR hence potential false negative results. *J. Appl. Microbiol.*, 102: 1–10.
- Potrykus, M., Sledz, W., Golanowska, M., Sławiak, M., Binek, A., Motyka, A., Zoledowska, S., Czajkowski, R., Lojkowska, E. (2014). Simultaneous detection of major blackleg and soft rot bacterial pathogens in potato by multiplex polymerase chain reaction. *Annals of Applied Biology*, 165 (3): 474–487.
- Pritchard, L., Glover, R.H., Humphris, S.N., Elphinstone J. (2015). Genomics and Taxonomy in Diagnostics for Food Security: soft-rotting enterobacterial plant pathogens. *Analytical methods*, 8 (1): 1–32.
- Pritchard, L., Humphris, S., Saddler, G.S., Parkinson, N.M., Bertrand, V., Elphinstone, J.G., Toth, I., K. (2013). Detection of phytopathogens of the genus *Dickeya* using a PCR primer prediction pipeline for draft bacterial genome sequences. *Plant Pathol*, 62: 587–596.
- Raoul des Essarts, Y., Cigna, J., Quetu-Laurent, A., Caron, A., Munier, E., Beury-Cirou, A., Hélias, V., Faure, D. (2015). Biocontrol of the potato blackleg and soft-rot diseases caused by *Dickeya dianthicola*. *Applied and Environmental Microbiology*, 82 (1): 268–278.
- Reverchon, S., Nasser, W. (2013). *Dickeya* ecology, environment sensing and regulation of virulence programme. *Environmental Microbiology Reports*, 5 (5): 622–636.
- Salem, E.A., El-Shafea, Y.M.A. (2018). Biological control of potato soft rot caused by *Erwinia carotovora* subsp. *carotovora*. *Egyptian Journal of Biological Pest Control*, 28 (94): 1–5.
- Skelsey, P., Humphris, S.N., Calmpbell, E.J., Toth, I.K. (2018). Threat of establishment of non-indigenous potato blackleg and tuber soft rot pathogens in Great Britain under climate change. *PLoS ONE*, 13 (10): 1–18.

- Šalplachta, J., Kubesová, A., Horký, J., Matoušková, H., Tesařová, M., Horká, M. (2015). Characterization of *Dickeya* and *Pectobacterium* species by capillary electrophoretic techniques and MALDI-TOF MS. *Analytical and Bioanalytical Chemistry*, 407 (25): 7625–7635.
- Toth, I.K., Van der Wolf, J.M., Saddler, G., Lojkowska, E., He'lias, V., Pirhonen, M. (2011). *Dickeya* species: an emerging problem for potato production in Europe. *Plant Pathology*, 60 (3): 385–399.
- Toth, I., Humphris, S., Campbell, E. (2015). Why Genomics Research on *Pectobacterium* and *Dickeya* Makes a Difference. *American Journal of Potato Research*, 92 (2): 218–222.
- Tsrör, L., Erlich, O., Hazanovsky, M., Ben Daniel, B., Zig, U., Lebiush, S. (2011). Detection of *Dickeya* spp. latent infection in potato seed tubers using PCR or ELISA and correlation with disease incidence in commercial field crops under hot climate conditions. *Plant Pathology*, 61 (1): 161–168.
- Van der Wolf, J.M., van Beckhoven, J.R.C.M., Bonanats, P.J.M., Schoen, C.D. (2001). New technologies for sensitive and specific routine detection of plant pathogenic bacteria. In: De Boer, S. H. ed. *Plant Pathogenic Bacteria*. Dordrecht: Kluwer, 77–79.
- Vijaya Satya, R.V., Kumar, K., Zavaljevski, N., Reifman, J. (2010). A high-throughput pipeline for the design of real-time PCR signatures. *BMC Bioinformatics*, 11: 340.
- Ward, E., Foster, S.J., Fraaije, B.A., McCartney, H.A. (2004). Plant pathogen diagnostics: immunological and nucleic acid-based approaches. *Annals of Applied Biology*, 145: 1–16.
- Zaczek-Moczydlowska, M., Fleming, C.C., Young, G.K., Campbell, K., O'Hanlon, R. (2019). *Pectobacterium* and *Dickeya* species detected in vegetables in Northern Ireland. *European Journal of Plant Pathology*. 154 (3): 635–647.

7. SEZNAM VYBRANÝCH PUBLIKACÍ, KTERÉ PŘEDCHÁZELY METODICE

- Dědič, P., Kmoch, M., Krpálková, A. (2016). Alternativní metody a postupy laboratorní diagnózy *Clavibacter michiganensis* subsp. *sepedonicus*. Certifikovaná metodika (osvědčení UKZUZ 6700/2016-MZE-17221). První vydání. Havlíčkův Brod: Výzkumný ústav bramborářský, Poraženský svaz „Bramborářský kroužek“. Praktické informace č. 60. ISBN 978-80-86940-68-7.
- Dědič, P., Kmoch, M., Mertelík, J. (2016). Detection of PSTVd originating from ornamental plants by qRT-PCR and Luminex xTAG technology. In: 16th EAPR Virology section meeting, 8th Annual meeting of PVY-Wide organization, May 31 – Jun 3, 2016, Ljubljana, Slovenia. Abstracts p. 79.
- Kmoch, M., Dědič, P. (2015). Molekulární metody detekce viroidu vřetenovitosti hlíz bramboru (*Potato spindle tuber viroid*, PSTVd). *Úroda*, LXIII (12, vědecká příloha): 195–198. ISSN 0139-6013.
- Kmoch, M., Dědič, P. (2015). Nové možnosti citlivé detekce viroidu vřetenovitosti hlíz bramboru (*Potato spindle tuber viroid*, PSTVd). In: XX. Česká a Slovenská konference o ochraně rostlin, Praha, 1. –3.9.2015. Sborník abstraktů. s. 20.
- Kmoch, M., Dědič, P. (2018). Metodika detekce PSTVd (*Potato spindle tuber viroid*) v bramboru a okrasných rostlinách pomocí Real-Time RT-PCR a technologie Luminex. Certifikovaná metodika (osvědčení UKZUZ 155885/2018). První vydání. Havlíčkův Brod: Výzkumný ústav bramborářský. ISBN 978-80-86940-79-3.
- Kmoch, M. (2018). Detekce PVY (*Potato virus Y*) v listech a hlízách bramboru pomocí TaqMan real-time RT-PCR. *Úroda* LXVI (12, vědecká příloha): 205–208. ISSN 0139-6013.
- Kmoch, M. (2019). Zjišťování přítomnosti PVY (*Potato virus Y*) v sadbových hlízách bramboru pomocí real-time RT-PCR. In: Osivo a sadba - XIV. národní odborný a vědecký seminář: sborník referátů. Praha: Česká zemědělská univerzita, katedra rostlinné výroby, s. 144–149. ISBN 978-80-213-2732-0.



**VÝZKUMNÝ ÚSTAV
BRAMBORÁŘSKÝ
HAVLÍČKŮV BROD**

Řada PRAKTICKÉ INFORMACE – číslo 81

**METODIKA DIAGNOSTIKY BAKTERIÍ *PECTOBACTERIUM
ATROSEPTICUM* A *DICKEYA SOLANI* POMOCÍ REAL-TIME PCR**

Certifikovaná metodika (osvědčení UKZUZ 217957/2020).

Vydal: Výzkumný ústav bramborářský Havlíčkův Brod, s. r. o.,
Dobrovského 2366, CZ-580 01 Havlíčkův Brod.

Text neprošel jazykovou úpravou.

Vydání první. Náklad: 50 výtisků.

Obrázky: archiv autorů. Grafická úprava: Jiří Trachtulec.

ISBN 978-80-86940-90-8

© Výzkumný ústav bramborářský Havlíčkův Brod, s. r. o., 2020. *Tato publikace nesmí být přetiskována vcelku nebo po částech, přenášena nebo uváděna do oběhu pomocí elektronických, mechanických, fotografických či jiných prostředků bez výslovného svolení autorů.*

www.vubhb.cz