

(19)
ČESKÁ
REPUBLIKA



ÚŘAD
PRŮMYSLOVÉHO
VLASTNICTVÍ

(21) Číslo přihlášky: **2008-365**
(22) Přihlášeno: **13.06.2008**
(40) Zveřejněno: **23.12.2009**
(Věstník č. 51/2009)
(47) Uděleno: **03.12.2009**
(24) Oznámení o udělení ve Věstníku: **13.01.2010**
(Věstník č. 2/2010)

(13) Druh dokumentu: **B6**

(51) Int. Cl.:
C12N 15/10 (2006.01)
C12Q 1/68 (2006.01)
C12N 15/11 (2006.01)
C07H 21/04 (2006.01)

(56) Relevantní dokumenty:

Shimizu a kol. (1998) J. Gen. Appl. Microbiol. 44, 251-258; databáze EMBL, přístupové číslo AB011653; Shimizu a kol. (1997) J. Gen. Appl. Microbiol. 43, 145-150.

(73) Majitel patentu:

Agrotest Fyto, s. r. o., Kroměříž, CZ

(72) Původce:

Matušinsky Pavel Mgr. PhD., Kroměříž, CZ
Mikolášová Renata Ing. PhD., Kroměříž, CZ
Klem Karel Ing. PhD., Koryčany, CZ
Spitzer Tomáš RNDr. PhD., Kroměříž, CZ
Tvarůžek Ludvík Dr. Ing., Kroměříž, CZ

(74) Zástupce:

Ministerstvo zemědělství ČR, Mgr. Hana Jirkalová,
Těšnov 17, Praha 1, 11705

(54) Název vynálezu:

Primery pro detekci Cochliobolus sativus v obilovinách

(57) Anotace:

Primery pro detekci Cochliobolus sativus, zejména v obilovinách, metodou PCR o složení
COSA-F (SEQ ID: 1) TCAAGCTGACCAAATCACCTTC
COSA-R (SEQ ID: 2)
CTTCTCACCAGCATCTGAATATATGA,
které umožní amplifikaci fragmentu patogena o velikosti 570 bp.

Využití primerů je jednak v rostlinolékařství při včasné diagnostice patogena, což umožní cílenou volbu účinné ochrany, a jednak ve šlechtitelských procesech při hodnocení genových zdrojů při selekci.

Primery pro detekci *Cochliobolus sativus* v obilovinách

Oblast techniky

5

Vynález se týká nových primerů pro detekci houbového patogena *Cochliobolus sativus* v obilovinách, zejména v ječmeni a pšenici, což má význam v rostlinolékařství a molekulární biologii.

10

Dosavadní stav techniky

Patogen *Cochliobolus sativus* [(Ito & Kurib.) Drechsler ex Dastur] (anamorfa *Bipolaris sorokiniana* [(Sacc.) Schoem.]) napadá listy ječmene a způsobuje chorobu s českým názvem „Vřetenovitá hnědá skvrnitost ječmene“ (anglicky „Spot blight“). Na listech vznikají oválné nekrotizující skvrny, čímž dochází k redukci fotosyntetizující plochy listů, případně k senescenci celé rostliny. *Cochliobolus sativus* napadá také kořeny a báze stébel pšenice, přičemž vznikají ohraničené tmavě hnědé protáhlé léze. Při silné infekci napadená tkáň odumírá, čímž dochází k oslabení rostliny. V některých případech mohou být napadeny i listy, popřípadě klasy či zrno. Škodlivost tohoto patogena u obou hostitelů je větší v teplejších oblastech, nicméně podle našich zjištění v roce 2007 nabývá napadení zejména listů ječmene na území ČR na významu.

Metody diagnostiky patogenů molekulárními technikami jsou využívány zejména v medicíně s celou řadou patentů a vědecké literatury; tyto zdroje neuvádíme, jelikož je to nad rámec předkládaného textu. V posledních letech tyto metody nabývají velkého významu i v rostlinolékařství. Princip diagnostiky rostlinných patogenů pomocí PCR je popsán v literatuře (např. Henson a French, 1993, Annu. Rev. Phytopathol. „The polymerase chain reaction and plant disease diagnostics.“ nebo Ward *et al.*, Ann. App. Biol, 2004, „Plant pathogen diagnostics: immunological and nucleic acid-based approaches.“ nebo Atkins a Clark, J. App. Genet, 2004, „Fungal molecular diagnostics: a mini review.“ nebo Lévesque, Can. J. Plant Pathol, 2001, „Molecular methods for detection of plant pathogens – What is the future?“). Přesná a včasná diagnostika patogena má velký význam v systému ochrany polních plodin. Klasické metody diagnostiky jako vizuální hodnocení symptomů, mikroskopické či kultivační metody mají mnohdy limitované možnosti. Vnější příznaky (symptomy) se mohou překrývat, obzvláště v případě infekce, více patogeny současně. Příznaky mohou být značně variabilní nebo se nemusí vůbec vyskytovat. Při mikroskopickém vyšetření se hodnotí většinou morfologie konidií či spor, které se vyznačují také určitou mírou variability. Mikroskopická metoda klade obzvláště vysoké nároky na erudici, zkušenosti a taxonomické znalosti fytopatologa. Kultivační techniky zase mohou zvoleným živným médii preferovat některé druhy patogenů, kterým dané médium lépe vyhovuje, a to může být příčina nepřesné diagnózy, navíc je tato metoda časově náročná. S příchodem polymerázové řetězové reakce (PCR) (Mullis a Faloona, Methods Enzymol. 1987, „Specific synthesis of DNA in vitro via a polymerase-catalyzed chain reaction.“) je postupně využíváno molekulárních metod i v diagnostice patogenů. Výhodou je citlivost, přesnost s výsledkem analýzy v relativně krátkém čase. Diagnostiku může provádět personál bez znalostí taxonomie, který pouze zvládá běžnou techniku PCR.

V současné době je popsána celá řada primerů k detekci rostlinných patogenů. Jedná se o primery zaměřené na oblast ribozomální DNA (rDNA), a to zejména na ITS oblast (*Internal Transcribed Spacer*), či další konzervativní geny (např. β -tubulin, elongační faktor, atd.) nebo mitochondriální DNA (mtDNA) nebo geny uplatňující se při tvorbě mykotoxinů (např. *Tri3*, *Tri12*) nebo na anonymní unikátní úsek DNA odvozený např. z RAPD (*Random Amplified Polymorphic DNA*) techniky (v takovém případě hovoříme o tzv. SCAR (*Sequence-Characterized Amplified Region*) markerech).

V následujícím výčtu se zaměříme pouze na primery k diagnostice listových skvrnitostí ječmene a chorob pat stébel pšenice. Byly publikovány primery k diagnostice listových patogenů ječmene: *Ramularia collo-cygni* (Frei *et al.*, 2007, J. Phytopathology, „Direct-PCR detection and epidemiology of *Ramularia collo-cygni* associated with barely necrotic leaf spots.“), *Pyrenophora teres* (Leisova *et al.*, J. Phytopathology, 2005, „Genetic diversity of *Pyrenophora teres* isolates as detected by AFLP analysis.“), *Rhynchosporium secalis* (Lee *et al.*, Plant disease, 2001, „A PCR-based assay to detect *Rhynchosporium secalis* in barley seed.“).

V odborné vědecké literatuře byly publikovány primery pro diagnostiku chorob pat stébel u pšenice: *Oculimacula yallundae* a *O. acuformis* (Nicholson *et al.*, Plant Pathology, 1997, „Differentiation and quantification of the cereal eyespot fungi *T. yallundae* and *T. acuformis* using a PCR assay.“), *Rhizoctonia cerealis* (Nicholson a Parry, 1996, Plant Pathology „Development and use of a PCR assay to detect *Rhizoctonia cerealis*, the cause of sharp eyespot in wheat.“) *Microdochium nivale* (Nicholson *et al.*, Physiological and Molecular Plant Pathology, 1996, „Development of a PCR assay to identify and quantify *Microdochium nivale* var. *nivale* and *Microdochium nivale* var. *majus* in wheat.“), *Fusarium culmorum* a *Fusarium graminearum* (Nicholson *et al.*, Physiological and Molecular Plant Pathology, 1998, „Detection and quantification of *Fusarium culmorum* and *Fusarium graminearum* in cereals using PCR assays.“), *Fusarium poae* (Pany a Nicholson, Plant Pathology, 1996, „Development of PCR assays to detect *F. poae* in wheat.“), *Fusarium avenaceum* (Schilling *et al.*, Phytopathology, 1996, „PCR-based assays for species-specific detection of *Fusarium culmorum*, *F. graminearum* and *F. avenaceum*.“). Používané molekulární metody doposud neumožňovaly detekci patogena *Cochliobolus sativus*.

Podstata vynálezu

Výše uvedené nedostatky odstraňují primery pro detekci *Cochliobolus sativus*, podle vynálezu, jehož podstata spočívá v tom, že stanovení zejména v obilovinách, metodou PCR, se provádí primery o složení

COSA-F (SEQ ID: 1) TCAAGCTGACCAAATCACCTTC

COSA-R (SEQ ID: 2) CTTCTCACCAGCATCTGAATATATGA,

kteří umožní amplifikaci fragmentu patogena o velikosti 570 bp.

Podstatou vynálezu jsou dva nové oligonukleotidové primery k amplifikaci fragmentu DNA houbového patogena *Cochliobolus sativus*, přičemž tyto primery jsou odvozeny od genu *Brn1* (*gen reduktázy biosyntézy melaninu – reductase melanin biosynthesis gene*) (ABO11653) (Shimitzu *et al.*, J. Gen. Appl. Microbiol, 1998, „Phylogeny of *Bipolaris* inferred from nucleotide sequences of *Brn1*, a reductase gene involved in melanin biosynthesis.“).

Vynález se týká nových primerů, které umožní amplifikovat oblast genu *Brn1* u *Cochliobolus sativus*, bez současné amplifikace necílových sekvencí např. DNA hostitele nebo DNA jiných organismů přítomných v analyzovaném vzorku, takže se získají velmi přesné výsledky. Metoda PCR s primery SEQ ID: 1 a SEQ ID: 2 podle vynálezu umožní amplifikaci fragmentu patogena o velikosti 570 bp, který je snadno stanovitelný horizontální elektroforézou v agarozovém gelu po obarvení ethidiumbromidem.

Je nutné vysvětlit některé použité pojmy.

DNA

Molekula DNA je uzpůsobena pro uchovávání a kopírování genetické informace. DNA je tvořena dvěma řetězci. V každém řetězci se střídá pětiuhlíkový cukr deoxyribóza se zbytkem kyseliny fosforečné (tzv. fosfátem). Na deoxyribózu je po straně připojena heterocyklická sloučenina, tzv. báze. Na místě báze se mohou v DNA vyskytnout čtyři různé heterocyklické sloučeniny. Dvě z nich jsou odvozeny od struktury purinu – adenin (A) a guanin (G) – a dvě od pyrimidinu – thymin (T) a cytosin (C). Trojice deoxyribóza–zbytek kys. fosforečné–báze, tzv. nukleotid, tvoří základní jednotku (monomer) DNA. Protože na místě báze se mohou vyskytovat čtyři různé molekuly (A, T, G nebo C), existují i čtyři různé základní stavební jednotky (nukleotidy) – deoxyadenosinfosfát, deoxytymidinfosfát, deoxyguanosinfosfát a deoxycytidinfosfát. Genetická informace je v DNA zapsána v pořadí bází.

Primery

Jsou to krátké oligonukleotidy (cca 20 nukleotidů), které se párují s templátovou DNA na počátku a na konci amplifikovaného fragmentu, každý s jiným vláknem původní dvouřetězcové molekuly DNA. Tvoří počátek pro zahájení syntézy polynukleotidového řetězce. Unikátní kombinace nukleotidů primeru má za následek amplifikaci pouze požadované sekvence DNA.

Pojem cílová sekvence znamená úsek DNA, který má být amplifikován, detekován či jinak analyzován.

Amplifikace a PCR.

Amplifikace DNA je zvyšování počtu kopií molekul DNA v laboratorních podmínkách. PCR – (Polymerase chain reaction) polymerázová řetězová reakce je proces, při kterém dochází k amplifikaci DNA. Tento proces probíhá ve třech krocích: 1. teplotní denaturace DNA (dojde k uvolnění vodíkových můstků a dvoušroubovice dsDNA se rozpadne na dvě samostatná vlákna ssDNA), 2. annealing čili nasednutí primerů na templátovou ssDNA a 3. elongace čili prodlužování nově vznikajícího řetězce pomocí enzymu polymerázy. Odtud tedy název polymerázová řetězová reakce. Tento třístupňový proces se opakuje cca 30 až 40x. Běžné techniky molekulární biologie jsou vysvětleny v literatuře např. Sambrook *et al.*, 2001, Molecular cloning – a laboratory manual I., II., III.

Elektroforéza a agarozový gel.

Agarozový gel je želatině podobná hmota, tvořená prostorovou sítí vláken. Volný prostor mezi vlákny je vyplněn vodným roztokem, ve kterém se rozpouští nukleové kyseliny. Motivaci pro pohyb molekul nukleových kyselin zajistíme pomocí elektroforézy, tzn. gel umístíme do elektrického pole mezi dvě elektrody – kladně a záporně nabitou. Protože jsou nukleové kyseliny záporně nabitě, tak na ně v elektrickém poli působí síla, která je přitahuje ke kladně nabitě elektrodě. Dají se tedy do pohybu tímto směrem. Při průchodu gelem dochází mezi molekulami a sítí polymerů ke tření, které je větší u velkých molekul a menší u malých molekul, takže se molekuly třídí podle velikosti.

Primery podle vynálezu lze využít v molekulární biologii, rostlinolékařství, mykologii a fytopatologii, kde se zkoumají způsoby a reakční činidla k detekci houbového patogenu *Cochliobolus sativus* u obilovin, zejména u ječmene a pšenice, a dále k rozpoznání či odlišení rodu *Cochliobolus sativus* od jiných houbových druhů. Umožňují rychlou, senzitivní, vysoce specifickou detekci na úrovni nukleových kyselin (DNA) ve tkáni hostitele. Je proto cílem vynálezu rozšíření možnosti PCR detekce chorob ječmene a pšenice o primery podle vynálezu k diagnostice patogena *Cochliobolus sativus*, přičemž tento se vyskytuje jak na listech ječmene a je obtížně rozlišitelný od dalších listových skvrnitostí (zejména *R. collo-cygni* a *P. teres f. maculata*), tak na kořenech a patách stébel pšenice, kde mohou být příznaky zaměněny s celou řadou patogenů z tohoto

komplexního onemocnění (*Oculimacula* spp., *Rhizoctonia*, *Fusarium* spp., atd.). Původci vynálezu byla úspěšně prokázána specifická reakce primerů podle vynálezu s DNA patogena a v příložených tabulkách jsou shrnuty výsledky jejich měření.

- 5 Následující příklady provedení primery podle vynálezu pouze dokládají, aniž by ho jakkoliv omezovaly.

Příklady provedení vynálezu

10

Příklad 1

15 Výsledky všech měření jsou souhrnně uvedeny v příložených Tabulkách 1 až 8 a na obrázcích Obr. 1 až 4.

20 Potvrzení spolehlivosti primerů COSA-F (SEQ ID:1) a COSA-R (SEQ ID: 2) na souboru 70-ti izolátů *Cochliobolus sativus* nasbíraných z porostů jarních ječmenů na území ČR v roce 2007, dále využití primerů COSA-F (SEQ ID:1) a COSA-R (SEQ ID: 2) k rozpoznání druhu *Cochliobolus sativus* ze vzorků houbových kultur získaných sběrem v terénu:

25 V roce 2007 bylo na území České republiky z listů ječmene jarního nasbíráno 70 izolátů *Cochliobolus sativus* (Tabulka 1). Z těchto sběrů byly na Petriho miskách na živném médiu (4 % Potato Dextrose Agar) vypěstovány monosporické izoláty. Mycelium bylo špachtlí sejmuto a byla z něj izolována DNA. Mycelium bylo drceno v porcelánových třecích miskách za pomoci tekutého dusíku. Dále bylo k izolaci DNA využito kitu DNeasy Plant Mini Kit (Qiagene). PCR proběhla v uvedené reakční směsi za níže uvedených reakčních podmínek (Tabulky 2 a 3)

Závěr měření

30

Všechny izoláty *C. sativus* (70 ks) získané sběrem na území ČR v roce 2007 vykazovaly po PCR s primery COSA-F (SEQ ID:1) a COSA-R (SEQ ID: 2) podle vynálezu za uvedených reakčních podmínek pozitivní odezvu (Obr. 1).

35

Příklad 2

40 Určení *C. sativus* v souboru dalších druhů hub, a to jednak blízce příbuzných druhů a zejména pak okruhu patogenů napadající listy ječmene a paty stébel a kořeny pšenice.

40

45 Pro potvrzení specifity primerů COSA-F (SEQ ID:1) a COSA-R (SEQ ID: 2) podle vynálezu byla provedena molekulární analýza u celé řady druhů hub jednak příbuzných *C. sativus* a jednak potenciálně se vyskytujících na ječmeni a pšenici (Tabulka 4). Houbové kultury byly získány terénním sběrem a kultivací na Petriho miskách a dále z Českých ale i zahraničních sbírek mikroorganismů (Slovensko, Holandsko) (viz Tabulka 4). PCR proběhla v uvedené reakční směsi za uvedených reakčních podmínek (Tabulka 2 a 3). Reakce byla provedena třikrát (pokždé jiným laborantem [P/R/J] – Pavel, Renata, Jiřinka)

Závěr měření

50

Vzorky obsahující DNA *C. sativus* se po PCR s primery COSA-F (SEQ ID:1) a COSA-R (SEQ ID: 2) podle vynálezu za uvedených reakčních podmínek vyznačovaly pozitivní odezvou, ostatní testované druhy zůstaly bez odezvy (Obr. 2).

55

Příklad 3

5 Detekce patogena v listech ječmene infikovaných houbovým patogenem *C. sativus* ve srovnání s neinfikovanými a detekce *C. sativus* na patách stébel pšenice u rostlin infikovaných ve srovnání s neinfikovanými.

10 Ve skleníku byl založen experiment s 6–ti odrůdami ječmene a 6–ti odrůdami pšenice (Tabulka 5). U každé odrůdy byla polovina rostlin prostorově izolována a infikována houbovým patogenem *C. sativus*. 14 dní po infekci byly odebrány rostliny jak infikované, tak bez infekce. Listy ječmene a paty stébel (ve dvou případech i kořeny) pšenice byly podrobeny molekulární analýze za použití primerů COSA–F (SEQ ID:1) a COSA–R (SEQ ID: 2) podle vynálezu. Rostlinný materiál byl drcen v porcelánových třecích miskách za použití tekutého dusíku. Poté byla izolována celková DNA pomocí kitu DNeasy Plant Mini Kit (Qiagene). PCR proběhla v následující reakční směsi za uvedených reakčních podmínek (Tabulka 6 a 3). Reakce byla provedena třikrát

15 (pokaždé jiným laborantem [P/R/J] – Pavel, Renata, Jiřinka).

Závěr měření

20 Vzorky rostlin, infikovaných patogenem *C. sativus* vykazovaly po PCR s primery COSA–F (SEQ ID:1) a COSA–R (SEQ ID: 2) podle vynálezu za uvedených reakčních podmínek pozitivní odezvu, zatímco rostliny, které nebyly tímto patogenem infikovány, vykazovaly odezvu negativní (Obr. 3).

25 Příklad 4

Testování primerů podle vynálezu v ředící řadě DNA ve vzorku:

30 Analýze DNA s primery COSA–F (SEQ ID:1) a COSA–R (SEQ ID: 2) podle vynálezu bylo podrobena odstupňované množství DNA *Cochliobolus sativus*: 1 ng, 0,1 ng, 0,01 ng, 0,001 ng a 0,0001 ng (Tabulka 7). Reakce byla provedena třikrát (pokaždé jiným laborantem [P/R/J] – Pavel, Renata, Jiřinka). PCR proběhla v následující reakční směsi za uvedených reakčních podmínek (Tabulka 8 a 3).

35 Závěr měření

40 Detekční minimum PCR s primery COSA–F (SEQ ID:1) a COSA–R (SEQ ID: 2) podle vynálezu za uvedených reakčních podmínek se pohybovalo na hranici 0,001 ng DNA patogena ve vzorku (Obr. 4).

Průmyslová využitelnost

45 Nové primery mají využití jednak v rostlinolékařství při diagnostice patogena *Cochliobolus sativus*, což umožní cílenou volbu účinné ochrany zejména obilovin a jednak ve šlechtitelských procesech při hodnocení genových zdrojů při selekci a v molekulární biologii.

Tabulka 1

Seznam izolátů *C. sativus* získaných z listů ječmene na území ČR v roce 2007 (pozitivní výsledek reakce vyznačující se viditelným proužkem na gelu je označen znaménkem + (plus), negativní odezva znaménkem – (minus))

5

| Číslo | Lokalita sběru | Označení | PCR |
|-------|----------------|----------|-----|
| 1 | Olomouc | 1,1 Ol | + |
| 2 | Olomouc | 1,2 Ol | + |
| 3 | Olomouc | 1,3 Ol | + |
| 4 | Olomouc | 1,4 Ol | + |
| 5 | Olomouc | 2,1 Ol | + |
| 6 | Olomouc | 2,2 Ol | + |
| 7 | Olomouc | 3,4 Ol | + |
| 8 | Olomouc | 4,2 Ol | + |
| 9 | Olomouc | 5,1 Ol | + |
| 10 | Olomouc | 6,3 Ol | + |
| 11 | Banovce | 4,3 Bc | + |
| 12 | Banovce | 4,4 Bc | + |
| 13 | Banovce | 5,2 Bc | + |
| 14 | Banovce | 5,4 Bc | + |
| 15 | Banovce | 6,2 Bc | + |
| 16 | Banovce | 7,4 Bc | + |
| 17 | Banovce | 8,2 Bc | + |
| 18 | Banovce | 8,4 Bc | + |
| 19 | Banovce | 9,2 Bc | + |
| 20 | Banovce | 9,4 Bc | + |
| 21 | Plzeň | 1,1 Pl | + |
| 22 | Plzeň | 1,2 Pl | + |
| 23 | Plzeň | 1,5 Pl | + |
| 24 | Plzeň | 1,6 Pl | + |
| 25 | Plzeň | 2,2 Pl | + |
| 26 | Plzeň | 2,3 Pl | + |
| 27 | Plzeň | 2,4 Pl | + |

| | | | |
|----|---------|--------|---|
| 28 | Plzeň | 2,6 Pl | + |
| 29 | Plzeň | 3,2 Pl | + |
| 30 | Plzeň | 3,6 Pl | + |
| 31 | Kojetín | 1,2 Kj | + |
| 32 | Kojetín | 1,3 Kj | + |
| 33 | Kojetín | 1,4 Kj | + |
| 34 | Kojetín | 2,1 Kj | + |
| 35 | Kojetín | 1,1 Kj | + |
| 36 | Kojetín | 1,5 Kj | + |
| 37 | Kojetín | 1,6 Kj | + |
| 38 | Kojetín | 2,2 Kj | + |
| 39 | Kojetín | 2,3 Kj | + |
| 40 | Kojetín | 2,4 Kj | + |
| 41 | Hrabice | 1,1 Hr | + |
| 42 | Hrabice | 1,2 Hr | + |
| 43 | Hrabice | 2,1 Hr | + |
| 44 | Hrabice | 2,2 Hr | + |
| 45 | Hrabice | 3,1 Hr | + |
| 46 | Hrabice | 3,2 Hr | + |
| 47 | Hrabice | 4,1 Hr | + |
| 48 | Hrabice | 4,3 Hr | + |
| 49 | Hrabice | 5,2 Hr | + |
| 50 | Hrabice | 5,4 Hr | + |
| 51 | Bánov | 1,1 Ba | + |
| 52 | Bánov | 1,2 Ba | + |
| 53 | Bánov | 1,4 Ba | + |
| 54 | Bánov | 1,5 Ba | + |
| 55 | Bánov | 2,1 Ba | + |

| | | | |
|----|--------|---------|---|
| 56 | Bánov | 2,2 Ba | + |
| 57 | Bánov | 2,3 Ba | + |
| 58 | Bánov | 3,1 Ba | + |
| 59 | Bánov | 3,6 Ba | + |
| 60 | Bánov | 4,1 Ba | + |
| 61 | Nováky | 6,3 Nv | + |
| 62 | Nováky | 17,1 Nv | + |
| 63 | Nováky | 18,2 Nv | + |

| | | | |
|----|--------|---------|---|
| 64 | Nováky | 19,1 Nv | + |
| 65 | Nováky | 20,2 Nv | + |
| 66 | Nováky | 21,1 Nv | + |
| 67 | Nováky | 22,1 Nv | + |
| 68 | Nováky | 23,2 Nv | + |
| 69 | Nováky | 24,1 Nv | + |
| 70 | Nováky | 24,2 Nv | + |

Tabulka 2

5

Reakční směs v celkovém objemu 20 μ l

| Chemikálie | Konečná koncentrace | Objem |
|--|---------------------|--------------|
| voda | - | 12,6 μ l |
| 10 mM dNTP | 0,2 mM | 0,4 μ l |
| 25 mM MgCl ₂ | 2,5 mM | 2,0 μ l |
| Pufr | | |
| 750 mM Tris-HCl | 75 mM | 2,0 μ l |
| 200 mM (NH ₄) ₂ SO ₄ | 20 mM | |
| 10 μ M Primer SEQ ID:1 | 0,2 μ M | 0,4 μ l |
| 10 μ M Primer SEQ ID: 2 | 0,2 μ M | 0,4 μ l |
| 5 U/1 μ L Taq Polymeráza | 1,0 U | 0,2 μ l |
| DNA vzorku | 1-5 ng | 2,0 μ l |
| Celkem | - | 20 μ l |

10

Tabulka 3

Reakční podmínky Touchdown PCR

| Kroky reakce | Teplota [°C] | Čas [s] | Počet cyklů |
|--------------------|--------------|---------|-------------|
| úvodní denaturace | 95 | 5 min | 1 |
| denaturace | 95 | 30 | 5 |
| annealing | 64 | 20 | |
| elongace | 72 | 45 | |
| denaturace | 95 | 30 | 5 |
| annealing | 66 | 20 | |
| elongace | 72 | 45 | |
| denaturace | 95 | 30 | 30 |
| annealing | 62 | 20 | |
| elongace | 72 | 45 | |
| závěrečná elongace | 72 | 5 min | 1 |
| uchování | 10 | - | 1 |

Tabulka 4

5

Seznam druhů hub podrobených analýze s primery COSA-F (SEQ ID:1) a COSA-R (SEQ ID: 2) (pozitivní výsledek reakce vyznačující se viditelným proužkem na gelu je označen znaménkem + (plus), negativní odezva znaménkem - (minus)).

| Č. | Druh | Zdroj | Kód | Hostitel | Původ | PCR |
|----|-------------------|-------|----------------|--------------------------|-----------------|-------|
| 1 | <i>C. sativus</i> | VURVP | BPSK05 | <i>Hordeum vulgare</i> | Slovak Republic | +/+/+ |
| 2 | <i>C. sativus</i> | CPPF | CPPF 70 | <i>Triticum aestivum</i> | Czech Republic | +/+/+ |
| 3 | <i>C. sativus</i> | ZVU | CS-Banovce 4,3 | <i>Hordeum vulgare</i> | Czech Republic | +/+/+ |
| 4 | <i>C. sativus</i> | ZVU | CS-Plzen 1,1 | <i>Hordeum vulgare</i> | Czech Republic | +/+/+ |
| 5 | <i>C. sativus</i> | ZVU | CS-Kojetin 1,2 | <i>Hordeum vulgare</i> | Czech | +/+/+ |

10

| | | | | | Republic | |
|----|---|------|----------------|--------------------------|----------------|------|
| 6 | <i>C. sativus</i> | ZVU | CS-Hrabice 1,1 | <i>Hordeum vulgare</i> | Czech Republic | +!/+ |
| 7 | <i>C. sativus</i> | ZVU | CS-Banov 1,1 | <i>Hordeum vulgare</i> | Czech Republic | +!/+ |
| 8 | <i>Drechslera graminea</i> | CBS | CBS 100866 | <i>Hordeum vulgare</i> | Austria | -!/- |
| 9 | <i>Pyrenophora. teres f. teres</i> | ZVU | PTT-KM094 | <i>Hordeum vulgare</i> | Czech Republic | -!/- |
| 10 | <i>P. teres f. maculata</i> | ZVU | PTM-KM096 | <i>Hordeum vulgare</i> | Czech Republic | -!/- |
| 11 | <i>Rhynchosporium. secalis</i> | ZVU | RS-R95/2 | <i>Hordeum vulgare</i> | Czech Republic | -!/- |
| 12 | <i>Blumeria graminis</i> | ZVU | Mix of spores | <i>Hordeum vulgare</i> | Czech Republic | -!/- |
| 13 | <i>Ramularia collo-cygni</i> | CBS | CBS 101180 | <i>Hordeum vulgare</i> | Austria | -!/- |
| 14 | <i>Oculimacula yallundae</i> | ZVU | OY-KM085 | <i>Triticum aestivum</i> | Czech Republic | -!/- |
| 15 | <i>Oculimacula acuformis</i> | ZVU | OA-KM086 | <i>Triticum aestivum</i> | Czech Republic | -!/- |
| 16 | <i>Rhizoctonia cerealis</i> | CBS | CBS 236.77 | <i>Secale cereale</i> | Netherlands | -!/- |
| 17 | <i>Gaeumannomyces graminis var. tritici</i> | CCM | F-575 | <i>Triticum aestivum</i> | Czech Republic | -!/- |
| 18 | <i>Microdochium nivale var. nivale</i> | CCM | F-429 | Není známo | Není známo | -!/- |
| 19 | <i>Microdochium nivale var. majus</i> | CBS | CBS 106.90 | <i>Triticum aestivum</i> | USA | -!/- |
| 20 | <i>Fusarium graminearum</i> | ZVU | FG-KM044 | <i>Triticum aestivum</i> | Czech Republic | -!/- |
| 21 | <i>F. culmorum</i> | ZVU | FC-KM045 | <i>Triticum aestivum</i> | Czech Republic | -!/- |
| 22 | <i>F. avenaceum</i> | CCF | FA-KM046 | <i>Triticum aestivum</i> | Czech Republic | -!/- |
| 23 | <i>F. poae</i> | ZVU | FP-KM033 | <i>Triticum aestivum</i> | Czech Republic | -!/- |
| 24 | <i>F. pseudograminearum</i> | CBS | CBS 109955 | <i>Hordeum vulgare</i> | Australia | -!/- |
| 25 | <i>F. sporotrichoides</i> | CCM | CCM 8314 | Není známo | Není známo | -!/- |
| 26 | <i>Pyrenophora tritici-</i> | CPPF | CPPF 72 | <i>Triticum aestivum</i> | Czech | -!/- |

| | | | | | | |
|----|----------------------|-----|---------------------|----------------------|----------------|-----|
| | repentis | | | | Republic | |
| 27 | Tilletia tritici | ZVU | TCA-KM110 | Triticum aestivum | Czech Republic | -/- |
| 28 | T. controversa | ZVU | TCO-KM121 | Triticum aestivum | Czech Republic | -/- |
| 29 | Septoria tritici | ZVU | ST-KM Banq. 3/06 | Triticum aestivum | Czech Republic | -/- |
| 30 | S. nodorum | ZVU | SN-KM 076 | Triticum aestivum | Czech Republic | -/- |
| 31 | Bipolaris maydis | CBS | CBS 574.73 | Zea mays | USA | -/- |
| 32 | B. zeae | CBS | CBS 112776 | Panicum virgatum | USA | -/- |
| 33 | B. panici-miliacei | CBS | CBS 241.77 | Brachiaria foliosa | Australia | -/- |
| 34 | B. victoriae | CBS | CBS 329.64 | Avena sativa | USA | -/- |
| 35 | Drechslera spicifera | CCF | CCF 3008 | Origanum majorana | Czech Republic | -/- |

Vysvětlivky:

CBS – Centraalbureau voor Schimmelcultures, The Netherlands

CCF – Sběrka kultur hub katedry botaniky, Univerzita Karlova, Přírodovědecká fakulta, CZ

5 CPPF – Sběrka fytopatogenních hub, VÚRV Praha Ruzyně, CZ

ZVU – Zemědělský výzkumný ústav Kroměříž, CZ

CCM – Česká sbírka mikroorganismů Masarykova Univerzita, Přírodovědecká fakulta, CZ

VURVP – Výzkumný ústav rostlinnej výroby Piešťany, SK

10

Tabulka 5

15 Seznam zdravých a infikovaných (*C. sativus*) odrůd ječmene a pšenice podrobených analýze s primery COSA-F (SEQ ID:1) a COSA-R (SEQ ID: 2) podle vynálezu (pozitivní výsledek reakce vyznačující se viditelným proužkem na gelu je označen znaménkem + (plus), negativní odezva znaménkem – (minus))

| Číslo | Rostlina | Odrůda | Analyzovaná část rostliny | Infekce <i>C. sativus</i> | PCR |
|-------|----------|------------|---------------------------|---------------------------|-------|
| 1 | Ječmen | Conrad | List | Ano | +/+/+ |
| 2 | Ječmen | Ragusa 415 | List | Ano | +/+/+ |

| | | | | | |
|----|---------|----------------|-------------|-----|-------|
| 3 | Ječmen | Proust | List | Ano | +/+/+ |
| 4 | Ječmen | Pribina | List | Ano | +/+/+ |
| 5 | Ječmen | Cebada Capa | List | Ano | +/+/+ |
| 6 | Ječmen | Viridie | List | Ano | +/+/+ |
| 7 | Ječmen | Conrad | List | Ne | -/- |
| 8 | Ječmen | Ragusa 415 | List | Ne | -/- |
| 9 | Ječmen | Proust | List | Ne | -/- |
| 10 | Ječmen | Pribina | List | Ne | -/- |
| 11 | Ječmen | Cebada Capa | List | Ne | -/- |
| 12 | Ječmen | Viridie | List | Ne | -/- |
| 13 | Pšenice | Šárka | Báze stébla | Ano | +/+/+ |
| 14 | Pšenice | Šárka | Kořen | Ano | +/+/+ |
| 15 | Pšenice | Banquet | Báze stébla | Ano | +/+/+ |
| 16 | Pšenice | Banquet | Kořen | Ano | +/+/+ |
| 17 | Pšenice | Cubus | Báze stébla | Ano | +/+/+ |
| 18 | Pšenice | Batis | Báze stébla | Ano | +/+/+ |
| 19 | Pšenice | Simila | Báze stébla | Ano | +/+/+ |
| 20 | Pšenice | Acteur | Báze stébla | Ano | +/+/+ |
| 21 | Pšenice | Šárka | Báze stébla | Ne | -/- |
| 22 | Pšenice | Šárka | Kořen | Ne | -/- |
| 23 | Pšenice | Banquet | Báze stébla | Ne | -/- |
| 24 | Pšenice | Banquet | Kořen | Ne | -/- |
| 25 | Pšenice | Cubus | Báze stébla | Ne | -/- |
| 26 | Pšenice | Batis | Báze stébla | Ne | -/- |
| 27 | Pšenice | Simila | Báze stébla | Ne | -/- |
| 28 | Pšenice | Acteur | Báze stébla | Ne | -/- |

Tabulka 6

Reakční směs v celkovém objemu 20 μ l

| Chemikálie | Konečná koncentrace | Objem |
|--|---------------------|--------------|
| voda | - | 12,6 μ l |
| 10 mM dNTP | 0,2 mM | 0,4 μ l |
| 25 mM MgCl ₂ | 2,5 mM | 2,0 μ l |
| Pufr | | |
| 750 mM Tris-HCl | 75 mM | 2,0 μ l |
| 200 mM (NH ₄) ₂ SO ₄ | 20 mM | |
| 10 μ M Primer SEQ ID:1 | 0,2 μ M | 0,4 μ l |
| 10 μ M Primer SEQ ID: 2 | 0,2 μ M | 0,4 μ l |
| 5U/1 μ L Taq Polymeráza | 1,0 U | 0,2 μ l |
| DNA vyšetřovaného vzorku | 20 až 30 ng | 2,0 μ l |
| Celkem | - | 20 μ l |

5

Tabulka 7

- 10 Odstupňované množství DNA *C. sativus* ve vzorku. (pozitivní výsledek reakce vyznačující se viditelným proužkem na gelu je označen znaménkem + (plus), negativní odezva znaménkem - (minus), velmi slabá pozitivní odezva znaménkem \pm (plus-minus))

| vzorek | Množství DNA <i>Cochliobolus sativus</i> v reakční směsi (ng) | | | | |
|-----------------------------------|---|-----|------|------------|--------|
| | 1,0 | 0,1 | 0,01 | 0,001 | 0,0001 |
| <i>C. sativus</i> (68; 23,2 Nv) * | +/+ | +/+ | +/+ | - \pm /+ | -/- |
| <i>C. sativus</i> (69; 24,1 Nv) * | +/+ | +/+ | +/+ | +/- \pm | -/- |

15

Vysvětlivky: * viz Tab. 1

Tabulka 8

Reakční směs s celkovým objemu 20 μ l

5

| Chemikálie | Konečná koncentrace | Objem |
|--|---------------------|--------------|
| voda | - | 12,6 μ l |
| 10 mM dNTP | 0,2 mM | 0,4 μ l |
| 25 mM MgCl ₂ | 2,5 mM | 2,0 μ l |
| Pufr | | |
| 750 mM Tris-HCl | 75 mM | 2,0 μ l |
| 200 mM (NH ₄) ₂ SO ₄ | 20 mM | |
| 10 μ M Primer SEQ ID:1 | 0,2 μ M | 0,4 μ l |
| 10 μ M Primer SEQ ID: 2 | 0,2 μ M | 0,4 μ l |
| 5 U/1 μ L Taq Polymeráza | 1,0 U | 0,2 μ l |
| DNA vyšetřovaného vzorku | viz Tabulka 7 | 2,0 μ l |
| Celkem | - | 20 μ l |

10

PATENTOVÉ NÁROKY

1. Primery pro detekci *Cochliobolus sativus*, zejména v obilovinách, metodou PCR, o složení

15

COSA-F (SEQ ID: 1) TCAAGCTGACCAAATCACCTTC

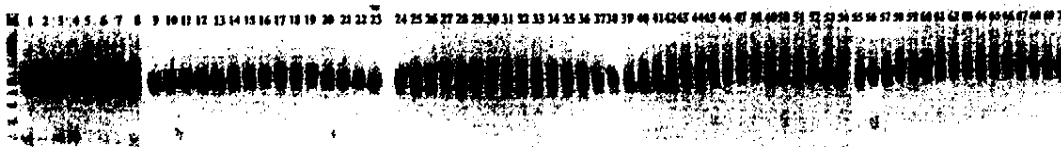
COSA-R (SEQ ID: 2) CTTCTCACCAGCATCTGAATATATGA,

které umožní amplifikaci fragmentu patogena o velikosti 570 bp.

20

2 výkresy

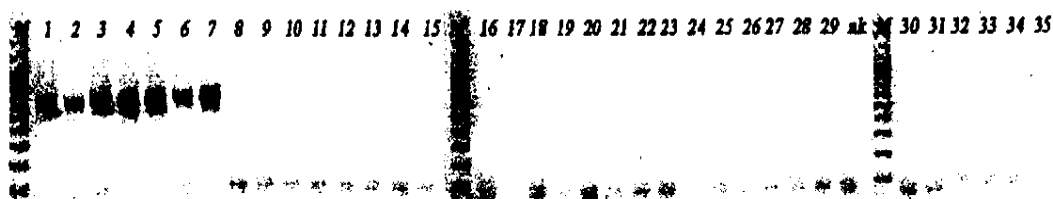
Obr. 1



Výsledek analýzy 70-ti izolátů *C. sativus* nasbíraných z porostů jarních ječmenů na území ČR v roce 2007 (viz Tabulka 1) s primery COSA-F (SEQ ID:1) a COSA-R (SEQ ID:2)

Vysvětlivka: M- Ladder 100bp, 1 až 70 DNA *C. sativus* (viz Tabulka 1)

Obr. 2



Výsledek analýzy vzorků vybraných druhů hub napadající ječmen a pšenici (viz Tabulka 4) s primery COSA-F (SEQ ID:1) a COSA-R (SEQ ID: 2) podle vynálezu.

Vysvětlivka:

M - Ladder 100bp, 1. až 35. vzorek viz Tabulka 4, nk – negativní kontrola (voda)

Obr. 3

Výsledek analýzy vzorků infikovaných a neinfikovaných rostlin ječmene a pšenice patogenem *C. sativus* (viz Tab. 7) s primery COSA-F (SEQ ID:1) a COSA-R (SEQ ID: 2) podle vynálezu.



Vysvětlivka:

M - Ladder 100bp, 1. 28. vzorek viz. Tabulka 5, nk – negativní kontrola (voda), Cs – pozitivní kontrola (DNA *C. sativus*)

Obr. 4

Výsledek testování primerů v ředící řadě DNA ve vzorku s primery COSA-F (SEQ ID:1) a COSA-R (SEQ ID: 2) podle vynálezu



Konec dokumentu
