

UŽITNÝ VZOR

(19)
ČESKÁ
REPUBLIKA



ÚŘAD
PRŮMYSLOVÉHO
VLASTNICTVÍ

(21) Číslo přihlášky: **2010 - 23447**
(22) Přihlášeno: **10.11.2010**
(47) Zapsáno: **16.05.2011**

(11) Číslo dokumentu:

22202

(13) Druh dokumentu: **U1**

(51) Int. Cl.:

C12N 15/11 (2006.01)

C12Q 1/68 (2006.01)

C12Q 1/70 (2006.01)

(73) Majitel:

Výzkumný ústav rostlinné výroby, v.v.i., Praha, CZ

(72) Původce:

Leišová-Svobodová Leona RNDr. Ph.D., Praha, CZ

(74) Zástupce:

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

(54) Název užitého vzoru:

Primery na detekci virů OYDV, LYSV, GCLV a SLV v pletivech česneku

CZ 22202 U1

Primery na detekci virů OYDV, LYSV, GCLV a SLV v pletivech česneku

Oblast techniky

Řešení se týká nových primerů pro detekci a případnou kvantifikaci virových patogenů česneku a dalších zemědělských plodin rodu *Alliaceae*, což má význam v rostlinolékařství, molekulární biologii a v uchovávání genových zdrojů.

Dosavadní stav techniky

Kulturní rostliny rodu *Allium* patří mezi nejvýznamnější zeleniny. V České republice se pěstují zejména cibule (*Allium cepa* var. *cepa*), česnek kuchyňský (*Allium sativum*) a pór (*Allium porrum*). Výnos a kvalita jejich produkce je každoročně značně snižována komplexem virových chorob, z nichž nejvíce rozšířené jsou: *Onion yellow dwarf virus* (OYDV), *Leek yellow stripe virus* (LYSV), *Garlic common latent virus* (GCLV), a *Stripe latent virus* (SLV). V České republice jsou všechny uvedené druhy virů značně rozšířeny jak v komerčně pěstovaných česnečích, tak i v importovaných druzích (Klukáčková et al., 2007, *Journal of Plant Diseases and Protection* 114: 97-100, „Natural infection of garlic (*Allium sativum* L.) by viruses in the Czech Republic“; Karlova et al., 2009, *Agriculture* 55: 58-60, „Virus diseases in collection of genetic resources of garlic in the Czech Republic“). Všechny jmenované druhy virů jsou přenášeny neperzistentně mšicemi. Vyznačují se úzkým okruhem hostitelů většinou omezených na rod *Allium*. Nejsou známy diferenciací hostitelé, což značně komplikuje jejich identifikaci zvláště, když se vyskytují ve směsných infekcích. Navíc se některé druhy projevují příznaky, často až když je přítomno více druhů virů v jedné rostlině.

Přesná a včasná diagnostika virových infekcí má velký význam v systému ochrany polních plodin. Klasické metody diagnostiky jsou zatíženy velkou chybou, neboť se vnější příznaky (symptomy) choroby překrývají, mohou být velmi variabilní nebo se nemusí vyskytovat vůbec. Proto je identifikace virů na základě vizuálního hodnocení rostlin značně nespolehlivá. V současné době je přítomnost virů nejčastěji stanovována ELISA testem, avšak pro tento test je nutné značné množství rostlinného materiálu. Test rovněž vykazuje nižší citlivost. Tam, kde je nutno virus detekovat v minimálním množství rostlinné tkáně a kde se virus vyskytuje v nízké koncentraci částic, poskytuje ELISA falešně negativní výsledky.

V současné době se přistupuje k produkci bezvirózních česneků buď jejich pěstováním ze semen nebo ozdravováním rostlin pomocí *in vitro* kultur. Zde vyvstala potřeba přesné a citlivé metody detekce virů v rostlinných pletivech. Jako nejvhodnější se ukázala metoda RT PCR, kterou už pro detekci virů česneku použili Dovaš et al., 2001, *J. Phytopathology* 149: 731-737, „Comparison of methods for virus detection in *Allium* spp.“; Lunello P., et al., 2004, *Journal of Virological Methods* 118: 15-21, „Ultra-sensitive detection of two garlic potyviruses using a real-time fluorescent (Taqman) RT-PCR assay“. V různých částech světa se vyskytují různé patotypy uvedených druhů virů, které se vyznačují vysokou mírou genetické variability. Je proto velmi obtížné detekovat všechny patotypy daného druhu viru pomocí jedné sady primerů, což je nevyhovující.

Podstata technického řešení

Výše uvedené nedostatky odstraňují primery pro detekci virů OYDV, LYSV, GCLV a SLV v pletivech česneku metodou RT PCR a ELISA testu, podle technického řešení, jehož podstata spočívá v tom, že při detekci

patogena *Onion yellow dwarf virus* (OYDV) má primer složení

OYDV81F (SEQ ID NO: 1) TTTAGCACGTTACGCATTCTGA

OYDV81R (SEQ ID NO: 2) TTACCATCCAGGCCAAACAA,

které umožní amplifikaci fragmentu patogena o velikosti 132 bp,

pro detekci patogena *Leek yellow stripe virus* (LYSV) má primer složení

LYSV81-410F (SEQ ID NO: 3) AAGAACACCAGTTAGAGCGCG

LYSV81-535R (SEQ ID NO: 4) TGCCTCTCCGTGTCCTCATC,

které umožní amplifikaci fragmentu patogena o velikosti 126 bp,

- 5 pro detekci patogena *Garlic common latent virus* (GCLV) má primer složení

GCLV2F (SEQ ID NO: 5) CGACCACCTGCTGGTTGG

GCLV1R (SEQ ID NO: 6) TCAAGTGGCTGCACACAAGC,

které umožní amplifikaci fragmentu patogena o velikosti 106 bp

a pro detekci fragmentu patogena *Stripe latent virus* (SLV) má primer složení

- 10 SLV81-569F (SEQ ID NO: 7) AACAAAGCAGCGATTCAACC

SLV81-730R (SEQ ID NO: 8) ACATCCGAAGAAACCTCCAGT,

které umožní amplifikaci fragmentu patogena o velikosti 160 bp.

- 15 Podstatou technického řešení jsou primerové páry, specificky detekujícími OYDV, LYSV, GCLV a SLV, které byly navrženy na základě sekvencí genu pro plášťový protein daného viru. Metoda RT PCR s těmito primerovými páry podle technického řešení umožní amplifikaci fragmentu patogena o velikosti 132 bp pro OYDV, 126 bp pro LYSV, 106 bp pro GCLV a 160 bp pro SLV.

Definice některých použitých pojmů je nutné vysvětlit:

Pojem DNA

- 20 Molekula DNA slouží u všech ostatních organismů s výjimkou RNA virů k uchovávání a kopírování genetické informace. DNA je tvořena dvěma řetězci. V každém řetězci se střídá pětiuhlíkový cukr deoxyribóza se zbytkem kyseliny fosforečné (fosfátem). Na deoxyribózu je kovalentní vazbou připojen jeden ze 4 typů heterocyklických sloučenin, tzv. bází. Dvě z nich jsou odvozeny ze struktury purinu - adenin (A) a guanin (G); a dvě od pyrimidinu - thymin (T) a cytosin (C).
- 25 Trojice deoxyribóza-zbytek kyseliny fosforečné-báze, tzv. nukleotid, tvoří základní jednotku (monomer) DNA. Protože na místě báze se mohou vyskytovat čtyři různé molekuly (A, T, C nebo G), existují i čtyři různé základní stavební jednotky (nukleotidy) - deoxyadenosinfosfát, deoxytimidinfosfát, deoxyguanosinfosfát a deoxycytidinfosfát. Genetická informace je v DNA zapsána v pořadí bází. Ve dvouřetězcové molekule DNA jsou k sobě oba řetězce vázány vodíko-
- 30 vými můstky mezi tzv. komplementárními bázemi A-T a C-G.

Pojem RNA

- Molekula RNA je v případě tzv. RNA virů uzpůsobena pro uchovávání a kopírování jejich genetické informace. Molekula RNA je tvořena jedním řetězcem. V každém řetězci se střídá pětiuhlíkový cukr ribóza se zbytkem kyseliny fosforečné (fosfátem). Na ribózu jsou kovalentní vazbou
- 35 připojeny báze podobně jako u DNA. RNA je velmi málo stabilní molekula a proto je v laboratorní praxi po extrakci přepisována na DNA pomocí tzv. reverzní transkripce.

Pojem cílová sekvence

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

Pojem primery

- 40 Primery jsou krátké oligonukleotidy (cca 20 nukleotidů), které jsou komplementární 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 reverzní transkripce

Reverzní transkripce je přepis RNA na DNA, který je prováděn enzymem reverzní transkriptázou jako syntéza nového řetězce DNA na základě sekvence templátové RNA.

Pojem amplifikace a PCR

- 5 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 DNA se rozpadne na dvě samostatná vlákna ssDNA; 2. annealing neboli nasednutí primerů na templátovou DNA a 3. elongace neboli prodlužování nově vznikajícího řetězce pomocí enzymu DNA-dependentní DNA polymerázy. Tento třístupňový proces se opakuje 30 až 40× a je prováděn ve speciálním zařízení termocykleru s rychlým ohřevem a chlazením. Běžné techniky molekulární biologie jsou vysvětleny v literatuře, např. Sambrook et al., 2001: Molecular Cloning - a laboratory manual I., II., III.

Přehled obrázků na výkrese

- 15 Na přiloženém výkrese jsou na Obr. 1 znázorněny grafy disociační křivky amplifikovaného produktu a to a) OYDV, b) LYSV, c) GCLV, d) SLV.

Původcem technického řešení byla úspěšně prokázána specifická reakce primerů podle technického řešení s RNA virových patogenů a v následujících tabulkách jsou shrnuty výsledky jeho měření, které bylo provedeno ve Výzkumném ústavu rostlinné výroby, v.v.i, v Praze, CZ.

- 20 Následný příklad provedení technické řešení pouze dokládá, aniž by ho jakkoliv omezoval.

Příklad provedení

Příklad 1

Ověření funkčnosti a spolehlivosti primerů pro detekci OYDV, LYSV, GCLV a SLV na biologickém materiálu:

- 25 Vzorky listových pletiv 50 genotypů česneku byly odebrány na pracovišti v Olomouci (Tabulka 1). 0,1 g rostlinného materiálu bylo rozdrceno v třecí misce v prostředí tekutého dusíku. RNA byla extrahována pomocí komerční soupravy High Pure Viral Nucleic Acid Kit (Roche, Mannheim, Germany).

- 30 RT PCR byly provedeny jednoduše v jedné zkumavce pro každý vzorek. Reakce byly prováděny v reakční směsi za uvedených reakčních podmínek (Tabulka 2 a 3) v přístroji ABI PRISM 7900 fy Applied Biosystems. Ke sběru a analýze dat sloužil program ABI PRISM 7900 Sequence Detection System. Výsledky byly srovnány s výsledky ELISA testu provedeném na témž rostlinném materiálu (Tabulka 1).

Závěr měření:

- 35 Měření prokázalo dobrou funkčnost nových primerů OYDV81F (SEQ ID NO: 1), OYDV81R (SEQ ID NO: 2), LYSV81-410F (SEQ ID NO: 3), LYSV81-535R (SEQ ID NO: 4), GCLV2F (SEQ ID NO: 5), GCLV1R (SEQ ID NO: 6), SLV81-569F (SEQ ID NO: 7) a SLV81-730R (SEQ ID NO: 8), které byly schopny prokázat přítomnost DNA patogenů OYDV, LYSV, GCLV a SLV v infikovaném biologickém materiálu s detekovatelnou mírou patogena v pletivu (Obrázek 1). Výsledky prokázaly vyšší citlivost RT PCR ve srovnání s ELISA testem (Tabulka 1).

Vzorky obsahující RNA virů OYDV, LYSV, GCLV či SLV s primery OYDV81F (SEQ ID NO: 1), OYDV81R (SEQ ID NO: 2), LYSV81-410F (SEQ ID NO: 3), LYSV81-535R (SEQ ID NO: 4), GCLV2F (SEQ ID NO: 5), GCLV1R (SEQ ID NO: 6), SLV81-569F (SEQ ID NO: 7) a SLV81-730R (SEQ ID NO: 8) se za uvedených reakčních podmínek vyznačovaly pozitivní ode-

zvou, tj. píkem při dané teplotě disociace, u negativní kontroly nebyl cílový fragment amplifikován - nebyl nalezen žádný pík nebo pík při nižší teplotě disociace.

Tabulka 1 - Analyzované vzorky a výsledky RT PCR a ELISA testu

ECN	Název kultivaru	OYDV		LYSV		GCLV		SLV	
		PCR 2010	ELISA 2010	PCR 2010	ELISA 2010	PCR 2010	ELISA 2010	PCR 2010	ELISA 2010
09H0100019	Beloretschenskij	+	+	+	+	+	+	+	+
09H0100026	Mako	+	+	-	-	+	+	+	+
09H0100028	Sukoradsky	+	+	+	+	+	+	+	+
09H0100047	landrace (Olomouc 1)	+	+	+	+	+	+	+	+
09H0100033	Řevničan	+	+	-	-	-	-	+	-
09H0100034	Kuklenský	+	+	+	+	+	+	+	+
09H0100038	Poděbradský	+	+	-	+	+	+	+	+
09H0100050	landrace (Olomouc 2)	+	+	+	+	+	+	+	+
09H0100051	Rožďalovický	+	+	+	+	+	+	+	+
09H0100052	D'Alsace Freres	+	+	+	+	+	+	+	+
09H0100054	Severský Paličák	+	+	+	+	+	+	+	+
09H0100071	Král	+	+	+	-	+	+	+	+
09H0100074	Znojemský	+	+	+	-	+	+	+	+
09H0100080	Moravan	+	+	+	-	+	+	+	+
09H0100081	Ropal	+	+	+	-	+	+	+	+
09H0100076	Bzenecký	+	+	+	-	+	+	+	+
09H0100073	Záhorský	+	+	+	+	+	+	-	-
09H0100069	Alan	+	+	+	+	+	+	+	+
09H0100079	Prim	+	+	+	+	+	+	+	+
09H0100078	Japo	+	+	+	+	+	+	+	+
09H0100030	Záhorský	+	+	+	-	+	+	+	+
09H0100241	Řevničan X-ray	+	+	+	+	+	+	+	+
09H0100253	ovošlechtění	+	+	-	-	+	+	+	+
09H0100254	KS-29/8	+	+	+	+	+	+	+	+
09H0100257	landrace (Dolní Nemci 1)	+	+	+	-	+	+	+	+
09H0100305	Bianco Veneto	+	+	+	+	-	-	+	+
09H0100454	landrace (CSK BK 87/19)	+	+	+	-	+	+	+	-
09H0100251	landrace (Rousínov 1)	+	+	-	-	+	+	+	+
09H0100256	landrace (Olomouc 4)	+	+	+	+	+	+	+	+
09H0100802	landrace (Pavlovce 287)	+	+	+	+	+	+	+	+
09H0100783	landrace (Kosičky nad Ipeľom 13)	+	+	+	+	+	+	-	-
09H0100786	landrace (Kalonda 1)	+	+	+	-	+	+	+	+
09H0100799	landrace (Rozhanovce)	+	+	+	-	+	+	-	-
09H0100806	landrace (Baska 13)	+	+	+	-	-	-	+	+
09H0100918	landrace (Djambul 2/64)	+	+	+	+	+	+	+	+
09H0101180	Alan Imp.	+	+	+	+	+	+	+	+
09H0101052	landrace (Dubový vrch)	+	+	-	-	+	+	+	+
09H0100986	landrace	+	+	+	+	+	+	+	+
09H0100989	landrace	+	+	+	+	+	+	+	+
09H0101092	Landrace(Javorník)	+	+	+	+	-	-	+	+
09H0101093	landrace (Prostějovsko)	+	+	+	+	+	+	+	+
09H0101170	Blanin	+	+	+	+	+	+	+	+
09H0101171	Lukan	+	+	+	-	+	+	+	+
09H0101172	N9A	+	+	+	-	+	+	-	-
09H0101175	landrace (Fiala)	+	+	+	+	-	-	+	+
09H0101167	(landrace) Karel	+	+	-	-	+	+	+	+
09H0101190	Tantal	+	+	+	-	+	+	+	+
09H0101191	Tristan	+	+	+	-	+	+	+	+
09H0101196	Anton	+	+	+	-	+	+	-	-
09H0101197	Anin	+	+	+	+	+	+	+	+

Tabulka 2 - Složení reakční směsi

Chemikálie	Koncentrace	Objem
Primer mix	5 uM	1,5 ul
SYBRgreen Master Mix	2x	12,5 ul
Multiscribe Reverse Transcriptase	50 U/ul	0,125 ul
Rnase Inhibitor	20 U/ul	0,5 ul
H2O (bez RNáz)		8,375 ul
Templátová RNA	150 ng/ul	2,0 ul
Reakční objem		25 ul

Tabulka 3 - Reakční podmínky

PCR reakce	48 °C	30 minut
	95 °C	10 minut
	40 cyklů:	
	95 °C	15 sekund
	60 °C	1 minuta
Disociace	95 °C	15 sekund
	60 °C	15 sekund
	95 °C	15 sekund

5 Průmyslová využitelnost

Nové primery pro detekci OYDV, LYSV, GCLV a SLV mají využití v rostlinolékařství při diagnostice virů zejména v procesu ozdravování genotypů česneku a dalších zemědělských plodin rodu *Alliaceae* pro potřeby šlechtění a uchovávání genových zdrojů.

N Á R O K Y N A O C H R A N U

- 10 1. Primery pro detekci virů OYDV, LYSV, GCLV a SLV v pletivech česneku metodou RT PCR a ELISA testu, kdy

při detekci patogena *Onion yellow dwarf virus* (OYDV) má primer složení

OYDV81F (SEQ ID NO: 1) TTTAGCACGTTACGCATTTCGA

OYDV81R (SEQ ID NO: 2) TTACCATCCAGGCCAAACAA,

- 15 které umožní amplifikaci fragmentu patogena o velikosti 132 bp,

pro detekci patogena *Leek yellow stripe virus* (LYSV) má primer složení

LYSV81-410F (SEQ ID NO: 3) AAGAACACCAGTTAGAGCGCG

LYSV81-535R (SEQ ID NO: 4) TGCCTCTCCGTGTCCTCATC,

které umožní amplifikaci fragmentu patogena o velikosti 126 bp,

- 20 pro detekci patogena *Garlic common latent virus* (GCLV) má primer složení

GCLV2F (SEQ ID NO: 5) CGACCACCTGCTGGTTGG

GCLV1R (SEQ ID NO: 6) TCAAGTGGCTGCACACAAGC,

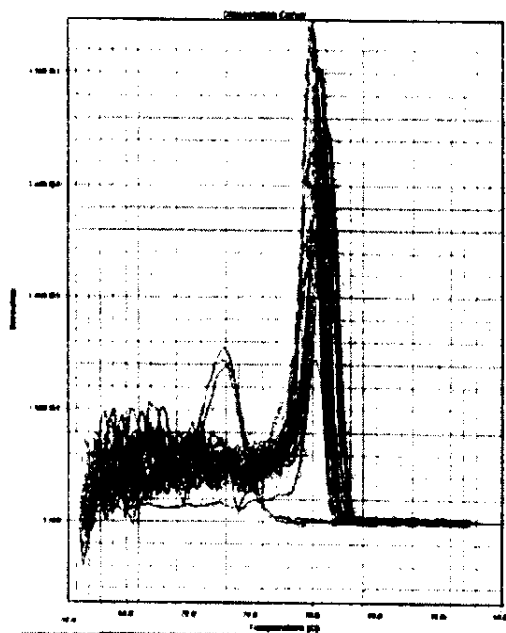
které umožní amplifikaci fragmentu patogena o velikosti 106 bp

a pro detekci fragmentu patogena *Stripe latent virus* (SLV) má primer složení

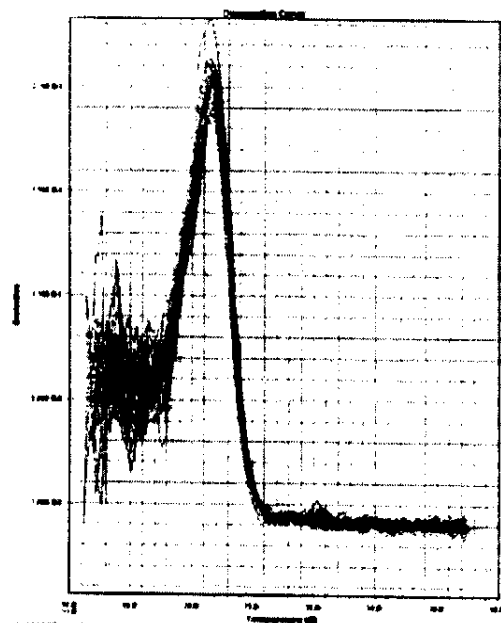
SLV81-569F (SEQ ID NO: 7) AACAAAGCAGCGATTCAACC
SLV81-730R (SEQ ID NO: 8) ACATCCGAAGAAACCTCCAGT,
které umožní amplifikaci fragmentu patogena o velikosti 160 bp.

Obr. 1

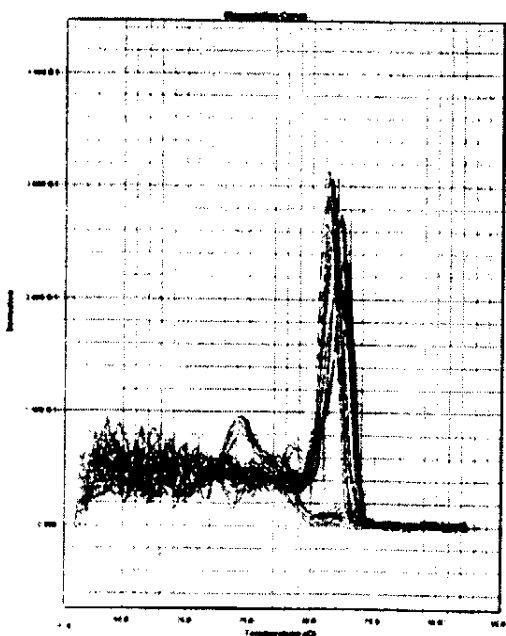
a)



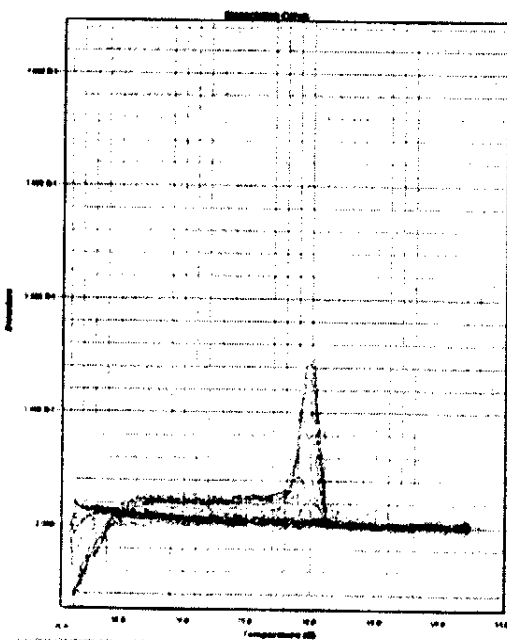
b)



c)



d)



Konec dokumentu