

UŽITNÝ VZOR

(11) Číslo dokumentu:

20883

(19)
ČESKÁ
REPUBLIKA



ÚŘAD
PRŮMYSLOVÉHO
VLASTNICTVÍ

(21) Číslo přihlášky: **2010 - 22508**
(22) Přihlášeno: **30.03.2010**
(47) Zapsáno: **10.05.2010**

(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
Výzkumný ústav rostlinné výroby, v. v. i., Praha, CZ
Agrotest fyto, s. r. o., Kroměříž, CZ

(72) Původce:

Gubiš Josef Ing. Ph.D., Bzince pod Javorinou, SK
Hudcovicová Martina Mgr. Ph.D., Vad'ovce, SK
Svobodová-Leišová Leona RNDr. Ph.D., Praha, CZ
Matušinsky Pavel Mgr. Ph.D., Kroměříž, CZ

(74) Zástupce:

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

(54) Název užitého vzoru:

Sonda a primery pro kvantifikaci patogena *Ramularia collo-cygni* v pletivech ječmene

CZ 20883 U1

Sonda a primery pro kvantifikaci patogena *Ramularia collo-cygni* v pletivech ječmene

Oblast techniky

Řešení se týká nové real-time PCR sondy a primerů pro detekci a kvantifikaci houbového patogena *Ramularia collo-cygni* zejména v ječmeni, což má význam v rostlinolékařství a molekulární biologii.

Dosavadní stav techniky

Patogen *Ramularia collo-cygni* (Sutton & Waller) je houbový patogen, který napadá jarní i ozimý ječmen a způsobuje onemocnění s názvem Endofytická tmavohnědá skvrnitost ječmene projevující se nekrotickými skvrnami na listech. Choroba bývá označována jako „nová“ a to z důvodu jejího relativně nedávného znovuobjevení. Výskyt této choroby byl zaznamenán již v několika zemích jako například Rakousko (1987), Švýcarsko (1988), Německo (1998), Nový Zéland (2000), Jižní Amerika (2002), Skotsko (2002), Francie (2003), Norsko (2004), Irsko (2004), Dánsko (2006), Švédsko (2006), ale také Česká republika (již v roce 1998) a Slovensko (2008). Přestože byl původce objeven před více než 100 lety (1893), tehdy znám jako *Ophiocladium hordei*, vážný zájem fytopatologů o něj se datuje teprve od 80. let minulého století, když byl identifikován jako původce nové choroby ječmene v Rakousku (1987). Sutton a Waller (1988) revidovali jeho taxonomické zařazení a přejmenovali jej na *Ramularia collo-cygni*. Nekrotické skvrny na listech ječmene se objevují obvykle v období růstových fází BBCH 39-61 a následné výnosové ztráty způsobené chorobou se pohybují v rozmezí 15 až 25 %. Dochází také ke snížení kvality zrna, což je významné zejména u sladovnických ječmenů. Závažnost choroby spočívá ve velmi rychlém rozvoji skvrnitosti za účasti toxinů, které mohou způsobit odumření listů během 12 dnů. Patogen *Ramularia collo-cygni* je obtížně rozlišitelný od dalších listových skvrnitostí způsobených buď abiotickými faktory nebo jinými houbovými parazity zejména, *Cochliobolus sativus* nebo *Pyrenophora teres* f. *maculata*.

Real-time PCR je metoda molekulární biologie umožňující rychlou, citlivou a spolehlivou detekci a kvantifikaci specifického úseku DNA. Je důležitým nástrojem pro detekci patogenních organismů. V posledních letech nabývají metody molekulární biologie v rostlinolékařství velkého významu. Princip diagnostiky rostlinných patogenů pomocí standardní 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?“). Možnost kvantifikace patogena ve tkáních hostitele zvyhodňuje metodu real-time PCR oproti metodám ostatním. Princip použití real-time PCR v diagnostice rostlinných patogenů je popsán v literatuře, např. (Norman *et al.* 2002, Can. J. Plant Pathol., „Real-time PCR and its application for rapid plant disease diagnostics.“ nebo Schena *et al.*, 2004, Eur. J. Plant Pathol., „Real-time PCR: a new technology to detect and study phytopathogenic and antagonisti fungi.“).

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. Většina standardních diagnostických metod neumožňuje exaktní kvantifikaci patogena. Obtížnost identifikace a stanovení rozsahu či intenzity podléhá do značné míry subjektivnímu náhledu hodnotitele. Vnější příznaky (symptomy) choroby se mohou překrývat, obzvlášť 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 obzvlášť vysoké nároky na erudici, zkušenosti a taxonomické znalosti fytopatologa. Kultivační techniky zase mohou zvoleným živným médiem preferovat některé druhy patogenů, kterým dané médium lépe vyhovuje a to může být příčinou nepřesné diagnózy, navíc je tato metoda ča-

sově náročná. S objevem 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 zvládá pouze standardní molekulární techniky.

K diagnostice listových skvrnitostí ječmene jsou využívány různé molekulární techniky využívané. Byly publikovány primery k diagnostice listových patogenů ječmene: *Pyrenophora teres* (Leisova *et al.*, J. Phytopathology, 2005, „Genetic diversity of *Pyrenophora teres* isolates as detected by AFLP analysis.“), *Rhynshosporium secalis* (Lee *et al.*, Plant disease, 2001, A PCR-based assay to detect *Rhynshosporium secalis* in barley seed.“). Také již byly publikovány metody využívající real-time PCR diagnostiku u *Pyrenophora teres* (Leišová *et al.*, 2006, Journal of Microbiological Methods, „Quantification of *Pyrenophora teres* in infected barley leaves using real-time PCR“) *Pyrenophora graminea* (Justsen *et al.*, 2008, Eur. J. Plant Pathol., Quantification of *Pyrenophora graminea* in barley seed using real-time PCR) *Rhynshosporium secalis* (Fontaine *et al.*, 2007, Phytopathology, „Application of Real-Time and Multiplex Polymerase Chain Reaction Assays to Study Leaf Blotch Epidemics in Barley“). Byly také vyvinuty a publikovány dvě metody detekce *Ramularia collo-cygni* za použití jednak 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* associated with barely necrotic leaf spots.“). Obě tyto metody však poskytují pouze kvalitativní stanovení, ale neumožňují kvantifikovat množství DNA patogena *R. collo-cygni*.

Podstata technického řešení

Výše uvedené nedostatky odstraňuje sonda a primery pro kvantifikaci patogena *Ramularia collo-cygni* v pletivech ječmene, podle technického řešení, jehož podstata spočívá v tom, že je prováděna metodou Real-time PCR, a specifické složení sondy je

RccSON (SEQ ID NO: 1) CTCGCTTGTTATTGGGCGTC

a primerů

Rccj1-F (SEQ ID NO: 2) GAGCGTCATTTCACTCAAG

Rccj3-R (SEQ ID NO: 3) GAGGCGCGAGAGACT,

které umožní amplifikaci fragmentu patogena o velikosti 63 bp.

Podstatou technického řešení je sonda (TaqMan) pro real-time PCR a oligonukleotidové primery, které byly navrženy ve specifických oblastech ribozomální DNA 5,8S rRNA a ITS2 patogena *R. collo-cygni*. Metoda real-time PCR se sondou [RccSON (SEQ ID NO: 1)] a primery [Rccj1-F (SEQ ID NO: 2) a Rccj3-R (SEQ ID NO: 3)] podle technického řešení umožní amplifikaci fragmentu patogena o velikosti 63 bp a kvantifikaci výchozího množství DNA patogena díky fluorescenčně značené sondě, která hybridizuje k amplifikované cílové sekvenci.

Dále je nutné vysvětlit definice některých použitých pojmů:

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) - deoxyadenosin-

fosfát, deoxytymidinfosfát, deoxyguanosinfosfát a deoxycytidinfosfát. Genetická informace je v DNA zapsána v pořadí bází.

Pojem cílová sekvence

Znamená úsek DNA, který má být amplifikován, detekován či jinak analyzován.

5 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.

10 Pojem real-time PCR sonda

Jedná se o krátký oligonukleotid (cca 25 až 30 nukleotidů), který hybridizuje s cílovou sekvencí uvnitř amplifikovaného regionu. Sonda s označením TaqMan je fluorescenčně značená na 5' konci tzv. reportérem (fluorochrome) a na 3' konci tzv. zhášečem (quencher). V případě, že amplifikace neprobíhá, je reportérem vyzařovaná energie pohlcována zhášečem. V případě amplifikace dojde k rozštěpení této sondy, reportér se dostane z dosahu zhášeče a uvolněný fluorescenční signál je snímán a měřen v každém cyklu reakce CCD kamerou a na tomto základě je odvozeno množství templátové DNA.

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 prodlužování nově vznikajícího řetězce pomocí enzymu DNA-dependentní DNA 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.

Pojem real-time PCR

Real-time PCR je metoda molekulární biologie umožňující rychlou, citlivou a spolehlivou detekci a kvantifikaci specifického úseku DNA. Je důležitým nástrojem pro detekci patogenních organismů. Real-time PCR je založena na sledování průběhu polymerázové řetězové reakce v průběhu reakce (tzv. v reálném čase - odtud název real-time) pomocí fluorescenčních sond, které detekují množství PCR produktu během reakce zvýšením své fluorescenční aktivity. Výhodou real-time PCR oproti standardní PCR je umožnění přesného stanovení výchozího počtu kopií cílové templátové sekvence DNA, tedy schopnost kvantifikace. Během každého cyklu PCR se měří fluorescence a její intenzita je úměrná množství amplifikátu přítomného v reakční směsi.

Původci technického řešení byla úspěšně prokázána specifická reakce primerů a sondy podle technického řešení s DNA patogena a v následujících tabulkách jsou shrnuty výsledky jejich měření, které bylo prováděno v České republice v Agrotestu fyto, s.r.o. v Kroměříži a ve Výzkumném ústavu rostlinné výroby, v.v.i. v Praze, dále na Slovensku v Centru výskumu rostlinné výroby Piešťany.

Následné příklady provedení technické řešení pouze dokládají, aniž by ho jakkoliv omezovaly.

Příklady provedení

Výsledky všech měření jsou souhrnně uvedeny v příložených Tabulkách 1 až 8 a na obrázku 1.

Příklad 1

Potvrzení spolehlivosti a specifity primerů SEQ ID: 2 a SEQ ID: 3 na souboru izolátů *R. collo-cygni* a vybraných patogenů obilovin

Izoláty *Ramularia collo-cygni* byly izolovány z listů ječmene nashromážděného z území ČR a SR. Navíc byly při práci použity izoláty pocházející ze Švýcarska, které poskytl Dr. Frei (Agroscope, RAC Changins, Nyon, Switzerland) a Skotska, které poskytl Dr. Havis (Crop and Soil Research Group, Scottish Agricultural College, UK) (Tabulka 1). Součástí experimentu bylo vyloučení falešně pozitivních výsledků, proto byly do reakce zahrnuty vzorky obsahující DNA houbových patogenů potenciálně se vyskytujících na ječmeni. Kultury hub byly uchovávány 4 týdny na Petriho miskách s PDA agarem v inkubátoru při 20 °C.

Mycelium bylo špachtlí sejmuto a drceno v porcelánových třecích miskách v prostředí tekutého dusíku. DNA byla extrahována pomocí soupravy DNeasy Plant Mini Kit (Qiagen).

PCR proběhla v uvedené reakční směsi za uvedených reakčních podmínek (Tabulky 2 a 3).

Závěr měření:

Vzorky obsahující DNA patogena *R. collo-cygni* se po PCR s primery (SEQ ID: 2) a (SEQ ID: 3) za uvedených reakčních podmínek vyznačovaly pozitivní odezvou, tj. proužkem (bandem) na gelu o velikosti 63 bp, u ostatních testovaných druhů nebyl cílový fragment amplifikován.

Příklad 2

Ověření funkčnosti a spolehlivosti sondy SEQ ID: 1 a primerů SEQ ID: 2 a SEQ ID: 3 na biologickém materiálu (izoláty *Ramularia collo-cygni* různého původu, listy ječmene zdravé a s přirozenou a umělou infekcí patogenem *R. collo-cygni* a semena ječmene zdravá a s přirozenou infekcí *R. collo-cygni*)

Izoláty *Ramularia collo-cygni* byly izolovány z listů ječmene z území ČR a SR. Kultury *R. collo-cygni* byly uchovávány 4 týdny na Petriho miskách s PDA agarem v inkubátoru při 20 °C. Listy ječmene byly infikovány ve skleníkových podmínkách. Dále byly do experimentu zařazeny vzorky listů z přirozeně infikovaných porostů a zdravé listy z kontrolních variant bez infekce pro ověření správnosti reakce. Dále byly do experimentu zahrnuty vzorky semen s přirozenou infekcí a kontrolní vzorky zdravých semen bez infekce (Tabulka 4).

Mycelium houbových kultur bylo špachtlí sejmuto a rozdrceno v porcelánových třecích miskách v prostředí tekutého dusíku, taktéž listy i semena. DNA byla extrahována pomocí soupravy DNeasy Plant Mini Kit (Qiagen) a to jak houbové mycelium, tak i rostlinné vzorky.

PCR proběhla v uvedené reakční směsi za uvedených reakčních podmínek (Tabulky 7 a 8).

Závěr měření:

Měření prokázalo dobrou funkčnost nové sondy [RccSON (SEQ ID NO: 1)] a primerů [Rccj1-F (SEQ ID NO: 2) a Rccj3-R (SEQ ID NO: 3)], které byly schopny prokázat přítomnost DNA patogena *R. collo-cygni* v infikovaném biologickém materiálu s detekovatelnou mírou patogena v pletivu a naopak netvořit pozitivní odezvu v případě zdravého rostlinného pletiva (Tabulka 4). Metoda umožnila kvantifikovat množství DNA patogena *R. collo-cygni* ve vzorcích listů a semen ječmene s různou mírou napadení (Tabulky 5 a 6).

Tabulka 1

Seznam izolátů houbových patogenů použitých v PCR reakci

| Č. | Izolát | Reakce | Č. | Izolát | Reakce |
|----|---|--------|----|-------------------------------------|--------|
| 1 | <i>Drechslera tritici-repentis</i> (SVK1) | - | 11 | <i>Septoria tritici</i> (CZ) | - |
| 2 | <i>D. tritici-repentis</i> (SVK2) | - | 12 | <i>S. tritici</i> (USA) | - |
| 3 | <i>D. tritici-repentis</i> (FIN) | - | 13 | <i>Stagonospora nodorum</i> (SVK) | - |
| 4 | <i>Pyrenophora gramineae</i> (AUS) | - | 14 | <i>S. nodorum</i> (FIN) | - |
| 5 | <i>P. teres</i> (CZ) | - | 15 | <i>Rhynchosporium secalis</i> (SVK) | - |
| 6 | <i>P. teres</i> (SVK) | - | 16 | <i>R. secalis</i> (NOR1) | - |
| 7 | <i>Ramularia collo-cygni</i> (CH) | + | 17 | <i>R. secalis</i> (NOR2) | - |
| 8 | <i>R. collo-cygni</i> (GB) | + | 18 | <i>Fusarium graminearum</i> (CZ) | - |
| 9 | <i>R. collo-cygni</i> (CZ) | + | 19 | <i>F. culmorum</i> (CZ) | - |
| 10 | <i>R. collo-cygni</i> (SVK) | + | 20 | <i>F. avenaceum</i> (CZ) | - |

- 5 Pozitivní výsledek reakce vyznačující se amplifikací cílové DNA je označen znaménkem + (plus), negativní odezva znaménkem - (minus); zkratky za názvy houbových druhů označují místo původu: CZ - Česká republika, SVK- Slovenská Republika, FIN - Finsko, AUS - Rakousko, CH - Švýcarsko, GB - Velká Británie (v tomto případě konkrétně Skotsko), NOR - Norsko, USA - Spojené Státy Americké.

Tabulka 2

- 10 Reakční směs v celkovém objemu 25 μ l

| Chemikálie | Konečná koncentrace | Objem |
|---|---------------------|--------------|
| voda | | 17,6 μ l |
| 10 mM dNTP | 0,2 mM | 0,5 μ l |
| 50 mM MgCl ₂ | 3,0 mM | 1,5 μ l |
| 10 \times PCR Pufr 200 mM Tris-HCl 500 mM KCl | 1 \times | 2,5 μ l |
| 10 μ M Primer SEQ ID: 2 | 0,4 μ M | 1,0 μ l |
| 10 μ M Primer SEQ ID: 3 | 0,4 μ M | 1,0 μ l |
| 5 U/1 μ l Taq Polymeráza | 2 U | 0,4 μ l |
| DNA vzorku | 1-10 ng | 0,5 μ l |
| Celkem | - | 25,0 μ l |

Tabulka 3

Reakční podmínky zvolené při PCR

| Kroky reakce | Teplota [°C] | Čas [s/min] | Počet cyklů |
|--------------------|--------------|---------------|-------------|
| úvodní denaturace | 95 | 3 min | 1 |
| denaturace | 94 | 20 s | 35 |
| annealing | 63 | 20 s | 35 |
| elongace | 72 | 60 s | 35 |
| závěrečná elongace | 72 | 3 min | 1 |
| uchování | 10 | do vyzvednutí | - |

Tabulka 4

Seznam testovaného biologického materiálu pro real-time PCR

| Č. | Izolát/genotyp/lokalita | Materiál | Reakce | Č. | Izolát/genotyp/lokalita | Materiál | Reakce |
|----|-------------------------|----------|--------|----|-------------------------|----------------------|--------|
| 1 | Rcc Kroměříž 1-08 | mycelium | + | 22 | Rcc Viglaš-Pstruša 08 | mycelium | + |
| 2 | Rcc Kroměříž 2-08 | mycelium | + | 23 | Rcc 07-32-CH | mycelium | + |
| 3 | Rcc Kroměříž 3-08 | mycelium | + | 24 | Rcc 07-24-CH | mycelium | + |
| 4 | Rcc Kroměříž 4-08 | mycelium | + | 25 | Rcc 07-12-CH | mycelium | + |
| 5 | Rcc Kroměříž 5-08 | mycelium | + | 26 | Rcc 7B28-GB | mycelium | + |
| 6 | Rcc Kroměříž 6-08 | mycelium | + | 27 | Rcc 7B57-GB | mycelium | + |
| 7 | Rcc Kroměříž 7-08 | mycelium | + | 28 | SK 6225-12-05 K | list*** | - |
| 8 | Vigláš-Pstruša 07 | list* | + | 29 | Aura K | list*** | - |
| 9 | Vigláš-Pstruša 06 | list* | + | 30 | Bojos K | semeno [†] | + |
| 10 | Kalná nad Hronom 04 | list* | + | 31 | Tolar K | semeno [†] | - |
| 11 | Velký Krtíš 04 | list* | + | 32 | Malz K | semeno [†] | - |
| 12 | Aura | list** | + | 33 | Sebastian K | semeno [†] | - |
| 13 | Ezer | list** | + | 34 | Bojos | semeno ^{††} | - |
| 14 | Ezer K | list*** | - | 35 | Tolar | semeno ^{††} | + |
| 15 | Nitran | list** | - | 36 | Malz | semeno ^{††} | + |
| 16 | Punto K | list*** | - | 37 | Sebastian | semeno ^{††} | + |
| 17 | Punto | list** | - | 38 | Scarlet | semeno ^{††} | + |
| 18 | SK 6225-15-05 | list** | + | 39 | Prestige | semeno ^{††} | + |
| 19 | SK 6339 | list** | + | 40 | Diplom | semeno ^{††} | + |
| 20 | Nitran K | list*** | - | 41 | Jersey | semeno ^{††} | + |
| 21 | SK 6339 K | list*** | - | 42 | voda - kontrolní vzorek | voda | - |

- 5 Rcc - *R. collo-cygni* izolát; list* - přirozeně infikovaný suchý list z polních podmínek; list** - uměle infikovaný list ze skleníkových podmínek; list*** - kontrola bez infekce; semeno[†] - kontrola bez infekce; semeno^{††} - přirozeně infikované semeno z polních podmínek.

Pozitivní výsledek reakce vyznačující se amplifikací cílové DNA je označen znaménkem + (plus), negativní odezva znaménkem - (minus).

Číslování vzorků v Tabulce 4 odpovídá číslování vzorků na obrázku 1.

10 Tabulka 5

Kvantifikace DNA *R. collo-cygni* v listech odrůd ječmene po umělé infekci a bez infekce pomocí nové sondy [RccSON (SEQ ID NO: 1)] a primerů [Rccj1-F (SEQ ID NO: 2) a Rccj3-R (SEQ ID NO: 3)]

| Odrůda | Množství DNA <i>R.collo-cygni</i> (pg 100 ng ⁻¹)* |
|-----------------|---|
| Ezer | 10,920 |
| Punto | 2,828 |
| Nitran | 1,576 |
| Aura | 34,160 |
| SK 6339 | 15,68 |
| SK 6225-12-05 | 5,480 |
| Ezer K | PDL |
| Punto 5 | PDL |
| Nitran K | PDL |
| Aura K | PDL |
| SK 6339 K | PDL |
| SK 6225-12-05 K | PDL |

- 15 PDL pod detekovaným limitem; K - zdravá kontrola bez umělé infekce *R. collo-cygni*;
* - množství DNA *R. collo-cygni* (pg) ve 100 ng celkové DNA.

Tabulka 6

Kvantifikace DNA *Ramularie collo-cygni* v semenech a suchých listech ječmene přirozeně infikovaných *R. collo-cygni* a semenech bez infekce pomocí nové sondy [RccSON (SEQ ID NO: 1)] a primerů [Rccj1-F (SEQ ID NO: 2) a Rccj3-R (SEQ ID NO: 3)]

| Odrůda/lokality | Množství <i>R.collo-cygni</i> (pg 100 ng ⁻¹)* |
|-----------------------------------|---|
| Bojos K** | PDL |
| Tolar K** | PDL |
| Malz K** | PDL |
| Sebastian K** | PDL |
| Bojos ** | 1,616 |
| Tolar ** | 3,548 |
| Malz ** | PDL |
| Sebastian ** | 1,296 |
| Scarlet ** | 11,440 |
| Prestige ** | 5,320 |
| Diplom ** | 9,000 |
| Jersey ** | 6,560 |
| Víglaš-Pstruša 07 ^{††} | 4549,440 |
| Víglaš-Pstruša 06 ^{††} | 1179,800 |
| Kalná nad Hronom 04 ^{††} | 246,360 |
| Velký Krtíš 04 ^{††} | 33,080 |

5

PDL pod detekovatelným limitem; K - zdravá kontrola bez umělé infekce *R. collo-cygni*;

* - množství DNA *R. collo-cygni* (pg) v 100 ng celkové DNA; ** - vzorky semen; †† - vzorky suchých listů.

Tabulka 7

10 Reakční směs v celkovém objemu 25 µl pro real-time PCR

| Chemikálie | Konečná koncentrace | Objem |
|--|---------------------|---------|
| Voda | - | 5,0 µl |
| TaqMan Universal PCR Master Mix, No AmpErase UNG | - | 12,5 µl |
| 1 µM sonda SEQ ID: 1 | 200 nM | 5,0 µl |
| 10 µM sonda SEQ ID: 2 | 300 nM | 0,75 µl |
| 10 µM sonda SEQ ID: 3 | 300 nM | 0,75 µl |
| DNA vzorku | 25 ng | 1,0 µl |
| Celkem | - | 25,0 µl |

Tabulka 8

Reakční podmínky real-time PCR

| Kroky reakce | Teplota [°C] | Čas [s/min] | Počet cyklů |
|-------------------|--------------|---------------|-------------|
| úvodní denaturace | 95 | 10 min | 1 |
| denaturace | 95 | 15 s | 40 |
| annealing | 60 | 60 s | 40 |
| uchování | 10 | do vyzvednutí | - |

15 Hodnoty Ct pro každou reakci byly vyhodnocovány sekvenačním detekčním software s nastavenou prahovou hodnotou ΔRn (fluorescence) na 0,2 jednotky.

Průmyslová využitelnost

Nová real-time PCR sonda [RccSON (SEQ ID NO: 1)] a primery [Rccj1-F (SEQ ID NO: 2) a Rccj3-R (SEQ ID NO: 3)] mají využití v rostlinolékařství při diagnostice patogena *Ramularia collo-cygni*, což umožní cílenou volbu účinné ochrany zejména u ječmene.

5

N Á R O K Y N A O C H R A N U

1. Sonda a primery pro kvantifikaci houbového patogena *Ramularia collo-cygni* v pletivech ječmene, metodou Real-time PCR, o složení sondy

RccSON (SEQ ID NO: 1) CTCGCTTGGTATTGGGCGTC

a primerů

10

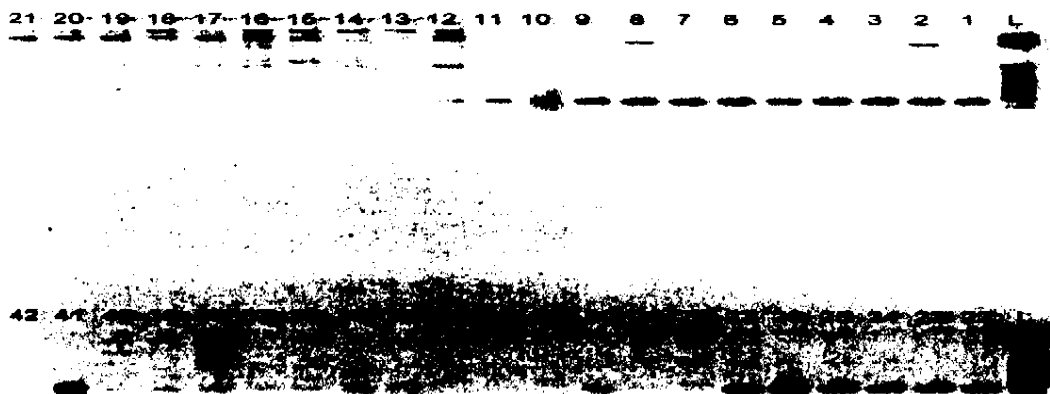
Rccj1-F (SEQ ID NO: 2) GAGCGTCATTTCACTCAAG

Rccj3-R (SEQ ID NO: 3) GAGGCGCGGAGAGACT,

které umožní amplifikaci fragmentu patogena o velikosti 63 bp.

1 výkres

Obr. 1



Obr. 1

Elektoroforeogram reakce s primery SEQ ID: 2 a SEQ ID: 3 testovaných na biologickém materiálu číslování vzorků 1 až 42 viz. Tabulka 4, kdy výsledkem je fragment o velikosti 63 bp (Pozn.: L – 25 bp marker)

Konec dokumentu
