

UŽITNÝ VZOR

(11) Číslo dokumentu:

22600

(19)
ČESKÁ
REPUBLIKA



ÚŘAD
PRŮMYSLOVÉHO
VLASTNICTVÍ

(21) Číslo přihlášky: **2011 - 24541**
(22) Přihlášeno: **29.06.2011**
(47) Zapsáno: **15.08.2011**

(13) Druh dokumentu: **U1**

(51) Int. Cl.:
C12Q 1/68 (2006.01)
C12N 15/11 (2006.01)

(73) Majitel:

Centrum výskumu rastlinnej výroby Piešťany, Piešťany, SK
Agrotest fyto, s. r. o., Kroměříž, CZ

(72) Původce:

Gubiš Jozef Ing. Ph.D., Bzince pod Javorinou, SK
Hudcovicová Martina Mgr. Ph.D., Vaďovce, SK
Gubišová Marcela Mgr., Bzince pod Javorinou, SK
Žofajová Alžběta Ing. Ph.D., Piešťany, SK
Havrlentová Michaela RNDr. Ph.D., Krakovany, SK
Pastirčák Martin Mgr. Ph.D., Nitra, SK
Mihálik Daniel Mgr. Ph.D., Čachtice, SK
Bojnanská Katarína Ing., Piešťany, SK
Kraic Ján Doc. RNDr. Ph.D., Piešťany, SK
Matušinsky Pavel Mgr. Ph.D., Kroměříž, CZ
Tvarůžek Ludvík Dr. Ing., Kroměříž, CZ

(74) Zástupce:

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

(54) Název užitného vzoru:

Primery pro detekci Drechslera tritici-repentis v pšenici

CZ 22600 U1

Primery pro detekci *Drechslera tritici-repentis* v pšenici

Oblast techniky

Řešení se týká nových specifických primerů pro detekci houbového patogena *Drechslera tritici-repentis* v pšenici, což má význam v rostlinolékařství a molekulární biologii.

5 Dosavadní stav techniky

- Patogen *Drechslera tritici-repentis* (Died.) Shoem. (Shoemaker 1962, Canadian Journal of Botany „*Drechslera Ito.*“) (telemorfa *Pyrenophora tritici-repentis* (Died.) Drech.) (dále v textu jen DTR) způsobuje na pšenici chorobu s názvem „světle hnědá skvrnitost pšenice“ anglicky „tan spot“. Tato choroba je v celosvětovém měřítku jedním z významných patogenů pšenice (Tekauz *et al.* 2004, Can. Plant Dis. Surv. „Leaf spot diseases of winter wheat in Manitoba in 2003.“; Duveiller *et al.* 2005, Phytopathology „Epidemiology of foliar blights (spot blotch and tan spot) of wheat in the plains bordering the Himalayas.“), přičemž může způsobovat 3 % až 50 % ztrát na výnosu v závislosti dle citlivosti odrůdy, podmínek prostředí a virulence populace patogena (Rees *et al.* 1988, Aust. J. Agric. Res. „Susceptibility of Australian wheats to *Pyrenophora tritici-repentis.*“). *Drechslera tritici-repentis* redukuje hmotnost zrn, počet zrn v klase (Schilder & Bergstrom 1990, Phytopathology „Variation in virulence within the population of *Pyrenophora tritici-repentis* in New York.“), celkovou biomasu porostu (Kremer & Hoffmann 1992, Z Pflanzenkrankh Pflanzenschutz „Effect of *Drechslera tritici-repentis* as the cause of wheat yellow leaf spot disease on kernel yield and dry matter production“) a kvalitu zrna (Fernandez *et al.* 1994, Plant Disease „Response of durum wheat kernels and leaves at different growth stages to *Pyrenophora tritici-repentis.*“). Nejvýznamnější je tato choroba v USA, Kanadě (Gilbert & Woods 2001, Can. J. Plant Sci. „Leaf spot diseases of spring wheat in southern Manitoba farm fields under conventional and conservation tillage.“), ale v několika posledních letech se stává aktuálním problémem i v Evropských zemích.
- Životní cyklus *Drechslera tritici-repentis* zahrnuje pohlavní stádium, při kterém se tvoří v plodnicích vřeska s askosporami, a nepohlavní stádium, přičemž v jeho průběhu patogen vytváří konidie. Plodnice vznikají v období zimních měsíců na napadnutých rostlinných zbytcích. Askospory jsou zdrojem primární infekce, jejíž nástup se obvykle očekává od poloviny března do začátku května. Konidie vznikají na primárně infikovaných listech, způsobují sekundární infekci a mohou být přenášeny větrem na velké vzdálenosti (Šárová & Hanzalová 2004, Nové poznatky z genetiky a šlechtění poľnohospodárskych rastlín: Zborník z 11. odborného seminára 24.-25. november 2004 „*Pyrenophora tritici-repentis* (Died.) Drechs. na pšenici, její význam v ČR a perspektivy šlechtění rezistentních odrůd.“).
- Lamari a Bernier (1989, Can. J. Plant Pathol. „Virulence of isolates of *Pyrenophora tritici-repentis* on 11 wheat cultivars and cytology of the differential host reactions.“) popsali existenci fyziologické variability patogena a klasifikovali izoláty do 4 patotypů na základě jejich schopnosti indukovat nekrózy a chlorózy v určitých liniích pšenice. Později bylo popsáno 6 ras na základě jejich virulence k 3 diferencním genotypům pšenice: odrůda Glenglea - nekróza, linie 6B365 - chloróza způsobená rasou 3, linie 6B662 - chloróza způsobená rasou 5 (Gamba & Lamari 1998, Can. J. Plant Pathol. „Mendelian inheritance of resistance to tan spot (*Pyrenophora tritici-repentis*) in selected genotypes of durum wheat (*Triticum turgidum*)“; Strelkov *et al.* 2002, Can. J. Plant Pathol. „Comparative virulence of chlorosis-inducing races of *Pyrenophora tritici-repentis.*“). Lamari *et al.* (2003, Phytopathology „The identification of two new races of *Pyrenophora tritici-repentis* from the host center of diversity confirms a one-to-one relationship in tan spot of wheat.“) popsali další 2 rasy - rasa 7 a 8. Jednotlivé rasy jsou schopny produkovat různé hostitelsky-specifické toxiny, zatím byly identifikovány 4 toxiny - Ptr Tox A, B, C, D. Výsledky získané virulenční analýzou poukazují na to, že některé rasy nesou více než jeden hostitelsko-specifický toxin, např. rasa 1 nese gen pro Ptr Tox A a Ptr Tox B, rasa 6 Ptr Tox B a Ptr Tox C (Lamari *et al.* 2003, Phytopathology „The identification of two new races of

Pyrenophora tritici-repentis from the host center of diversity confirms a one-to-one relationship in tan spot of wheat.“). Dlouho se vědci domnívali, že v jedné rase nemohou být současně Tox A lokus a Tox B lokus (Ballance *et al.* 1996, Mol. Plant Pathol. „Cloning, expression and occurrence of a gene encoding Ptr-necrosis toxin from *Pyrenophora tritici-repentis*.“; Strelkov 2002, 5 Can. J. Plant Pathol. „Comparative virulence of chlorosis-inducing races of *Pyrenophora tritici-repentis*.“), ale Lamari *et al.* (2003, Phytopathology „The identification of two new races of *Pyrenophora tritici-repentis* from the host center of diversity confirms a one-to-one relationship in tan spot of wheat.“) u nově objevených rasách 7 a 8 popsali společnou přítomnost lokusů pro oba tyto toxiny. Patogen *Drechslera tritici-repentis* je na základě vizuálních symptomů obtížně 10 odlišitelný od dalšího významného patogena pšenice *Stagonospora nodorum*. Jelikož je patogen přenosný osivem, má správná a rychlá diagnostika význam při produkci pšenice jako základní suroviny na výrobu bezpečných a kvalitních potravin.

Pro ochranu pěstitelských porostů a kontrolu bezpečnosti primárních potravinových zdrojů je důležitá včasná, rychlá a přesná diagnostika. V tomto smyslu je potřebná již během pěstování 15 plodin rychlá a spolehlivá detekce kontaminací patogenních mikroorganismů, která umožní přesný, včasný a efektivní ochranný zásah a tak zabrání expanzi patogena v rostlině. Klasické diagnostické kultivační techniky jsou náročné na čas a erudici fytopatologa přičemž identita houby může být potvrzena až po delším čase. Z tohoto důvodu se k detekci patogenů krom klasických fytopatologických testů začaly využívat i PCR (polymerázová řetězová reakce) techniky 20 (Mullis a Floyda 1987, Methods Enzymol „Specific synthesis of DNA *in vitro* via a polymerase-catalyzed chain reaction.“). Senzitivní, přesné a relativně rychlé diagnostické testy patogena jsou založeny na principu detekce přítomnosti DNA patogena v hostiteli. Princip diagnostiky rostlinných patogenů pomocí standardní PCR je popsán v literatuře např. (Henson & French 1993, Annu. Rev. Phytopathol. „The polymerase chain reaction and plant disease diagnostics.“ nebo 25 Ward *et al.* 2004, Ann. App. Biol., Plant pathogen diagnostics: immunological and nucleic acid-based approaches.“ anebo Atkins & Clark 2004, J. App. Genet. „Fungal molecular diagnostics: a mini review.“ nebo Lévesque 2001, Can. J. Plant Pathol. „Molecular methods for detection of plant pathogens - What is the future?“). Využití PCR metod ve fytopatologii umožňuje rychlou a přesnou diagnostiku patogenů v různých vývojových stádiích rostliny. Cílovým místem na DNA patogena, které se využívá při detekci, je hlavně ribozomální DNA. Je přítomná v každém orga- 30 nismu ve více kopiích, což umožňuje velmi citlivou detekci. Druhým nejvyužívanějším úsekem DNA je β -tubulinový gen (McCartney *et al.* 2003, Pest Manag. Sci. „Molecular diagnostics for fungal plant pathogens.“). PCR metody jsou velmi citlivé a specifické, rychlé a interpretace výsledků je jednoznačná (Walcott 2003, HortTechnology „Detection of seedborne pathogens.“).

PCR metody již byly použity při diagnostice různých patogenů na různých plodinách. U ječmene 35 byla tato metoda využita při diagnostice listových patogenů *Pyrenophora teres* (Leisova *et al.* 2005, J. Phytopathology „Genetic diversity of *Pyrenophora teres* isolates as detected by AFLP analysis.“), *Rhynchosporium secalis* (Lee *et al.* 2001, Plant disease „A PCR-based assay to detect *Rhynchosporium secalis* in barley seed.“), *Ustilago hordei* (Willits & Sherwood 1999, Phy- 40 topathology „Polymerase chain reaction detection of *Ustilago hordei* in leaves of susceptible and resistant barley varieties.“). Byly také vyvinuty a publikovány dvě metody detekce *Ramularia collo-cygni*, a to za použití „nested“ PCR a standardní PCR (Havis *et al.* 2006, FEMS Microbiol Lett. „Rapid nested PCR-based detection of *Ramularia collo-cygni* direct from barley.“; Frei *et al.* 2007, J. Phytopathology „Direct-PCR detection and epidemiology of *Ramularia collo-cygni* 45 associated with barley necrotic leaf spots.“). Techniky PCR byly úspěšně využity i při detekci patogenů pšenice, jako např.: *Fusarium* spp., *Gaeumannomyces graminis*, *Microdochium nivale* spp., *Puccinia* spp., *Rhizoctonia cerealis*, *Septoria tritici*, *Septoria nodorum* (*Stagonospora nodorum*), *Oculimacula* spp. a *Tilletia tritici* (McCartney *et al.* 2003, Pest Manag. Sci. „Molecular diagnostics for fungal plant pathogens.“). Vzhledem k vysoké variabilitě v morfologii, fyziologii a patogenicitě má využití PCR metod velkou budoucnost i při detekci *Drechslera tritici-repentis*. 50 V případě detekce *Drechslera tritici-repentis* v pšenici má použití PCR metody jednoznačný význam i proto, že na základě vizuálních symptomů je těžko odlišitelná od dalšího významného patogena pšenice *Stagonospora nodorum*. V případě tohoto patogena byly DNA markery

- (RAPD, AFLP, ISSRs) dosud úspěšně použity pouze k detekci vnitrodruhové genetické diverzity mezi izoláty *Pyrenophora tritici-repentis* (Friesen *et al.* 2005, Phytopathology „Population genetic analysis of a global collection of *Pyrenophora tritici-repentis*, causal agent of tan spot of wheat.“; Singh & Hughes 2006, Journal of Phytopathology „Genetic similarity among isolates of *Pyrenophora tritici-repentis*, causal agent of tan spot of wheat.“; Iram a Ahmad 2007, Archives of Phytopathology and Plant Protection „Foliar blight spectrum and genetic variability of *Pyrenophora tritici-repentis*.“; Leišová *et al.* 2008, Journal of Plant Pathology „Genetic diversity of *Pyrenophora tritici-repentis* isolates as revealed by AFLP analysis.“).

Podstata technického řešení

- 10 Výše uvedené nedostatky odstraňují primery k detekci patogena *Drechslera tritici-repentis* v pšenici, podle technického řešení, jehož podstata spočívá v tom, že se detekce provádí metodou PCR s novými oligonukleotidovými primery o složení

DTR1-F: ACCAATATGAAGCCGGACTG (SEQ ID NO: 1)

DTR1-R: CTCGGGAGAGAGACAAGACG (SEQ ID NO: 2)

- 15 které umožňují amplifikaci fragmentu patogena o velikosti 382 bp.

Podstatou technického řešení jsou oligonukleotidové primery, které byly navrženy na oblast nukleotidové sekvence ITS1 - ITS2 oblasti genu ribozomální DNA *Drechslera tritici-repentis*, amplifikující fragment cílové sekvence patogena o velikosti 382 bp.

Dále je podána definice některých použitých pojmů:

- 20 Pojem DNA

Molekula DNA je uzpůsobena pro uchování 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.

30

Pojem 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.

35

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

Pojem 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 prodloužování nově vznikajícího řetězce pomocí enzymu polymerázy. Odtud tedy název polymerázová řetězová reakce. Tento třístupňový proces se opakuje cca 30 až 40×. Běžné techniky molekulární biologie jsou vysvětleny v literatuře např. Sambrook *et al.*, 2001, Molecular cloning - a laboratory manual I., II., III.

45

Pojem 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.

Přehled obrázků

Na Obr. 1 je znázorněna amplifikace pomocí primerů DTR1-F (SEQ ID NO: 1) a DTR1-R (SEQ ID NO: 2) se specifickým produktem o velikosti 382 bp na souboru izolátů *Drechslera tritici-repentis* a na vybraných patogenech obilovin. Legenda: Dráha 1. ladder 50 bp, 2. *Drechslera tritici-repentis*, 3. *Drechslera tritici-repentis*, 4. negativní kontrola, 5. *Drechslera tritici-repentis* (Finsko), 6. *Pyrenophora graminea*, 7. až 10. *Pyrenophora teres*, 11. až 12. *Septoria tritici*, 13. až 15. *Stagonospora nodorum*, 16. až 18. *Rhynchosporium secalis*, 19. *Fusarium graminearum*, 20. *Fusarium poe*, 21. *Fusarium culmorum*, 22. zdravé listy pšenice.

Na Obr. 2 je znázorněna amplifikace pomocí primerů DTR1-F (SEQ ID NO: 1) a DTR1-R (SEQ ID NO: 2) v listech rostlin po umělé inokulaci a v zrně pšenice s přirozenou infekcí v porovnání s negativní kontrolou. Legenda: Dráha 1. *Drechslera tritici-repentis*, 2. ladder 25 bp, 3. negativní kontrola, 4. až 7. listy pšenice po umělé infekci *Drechslera tritici-repentis*, 8. až 11. zrna pšenice přirozeně infikované patogenem *Drechslera tritici-repentis*.

Následující příklady provedení oligonukleotidové primery podle technického řešení pouze dokládají, ale neomezují. Účinnost těchto primerů byla jednoznačně kladně ověřena v laboratořích přihlašovatelů v Česku i na Slovensku.

Příklady provedení

Výsledky všech měření jsou shrnuty a uvedeny v příložených Tabulkách 1 až 3 a na obrázcích 1 a 2.

Příklad 1

Potvrzení spolehlivosti a specifity primerů DTR1-F SEQ ID NO: 1 a DTR1-R SEQ ID NO: 2 na souboru izolátů *Drechslera tritici-repentis* a na vybraných patogenech obilovin

Izoláty *Drechslera tritici-repentis* byly izolovány z listů pšenice nasbíraných z různých oblastí Slovenska. Dále bylo v práci použito 10 izolátů z různých oblastí Finska, které laskavě poskytla Dr. M. Jalli (MTT Agrifood Research Finland) a 1 izolát z ČR (Tabulka 1). Pro vyloučení falešně pozitivních výsledků byly do reakce začleněny vzorky obsahující DNA houbových patogenů potenciálně se vyskytujících na pšenici. Kultury patogenů byly uchovávány na bramborovo-glukózovém agaru při 20 °C v Petriho miskách. Mycélia patogenů byla seškrábnuta sterilní špachtlí z agarových destiček a následně v třecích porcelánových miskách homogenizovány pomocí teutého dusíku. DNA byla extrahována použitím kitu DNeasy Plant Mini Kit (Qiagene). PCR reakce proběhla v dané reakční směsi (Tabulka 2) s primery DTR1-F (SEQ ID NO: 1) a DTR1-R (SEQ ID NO: 2) za uvedených reakčních podmínek (Tabulka 3). Reakce byla provedena třikrát.

Závěr měření

Po PCR za definovaných reakčních podmínek (Tabulka 1) s primery DTR1-F (SEQ ID NO: 1) a DTR1-R (SEQ ID NO: 2) se vzorky obsahující DNA *Drechslera tritici-repentis* vyznačovaly

pozitivní odezvou tzn. proužkem na gelu o velikosti 382 bp. U ostatních vzorků testovaných druhů patogenů a v DNA ze zdravých listů pšenice nebyl cílový fragment amplifikován (Obr. 1).

Příklad 2

5 Detekce *Drechslera tritici-repentis* v uměle infikovaných listech a v přirozeně infikovaných zrnech pšenice ve srovnání s negativní kontrolou

V klimaboxu byl založen experiment se 4 odrůdami pšenice, které byly uměle infikovány houbovým patogenem *Drechslera tritici-repentis*. 11 dní po infekci byly odebrány vzorky listů infikovaných rostlin k molekulární analýze. Obdobně byly odebrány vzorky zrn stejných 4 odrůd z polních podmínek s přirozenou infekcí. Přirozeně infikovaná zrna byla homogenizována pomocí ultracentrifugačního mlýna ZM 100 (Retschn GmbH & Co.KG., Haan, Germany). Rostlinný materiál byl následně v třecích porcelánových miskách homogenizován pomocí tekutého dusíku. DNA byla extrahována použitím kitu DNeasy Plant Mini Kit (Qiagene). PCR reakce proběhla v dané reakční směsi (Tabulka 2) s primery DTR1-F (SEQ ID NO: 1) a DTR1-R (SEQ ID NO: 2) za uvedených reakčních podmínek (Tabulka 3). Reakce byla uskutečněna třikrát.

15 Závěr měření

Primery DTR1-F (SEQ ID NO: 1) a DTR1-R (SEQ ID NO: 2) byly úspěšně použity jak k detekci patogena *Drechslera tritici-repentis* v uměle infikovaných listech pšenice 11 dní po inokulaci, tak i v přirozeně infikovaných zrnech pšenice z polních podmínek. Specifický pár primerů správně amplifikoval fragment DNA patogena o velikosti 382 bp v infikovaných listech i v zrnech pšenice (Obr. 2). V negativní kontrole nebyl cílový fragment amplifikován.

Tabulka 1

Soubor použitých izolátů *Drechslera tritici-repentis* v PCR reakci

Izolát	Původ	Lokalita	Rok	Reakce
DTR1	Slovensko	Malý Šariš	2005	+
DTR2	Slovensko	Malý Šariš	2005	+
DTR4	Slovensko	Trenčianské Teplice	2006	+
DTR5	Slovensko	Kalná nad Hronom	2006	+
DTR6	Slovensko	Vidina	2006	+
DTR7	Slovensko	Spišská Belá	2006	+
DTR8	Slovensko	Martin Valča	2006	+
DTR9	Slovensko	Veľké Ripňany	2006	+
DTR10	Slovensko	Dolné Plachtince	2006	+
DTR11	Slovensko	Bodorová	2006	+
DTR12	Slovensko	RV/Rožňava05	2005	+
DTR13	Slovensko	Bzince05	2005	+
DTR14	Slovensko	Turčianské Teplice06	2006	+
DTR15	Česká republika	Kroměříž	2008	+
D2	Finsko	Mietoinen	2004	+
D3	Finsko	Ylistaro	2004	+
D15	Finsko	Inkoo	2004	+
D23	Finsko	Inkoo	2004	+
D31	Finsko	Mietoinen	2004	+
D32	Finsko	Mietoinen	2004	+
D35	Finsko	Mietoinen	2004	+
D42	Finsko	Jokioinen	2004	+
D45	Finsko	Päikäne	2004	+
D65	Finsko	Inkoo	2004	+

Pozitivní výsledek reakce je označený znaménkem + (plus)

Tabulka 2

Reakční směs v celkovém objemu 25 μ l

Chemikálie	Konečná koncentrace	Objem
voda		16,8 μ l
10mM dNTP	0,2mM	0,5 μ l
25mM MgCl ₂	3mM	1,5 μ l
10 \times PCR Pufor 200mM Tris-HCl 500mM KCl	1 \times	2,5 μ l
10 μ M Primer SEQ ID:1	0,4 μ M	1,25 μ l
10 μ M Primer SEQ ID:2	0,4 μ M	1,25 μ l
5 U/1 μ l Taq Polymeráza	1 U	0,2 μ l
DNA vzorku	1-10 ng	1 μ l
Celkem		25 μ l

Tabulka 3

Reakční podmínky PCR

Kroky reakce	Teplota [°C]	Čas [s/min.]	Počet cyklů
úvodní denaturace	94	1 min.	1
denaturace	94	30 s	25
annealing	64	30 s	25
elongace	72	60 s	25
závěrečná elongace	72	5 min.	1
uchování	10	do vyzvednutí	-

5 Průmyslová využitelnost

Nové specifické oligonukleotidové primery DTR1-F (SEQ ID NO: 1) a DTR1-R (SEQ ID NO: 2) mají využití a význam v rostlinolékařství při detekci houbového patogena *Drechslera tritici-repentis* v pšenici, což může zefektivnit účinnou ochranu pšenice. Na základě výše uvedených výsledků byl vypracován protokol pro spolehlivou detekci daného patogena a jeho odlišení od jiných významných patogenů pomocí PCR.

N Á R O K Y N A O C H R A N U

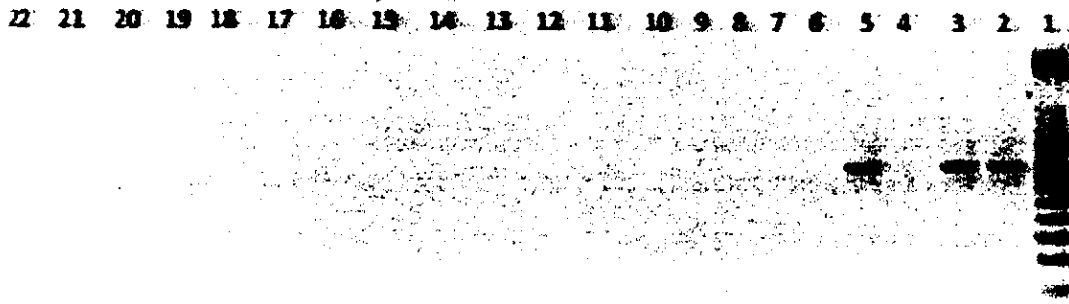
1. Primery pro detekci *Drechslera tritici-repentis* v pšenici, metodou PCR, o složení oligonukleotidových primerů

15 DTR1-F: ACCAATATGAAGCCGGACTG (SEQ ID NO: 1)
DTR1-R: CTCGGGAGAGAGACAAGACG (SEQ ID NO: 2)

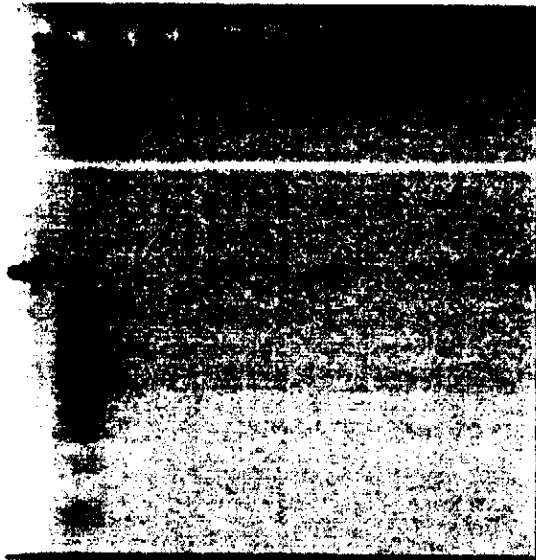
které umožňují amplifikaci fragmentu patogena o velikosti 382 bp.

1 výkres

OBR. 1



OBR. 2



Konec dokumentu