

C12Q 1/70 (2006.01)
C12N 15/40 (2006.01)
C12N 15/11 (2006.01)
C12Q 1/6895 (2018.01)

(19)
 ČESKÁ
 REPUBLIKA



ÚŘAD
 PRŮMYSLOVÉHO
 VLASTNICTVÍ

(21) Číslo přihlášky: **2017-162**
 (22) Přihlášeno: **22.03.2017**
 (40) Zveřejněno: **03.10.2018**
(Věstník č. 40/2018)
 (47) Uděleno: **14.05.2021**
 (24) Oznámení o udělení ve věstníku: **23.06.2021**
(Věstník č. 25/2021)

(56) Relevantní dokumenty:
 W. Jelkmann, et al.: LITTLE CHERRY CLOSTEROVIRUSES-1 AND -2, THEIR GENETIC VARIABILITY AND DETECTION BY REAL-TIME-PCR 2008 Acta Hort. 781, 321-330, ISSN: 0567-7572; S. Matic et al.: Detection of three closteroviruses in stone fruit trees by multiplex assays 2010 Journal of Plant Pathology 92, 57-63, ISSN: 1125-4653.

(73) Majitel patentu:
 Výzkumný a šlechtitelský ústav ovocnářský
 Holovousy, s. r. o., Hořice, CZ

původci onemocnění maloplodost třešní a řešení tak
 zpřesňuje, zrychluje a zlevňuje diagnostiku tohoto
 onemocnění.

(72) Původce:
 RNDr. Radek Čmejla, Ph.D., Jičín, CZ
 Mgr. Lucie Valentová, Dobrá Voda u Hořic, CZ
 RNDr. Markéta Bohunická, Ph.D., Lázně Bělehrad,
 CZ
 Ing. Jana Suchá, Hořice, CZ

(74) Zástupce:
 PATENTOVÁ KANCELÁŘ, Mgr. Hana Jirkalová,
 Michelská 18/12a, 140 00 Praha 4

(54) Název vynálezu:
**Sada pro detekci virů LChV-1 a LChV-2 v
 biologickém materiálu**

(57) Anotace:
 Sada primerů a hybridizačních sond pro PCR detekci virů
 Little cherry virus 1 (LChV-1) a Little cherry virus 2
 (LChV-2) v biologickém materiálu charakterizovaná tím,
 že obsahuje primery a hybridizační sondy, jejichž
 sekvence jsou:
 Forward primer 1:
 GCYACTGATACTGATACGTCTAGCTCG (SEQ ID
 NO. 1),
 Forward primer 2:
 TCTTTAAGTTGAGTTTGGAGYTGCG (SEQ ID NO.
 5),
 Reverse primer 1: TTTCTCCTACCGCGACGTGG
 (SEQ ID NO. 2),
 Reverse primer 2:
 CTAATTTCTTCTACCTCGACGTGG (SEQ ID NO. 3),
 Reverse primer 3: CACACGCCCCAACTTCGTCAC
 (SEQ ID NO. 6),
 Sonda 1: AATACTTGCGAAACATGAAGAGCTCC
 (SEQ ID NO. 4),
 Sonda 2: CACCTGTTGCAACTCCATACTTTTGTAG
 (SEQ ID NO. 7),
 kde Y je vybráno ze skupiny sestávající z C nebo T a
 hybridizační sondy jsou označeny pro jejich současnou
 detekci v průběhu PCR reakce. Sada primerů a sond
 umožňuje současnou velmi specifickou detekci obou virů
 v jedné PCR reakci. Viry LChV-1 a LChV-2 jsou

Sada pro detekci virů LChV-1 a LChV-2 v biologickém materiálu

Oblast techniky

5

Řešení se týká sad primerů a sond pro PCR detekci virů Little cherry virus 1 (LChV-1) a Little cherry virus 2 (LChV-2) v biologickém materiálu.

Dosavadní stav techniky

Viry Little cherry virus 1 (LChV-1) a Little cherry virus 2 (LChV-2) patří mezi (+)ssRNA viry z čeledi *Closteroviridae* a jako takové jsou velmi polymorfní s vysokou rozmanitostí nalezených izolátů. Oba viry lze detekovat ve floému a parenchymatických buňkách napadených rostlin.

15

Viry LChV-1 a LChV-2 jsou původci onemocnění maloplodost třešní, které postihuje produkční výsadby třešní na celém světě. Kromě třešní může LChV-1 napadat i jiné ovocné druhy, např. višně, slivoně, mandloně a broskvoně. Mezi symptomy patří výrazně zmenšená velikost plodů, špatná vybarvenost plodů a nevýrazná chuť, takže plody nemají tržní hodnotu a pěstitelé zaznamenávají výrazné ekonomické ztráty. Pro omezení tohoto onemocnění je tedy nezbytná včasná a přesná diagnostika.

20

V současnosti se k detekci příslušných virů používají metody PCR, a to jak v klasickém uspořádání s detekcí ampliconů pomocí gelové elektroforózy (Eastwell, K.C., 1996; Vitushkina, M., 1997; Rott, M.E., 2001; Bajet, N.B., 2008; Rao, W.-L., 2011; Candresse, T., 2013; Zong, X., 2014; Kociáni, A. T., 2015; Glasa, M., 2015; Osman, F., 2015; Ruiz-García, A.B., 2016), tak i real-time PCR založená na použití interkalačního barviva (Jelkmann, W., 2008; Zong, X., 2015). Nevýhodou obou přístupů je obecně nízká specifita, neboť publikované metody nejsou dle výsledků srovnávací analýzy sekvencí z dostupných databází schopny zachytit všechny izoláty příslušných virů. Další nevýhodou je nutnost separátní PCR reakce pro každý virus zvlášť, což analýzu prodlužuje a prodražuje.

25

30

Podstata vynálezu

35

Nevýhodu nízké specifity a nutnosti provádět individuální PCR reakce pro detekci viru LChV-1 a LChV-2 odstraňuje sada primerů a sond pro PCR detekci virů LChV-1 a LChV-2 v biologickém materiálu podle vynálezu, jehož podstata spočívá vtom, že obsahuje primery a hybridizační sondy, jejichž sekvence jsou:

40

Forward primer 1: GCYACTGATACTGATACGTCTAGCTCG (SEQ ID NO. 1),
 Forward primer 2: TCTTTAAGTTGAGTTTGGAGYTGGG (SEQ ID NO. 5),
 Reverse primer 1: TTTCTCCTACCGCGACGTGG (SEQ ID NO. 2),
 Reverse primer 2: CTAATTTCTTCTACCTCGACGTGG (SEQ ID NO. 3),
 Reverse primer 3: CACACGCCCCAACTTCGTCAC (SEQ ID NO. 6),
 Sonda 1: AATACTTGCGAAACATGAAGAGCTCC (SEQ ID NO. 4),
 Sonda 2: CACCTGTTGCAACTCCATACTTTTGTAG (SEQ ID NO. 7),

45

kde Y je vybráno ze skupiny sestávající z C nebo T a hybridizační sondy jsou označeny pro jejich současnou detekci v průběhu PCR reakce.

50

Nevýhodu nízké specifity PCR reakce pro detekci viru LChV-1 odstraňuje sada primerů a sondy pro PCR detekci viru LChV-1 v biologickém materiálu podle vynálezu, jehož podstata spočívá vtom, že obsahuje primery a hybridizační sondu, jejichž sekvence jsou:

55

Forward primer: GCYACTGATACTGATACGTCTAGCTCG (SEQ ID NO. 1),
 Reverse primer 1: TTTCTCCTACCGCGACGTGG (SEQ ID NO. 2),
 Reverse primer 2: CTAATTTCTTCTACCTCGACGTGG (SEQ ID NO. 3),
 Sonda: AATACTTGCGAAACATGAAGAGCTCC (SEQ ID NO. 4),

5

kde Y je vybráno ze skupiny sestávající z C nebo T a hybridizační sonda je označena pro její detekci v průběhu PCR reakce.

10 Nevýhodu nízké specificity PCR reakce pro detekci viru LChV-2 odstraňuje sada primerů a sondy pro PCR detekci viru LChV-2 v biologickém materiálu podle vynálezu, jehož podstata spočívá v tom, že obsahuje primery a hybridizační sondu, jejichž sekvence jsou:

15 Forward primer: TCTTTAAGTTGAGTTTGGAGYTGGG (SEQ ID NO. 5),
 Reverse primer: CACACGCCCAACTTCGTAC (SEQ ID NO. 6),
 Sonda: CACCTGTTGCAACTCCATACTTTTGTAG (SEQ ID NO. 7),

kde Y je vybráno ze skupiny sestávající z C nebo T a hybridizační sonda je vhodně označena pro její detekci v průběhu PCR reakce.

20 Výše uvedené sady primerů a sond jsou vhodné pro současnou nebo individuální kvalitativní nebo kvantitativní detekci virů LChV-1 a LChV-2 v biologickém materiálu s vysokou specificitou metodou založenou na metodě PCR. Metodou PCR se rozumí klasické uspořádání PCR reakce s detekcí ampliconů pomocí gelové elektroforézy nebo digitální PCR nebo real-time PCR využívající k detekci interkalační barviva nebo různě značené hybridizační sondy podle vynálezu
 25 a další varianty metody PCR známé odborníkovi v oboru. Ve výhodném provedení vynálezu je PCR produkt detekován v reálném čase pomocí real-time PCR, a ještě výhodněji pomocí značených hybridizačních sond. V jedné PCR reakci je tak možné stanovit konkrétní virus, který je zodpovědný za vznik onemocnění.

30 Hybridizační sondy mohou být pro účely jejich detekce značeny fluorescenčně, radioaktivně, neradioaktivně nebo dalšími způsoby známými odborníkovi v oboru. Ve výhodném provedení vynálezu jsou hybridizační sondy pro detekci jednotlivých virů značeny fluorescenčně, a ještě výhodněji pomocí odlišných fluoroforů pro jejich současnou detekci v jedné PCR reakci.

35 Návrh sad primerů a hybridizačních sond podle vynálezu pro detekci virů LChV-1 a LChV-2 byl proveden v několika krocích: 1) Analýza sekvencí dostupných izolátů těchto virů; 2) Porovnání specificity detekce těchto izolátů s primery z dosavadního stavu techniky; 3) Návrh sad primerů a hybridizačních sond pro detekci virů LChV-1 a LChV-2.

40 Detekce virů LChV-1 a LChV-2 může být dle provedení vynálezu provedena v jakémkoliv rostlinném materiálu, s výhodou je rostlinný materiál floém a parenchymatické buňky.

45 Prvním krokem detekce virů LChV-1 a LChV-2 způsobujících maloplodost třešní v rostlinném materiálu je izolace celkové RNA a její přepis na cDNA pomocí RNA-dependentní DNA polymerázy a sady náhodných primerů metodami známými v oboru.

Vytvořená cDNA je následně analyzována na přítomnost nukleové kyseliny virů LChV-1 a LChV-2 metodou PCR sadami primerů a hybridizačních sond podle vynálezu.

50 Příklady provedení vynálezu jsou zde uvedeny pouze pro ilustraci a žádným způsobem neomezují rozsah této přihlášky. Odborník v oboru bude schopen učinit různé modifikace uvedených primerů, hybridizačních sond a použitého způsobu PCR detekce, které budou spadat do rozsahu této přihlášky. Ta je vymezena připojenými patentovými nároky a podrobně popsána v popisu vynálezu.

55

Příklady uskutečnění vynálezu

Příklad 1: Návrh sekvencí primerů a sond

5

Sekvence různých izolátů virů LChV-1 a LChV-2 byly získány z databáze sekvencí GenBank. Pro analýzu variability sekvencí byla použita metoda multiple alignment v programu ClustalW. Specificita primerů dle dosavadního stavu techniky byla stanovena jejich namapováním na uspořádané sekvence a zhodnocením konzervovanosti cílových úseků. Pro navržení sad primerů a hybridizačních sond byly použity konzervované oblasti genomu virů vykazující nejvyšší sekvenční homologii napříč všemi izoláty. Primery a hybridizační sondy byly navrženy pomocí programu Vector NTI Advance.

15 Příklad 2: Simplexová kvalitativní detekce viru LChV-1 v biologickém materiálu metodou PCR v klasickém uspořádání

Pro detekci viru LChV-1 byla z infikovaných rostlin izolována celková RNA pomocí soupravy Ribospin™ Plant (GeneAll). Izolovaná RNA byla použita pro přípravu cDNA s využitím náhodných primerů (Roche) a M-MLV Reverse Transcriptase (Invitrogen). Připravená cDNA byla
20 použita jako templát pro PCR reakci s následujícími reakčními podmínkami: 2 µl cDNA; 1x PCR Blue reakční pufr (Top-Bio); 2,5mM MgC₂; 200µM dNTP každý; 1 U Combi Taq DNA polymeráza (Top-Bio); 500nM primery každý. V reakci byly použity tyto primery:

25 Forward primer: GCYACTGATACTGATACGTCTAGCTCG (SEQ ID NO. 1),
Reverse primer 1: TTTCTCCTACCGCGACGTGG (SEQ ID NO. 2),
Reverse primer 2: CTAATTTCTTCTACCTCGACGTGG (SEQ ID NO. 3),

kde Y je vybráno ze skupiny sestávající z C nebo T.

30 PCR amplifikace probíhala v PCR cykleru C1000 (Biorad) s následujícím teplotním profilem: 94 °C/5 minut; cyklování 94 °C/20 s, 58 °C/20 s, 72 °C/20 s.

Po ukončení reakce byly výsledné PCR amplikony analyzovány elektroforeticky na 3% agarózovém gelu. U pozitivních vzorků na přítomnost viru LChV-1 byl identifikován proužek o velikosti 84 bp.
35

Pozitivní nálezy získané pomocí PCR byly ověřeny přímým sekvenováním PCR amplikonů a porovnáním jejich sekvence s databází sekvencí. Ve všech případech byl potvrzen výskyt viru LChV-1.
40

Příklad 3: Simplexová kvalitativní a kvantitativní detekce viru LChV-1 v biologickém materiálu metodou real-time PCR

45 Pro detekci viru LChV-1 byla z infikovaných rostlin izolována celková RNA pomocí soupravy Ribospin™ Plant (GeneAll). Izolovaná RNA byla použita pro přípravu cDNA s využitím náhodných primerů (Roche) a M-MLV Reverse Transcriptase (Invitrogen). Připravená cDNA byla použita jako templát pro real-time PCR reakci.

Ve výhodném provedení vynálezu je pro real-time PCR detekci viru LChV-1 použito interkalační barvivo s následujícími reakčními podmínkami: 2 µl cDNA; 1x PCR Blue reakční pufr (Top-Bio); 2,5mM MgCl₂; 20µM dNTP každý; 1 U Combi Taq DNA polymeráza (Top-Bio); 500nM primery každý; 1x EvaGreen (Biotium). V reakci byly použity tyto primery:

55 Forward primer: GCYACTGATACTGATACGTCTAGCTCG (SEQ ID NO. 1)
Reverse primer 1: TTTCTCCTACCGCGACGTGG (SEQ ID NO. 2)

Reverse primer 2: CTAATTTCTTCTACCTCGACGTGG (SEQ ID NO. 3),

kde Y je vybráno ze skupiny sestávající z C nebo T.

- 5 Real-time PCR reakce probíhala v zařízení Rotor-Gene Q (Qiagen) s následujícím teplotním profilem: 94 °C/5 minut; cyklování 94 °C/20 s, 58 °C/20 s, 72 °C/20 s, s odečtem fluorescence v HRM kanálu.

- 10 Pozitivní nálezy získané pomocí real-time PCR byly ověřeny melting analýzou s určením charakteristické křivky tání specifických PCR amplikonů a přímým sekvenováním PCR amplikonů a porovnáním jejich sekvence s databází sekvencí. Ve všech případech byl potvrzen výskyt viru LChV-1.

- 15 V ještě výhodnějším provedení vynálezu je pro real-time PCR detekci viru LChV-1 použito fluorescenčně značené hybridizační sondy s následujícími reakčními podmínkami: 2 µl cDNA; 1x PCR Blue reakční pufr (Top-Bio); 2,5 mM MgCl₂; 200µM dNTP každý; 1 U Combi Taq DNA polymeráza (Top-Bio); 500nM primery každý; 400nM sonda. V reakci byly použity tyto primery a sonda:

- 20 Forward primer: GCYACTGATACTGATACGTCTAGCTCG (SEQ ID NO. 1),
Reverse primer 1: TTTCTCCTACCGCGACGTGG (SEQ ID NO. 2),
Reverse primer 2: CTAATTTCTTCTACCTCGACGTGG (SEQ ID NO. 3),
Sonda: AATACTTGCGAAACATGAAGAGCTCC (SEQ ID NO. 4),

- 25 kde Y je vybráno ze skupiny sestávající z C nebo T.

Real-time PCR reakce probíhala v zařízení Rotor-Gene Q (Qiagen) s následujícím teplotním profilem: 94 °C/5 minut; cyklování 94 °C/20 s, 58 °C/20 s, 72 °C/20 s, s odečtem fluorescence v příslušném kanálu podle typu značení sondy.

- 30 Pozitivní nálezy získané pomocí real-time PCR byly ověřeny přímým sekvenováním PCR amplikonů a porovnáním s databází sekvencí. Ve všech případech byl potvrzen výskyt viru LChV-1.

- 35 Ve výhodném provedení vynálezu byla přítomnost viru LChV-1 stanovena kvantitativně. Do real-time PCR běhu byly přidány čtyři standardy LChV-1 o známé koncentraci v desítkovém ředění pro sestavení kalibrační křivky. Kalibrační křivka byla u pozitivních vzorků použita pro stanovení koncentrace viru LChV-1 ve vzorku.

- 40 Příklad 4: Simplexová kvalitativní detekce viru LChV-2 v biologickém materiálu metodou PCR v klasickém uspořádání

- 45 Pro detekci viru LChV-2 byla z infikovaných rostlin izolována celková RNA pomocí soupravy Ribospin™ Plant (GeneAll). Izolovaná RNA byla použita pro přípravu cDNA s využitím náhodných primerů (Roche) a M-MLV Reverse Transcriptase (Invitrogen). Připravená cDNA byla použita jako templát pro PCR reakci s následujícími reakčními podmínkami: 2 µl cDNA; 1x PCR Blue reakční pufr (Top-Bio); 2,5mM MgCl₂; 200µM dNTP každý; 1 U Combi Taq DNA polymeráza (Top-Bio); 500nM primery každý. V reakci byly použity tyto primery:

- 50 Forward primer: TCTTTAAGTTGAGTTTGGAGYTGGG (SEQ ID NO. 5),
Reverse primer: CACACGCCCAACTTCGTAC (SEQ ID NO. 6),

kde Y je vybráno ze skupiny sestávající z C nebo T.

PCR amplifikace probíhala v PCR cyklem C1000 (Biorad) s následujícím teplotním profilem: 94 °C/5 minut; cyklování 94 °C/20 s, 58 °C/20 s, 72 °C/20 s.

5 Po ukončení reakce byly výsledné PCR amplikony analyzovány elektroforeticky na 3% agarózovém gelu. U pozitivních vzorků na přítomnost viru LChV-2 byl identifikován proužek o velikosti 149 bp.

10 Pozitivní nálezy získané pomocí PCR byly ověřeny přímým sekvenováním PCR amplikonů a porovnáním jejich sekvence s databází sekvencí. Ve všech případech byl potvrzen výskyt viru LChV-2.

Příklad 5: Simplexová kvalitativní a kvantitativní detekce viru LChV-2 v biologickém materiálu metodou real-time PCR

15 Pro detekci viru LChV-2 byla z infikovaných rostlin izolována celková RNA pomocí soupravy Ribospin™ Plant (GeneAll). Izolovaná RNA byla použita pro přípravu cDNA s využitím náhodných primerů (Roche) a M-MLV Reverse Transcriptase (Invitrogen). Připravená cDNA byla použita jako templát pro real-time PCR reakci.

20 Ve výhodném provedení vynálezu je pro real-time PCR detekci viru LChV-2 použito interkalační barvivo s následujícími reakčními podmínkami: 2 µl cDNA; 1x PCR Blue reakční pufr (Top-Bio); 2,5mM MgCl₂; 200µM dNTP každý; 1 U Combi Taq DNA polymeráza (Top-Bio); 500nM primery každý; 1x EvaGreen (Biotium). V reakci byly použity tyto primery:

25 Forward primer: TCTTTAAGTTGAGTTTGGAGYTGGG (SEQ ID NO. 5),
Reverse primer: CACACGCCCAACTTCGTCAC (SEQ ID NO. 6),

kde Y je vybráno ze skupiny sestávající z C nebo T.

30 Real-time PCR reakce probíhala v zařízení Rotor-Gene Q (Qiagen) s následujícím teplotním profilem: 94 °C/5 minut; cyklování 94 °C/20 s, 58 °C/20 s, 72 °C/20 s, s odečtem fluorescence v HRM kanálu.

35 Pozitivní nálezy získané pomocí real-time PCR byly ověřeny melting analýzou s určením charakteristické křivky tání specifických PCR amplikonů a přímým sekvenováním PCR amplikonů a porovnáním jejich sekvence s databází sekvencí. Ve všech případech byl potvrzen výskyt viru LChV-2.

40 V ještě výhodnějším provedení vynálezu je pro real-time PCR detekci viru LChV-2 použito fluorescenčně značené hybridizační sondy s následujícími reakčními podmínkami: 2 µl cDNA; 1x PCR Blue reakční pufr (Top-Bio); 2,5mM MgCl₂; 200µM dNTP každý; 1 U Combi Taq DNA polymeráza (Top-Bio); 500nM primery každý; 400nM sonda. V reakci byly použity tyto primery a sonda:

45 Forward primer: TCTTTAAGTTGAGTTTGGAGYTGGG (SEQ ID NO. 5),
Reverse primer: CACACGCCCAACTTCGTCAC (SEQ ID NO. 6),
Sonda: CACCTGTTGCAACTCCATACTTTTGTAG (SEQ ID NO. 7),

kde Y je vybráno ze skupiny sestávající z C nebo T.

50 Real-time PCR reakce probíhala v zařízení Rotor-Gene Q (Qiagen) s následujícím teplotním profilem: 94 °C/5 minut; cyklování 94 °C/20 s, 58 °C/20 s, 72 °C/20 s, s odečtem fluorescence v příslušném kanálu podle typu značení sondy.

55

Pozitivní nálezy získané pomocí real-time PCR byly ověřeny přímým sekvenováním PCR amplikonů a porovnáním s databází sekvencí. Ve všech případech byl potvrzen výskyt viru LChV-2.

- 5 Ve výhodném provedení vynálezu byla přítomnost viru LChV-2 stanovena kvantitativně. Do real-time PCR běhu byly přidány čtyři standardy LChV-2 o známé koncentraci v desítkovém ředění pro sestavení kalibrační křivky. Kalibrační křivka byla u pozitivních vzorků použita pro stanovení koncentrace viru LChV-2 ve vzorku.

- 10 **Příklad 6: Multiplexová kvalitativní detekce virů LChV-1 a/nebo LChV-2 v biologickém materiálu metodou PCR v klasickém uspořádání**

Pro detekci viru LChV-1 a/nebo LChV-2 byla z infikovaných rostlin izolována celková RNA pomocí soupravy Ribospin™ Plant (GeneAll). Izolovaná RNA byla použita pro přípravu cDNA s využitím náhodných primerů (Roche) a M-MLV Reverse Transcriptase (Invitrogen). Připravená cDNA byla použita jako templát pro PCR reakci s následujícími reakčními podmínkami: 2 µl cDNA; 1x PCR Blue reakční pufr (Top-Bio); 2,5mM MgCl₂; 200µM dNTP každý; 1 U Combi Taq DNA polymeráza (Top-Bio); 500nM primery každý. V reakci byly použity tyto primery:

- 20 Forward primer 1: GCYACTGATACTGATACGTCTAGCTCG (SEQ ID NO. 1),
 Forward primer 2: TCTTTAAGTTGAGTTTGGAGYTG (SEQ ID NO. 5),
 Reverse primer 1: TTTCTCTACCGCGACGTGG (SEQ ID NO. 2),
 Reverse primer 2: CTAATTTCTTCTACCTCGACGTGG (SEQ ID NO. 3),
 Reverse primer 3: CACACGCCCCAACTTCGTCAC (SEQ ID NO. 6),

25 kde Y je vybráno ze skupiny sestávající z C nebo T.

PCR amplifikace probíhala v PCR cyklu C1000 (Biorad) s následujícím teplotním profilem: 94 °C/5 minut; cyklování 94 °C/20 s, 58 °C/20 s, 72 °C/20 s.

30 Po ukončení reakce byly výsledné PCR amplikony analyzovány elektroforeticky na 3% agarózovém gelu. U vzorků pozitivních na přítomnost viru LChV-1 byl identifikován proužek o velikosti 84 bp; u vzorků pozitivních na přítomnost viru LChV-2 byl identifikován proužek o velikosti 149 bp; u dvojitě pozitivních vzorků na přítomnost virů LChV-1 a LChV-2 byly

35 identifikovány oba příslušné proužky.

Pozitivní nálezy získané pomocí PCR v tomto uspořádání byly porovnány s výsledky ze simplexových detekcí viru LChV-1 a LChV-2, které již byly sekvenačně ověřeny. Ve všech případech nálezy ze současné detekce obou virů v jedné PCR reakci souhlasily s výsledky ze simplexových reakcí.

40

Příklad 7: Simplexová kvalitativní a kvantitativní detekce viru LChV-1 a/nebo LChV-2 v biologickém materiálu metodou real-time PCR

45 Pro detekci virů LChV-1 a/nebo LChV-2 byla z infikovaných rostlin izolována celková RNA pomocí soupravy Ribospin™ Plant (GeneAll). Izolovaná RNA byla použita pro přípravu cDNA s využitím náhodných primerů (Roche) a M-MLV Reverse Transcriptase (Invitrogen). Připravená cDNA byla použita jako templát pro real-time PCR reakci.

50 Ve výhodném provedení vynálezu je pro real-time PCR detekci virů LChV-1 a/nebo LChV-2 použito odlišně fluorescenčně značených hybridizačních sond specifických pro příslušný virus s následujícími reakčními podmínkami: 2 µl cDNA; 1x PCR Blue reakční pufr (Top-Bio); 2,5mM MgCl₂; 200µM dNTP každý; 1 U Combi Taq DNA polymeráza (Top-Bio); 500nM primery každý; 400nM každá sonda. V reakci byly použity tyto primery a sondy:

55

Forward primer 1: GCYACTGATACTGATACGTCTAGCTCG (SEQ ID NO. 1),
 Forward primer 2: TCTTTAAGTTGAGTTTGGAGYTGGG (SEQ ID NO. 5),
 Reverse primer 1: TTTCTCCTACCGCGACGTGG (SEQ ID NO. 2),
 Reverse primer 2: CTAATTTCTTCTACCTCGACGTGG (SEQ ID NO. 3),
 5 Reverse primer 3: CACACGCCCCAACTTCGTCAC (SEQ ID NO. 6),
 Sonda 1: AATACTTGCGAAACATGAAGAGCTCC (SEQ ID NO. 4),
 Sonda 2: CACCTGTTGCAACTCCATACTTTTGTAG (SEQ ID NO. 7),

kde Y je vybráno ze skupiny sestávající z C nebo T.

10 Real-time PCR reakce probíhala v zařízení Rotor-Gene Q (Qiagen) s následujícím teplotním profilem: 94 °C/5 minut; cyklování 94 °C/20 s, 58 °C/20 s, 72 °C/20 s, s odečtem fluorescence v příslušném kanálu podle typu značení sondy.

15 Pozitivní nálezy získané pomocí PCR v tomto uspořádání byly porovnány s výsledky ze simplexových detekcí viru LChV-1 a LChV-2, které již byly sekvenčně ověřeny. Ve všech případech nálezy ze současné detekce obou virů v jedné PCR reakci souhlasily s výsledky ze simplexových reakcí.

20 Ve výhodném provedení vynálezu byla přítomnost virů LChV-1 a/nebo LChV-2 stanovena kvantitativně. Do real-time PCR běhu byly přidány čtyři standardy LChV-1 a LChV-2 o známé koncentraci v desítkovém ředění pro sestavení kalibrační křivky. Koncentrace virů LChV-1 a LChV-2 u pozitivních vzorků byla stanovena podle příslušné kalibrační křivky.

25 Průmyslová využitelnost

Nové sady primerů a hybridizačních sond pro detekci viru LChV-1 a LChV-2 v biologickém materiálu metodou PCR oproti dosavadnímu stavu techniky odstraňují problém falešně negativních
 30 vzorků, kdy primery dle dosavadního stavu techniky nemusí umožňovat detekci všech známých izolátů těchto virů. Dále byly navrženy primery a hybridizační sondy optimalizovány pro použití v sadě pro současnou detekci obou virů v jedné PCR reakci. Nové sady primerů a hybridizačních sond tedy zrychlují, zpřesňují a zlevňují diagnostiku onemocnění maloplodost třešní, které je způsobeno viry LChV-1 a LChV-2.

35 Seznam použité literatury

Bajet, N.B., Unruh, T.R., Druffel, K.L. et al., Occurrence of Two Little Cherry Viruses in Sweet Cherry in Washington State. *Plant Dis.* (2008) 92:234-238.

40 Candresse, T., Marais, A., Faure, C. et al. Association of Little cherry virus 1 (LChV1) with the Shirofugen Stunt Disease and characterization of the genome of a divergent LChV1 isolate. *Phytopathology* (2013) 103(3):293-298.

Eastwell, K.C., Bernardy, M.G. Association of high molecular weight double-stranded RNA with little cherry disease. *Canadian Journal of Plant Pathology* (1996) 18(3):203-208.

45 Glasa, M., Benediková, D., Predajňa, L. First report of Little cherry virus-1 in Slovakia. *Journal of Plant Pathology* (2015) 97(3):542.

Jelkmann, W., Leible, S. and Rott, M. Little cherry closteroviruses-1 and -2, their genetic variability and detection by real-time-PCR. *Acta Hort. (ISHS)* (2008) 781:321-330.

50 Katsiani, A. T., Maliogka, V. I., Amoutzias, G. D. et al. Insights into the genetic diversity and evolution of Little cherry virus 1. *Plant Pathology* (2015) 64(4):817-824.

Osman, F., Al Rwahnih, M., Golino, D. et al. Evaluation of the phytosanitary status of the prunus species in the national clonal germplasm repository in California: survey of viruses and viroids. *Journal of Plant Pathology* (2015) 94(1):249-253.

55 Rao, W.-L., Li, F., Zuo, R.-J. First report of Little cherry virus 2 in flowering and aweet cherry trees in China. *Plant Disease* (2011) 95(11):1484.

- Rott, M.E., Jelkmann W. Detection and partial characterization of a second closterovirus associated with Little Cherry Disease, Little cherry virus-2. *Phytopathology* (2001) 91(3):261-267.
- Ruiz-García, A.B., Martínez, C, Santiago, R. et al. First report of Little cherry virus 1 (LChV-1) in sweet cherry in Spain. *Plant Disease* (2016) 100(11):2340.
- 5 Vitushkina, M., Fechtner, B., Agranovsky, A. et al. Development of an RT-PCR for the detection of little cherry virus and characterization of some isolates occurring in Europe. *European Journal of Plant Pathology* (1997) 103(9): 803-808.
- Zong, X., Wang, W., Wei, H. et al. A multiplex RT-PCR assay for simultaneous detection of four viruses from sweet cherry. *Scientia Horticulturae* (2014) 187:118-122.
- 10 Zong, X., Wang, W., Wei, H. et al. Incidence of sweet cherry viruses in shandong province, china and a case study on multiple infection with five viruses. *Journal of Plant Pathology* (2015) 97(1):61-68.

PATENTOVÉ NÁROKY

1. Sada primerů a sond pro současnou PCR detekci virů LChV-1 a LChV-2 v biologickém
5 materiálu obsahující primery a značené hybridizační sondy, **vyznačující se tím**, že obsahuje primery a značené hybridizační sondy, jejichž sekvence jsou:

Forward primer 1: GCYACTGATACTGATACGTCTAGCTCG SEQ ID NO. 1,
Forward primer 2: TCTTTAAGTTGAGTTTGGAGYTGGG SEQ ID NO. 5,
10 Reverse primer 1: TTTCTCCTACCGCGACGTGG SEQ ID NO. 2,
Reverse primer 2: CTAATTTCTTCTACCTCGACGTGG SEQ ID NO. 3,
Reverse primer 3: CACACGCCCCAACTTCGTCAC SEQ ID NO. 6,
Sonda 1: AATACTTGCGAAACATGAAGAGCTCC SEQ ID NO. 4,
Sonda 2: CACCTGTTGCAACTCCATACTTTTGTAG SEQ ID NO. 7,

15 kde Y je vybráno ze skupiny sestávající z C nebo T,

příčemž pro PCR detekci viru LChV-1 obsahuje tato sada primery a značenou hybridizační sondu,
20 jejichž sekvence jsou

Forward primer 1: GCYACTGATACTGATACGTCTAGCTCG SEQ ID NO. 1,
Reverse primer 1: TTTCTCCTACCGCGACGTGG SEQ ID NO. 2,
Reverse primer 2: CTAATTTCTTCTACCTCGACGTGG SEQ ID NO. 3,
Sonda 1: AATACTTGCGAAACATGAAGAGCTCC SEQ ID NO. 4,

25 a pro PCR detekci viru LChV-2 obsahuje tato sada primery a značenou hybridizační sondu, jejichž sekvence jsou

Forward primer 2: TCTTTAAGTTGAGTTTGGAGYTGGG SEQ ID NO. 5,
30 Reverse primer 3: CACACGCCCCAACTTCGTCACJ SEQ ID NO. 6,
Sonda 2: CACCTGTTGCAACTCCATACTTTTGTAG SEQ ID NO. 7.