

# PATENTOVÝ SPIS

(19)  
ČESKÁ  
REPUBLIKA



ÚŘAD  
PRUMYSLOVÉHO  
VLASTNICTVÍ

(21) Číslo přihlášky: **2011-274**  
(22) Přihlášeno: **10.05.2011**  
(40) Zveřejněno: **09.05.2012**  
**(Věstník č. 19/2012)**  
(47) Uděleno: **29.03.2012**  
(24) Oznámení o udělení ve Věstníku: **09.05.2012**  
**(Věstník č. 19/2012)**

(11) Číslo dokumentu:

## 303 166

(13) Druh dokumentu: **B6**

(51) Int. Cl.:  
*A01N 43/48* (2006.01)  
*A01N 57/16* (2006.01)

(56) Relevantní dokumenty:

WO 2012/016048 A; WO 2008/06249 A.

Falah, M., Mozafari, J., Sokhandan Bashir, N. and Hashemi, M. 2009. ELIMINATION OF A DNA VIRUS ASSOCIATED WITH YELLOW LEAF CURL DISEASE IN TOMATO USING AN ELECTROTHERAPY TECHNIQUE. Acta Hort. (ISHS) 808:157-162; Helliot B. et al., Antiviral Res. 2003 08; 59(2):121-6; Plant Pathology Unit, BE; "The acyclic nucleoside phosphonate analogues, adefovir, tenofovir and PMEDAP, efficiently eliminate banana streak virus from banana (Musa spp.).

(73) Majitel patentu:

Ústav organické chemie a biochemie Akademie věd ČR,  
v.v.i., Praha 6, CZ  
Biologické centrum Akademie věd ČR, v.v.i., České  
Budějovice, CZ

(72) Původce:

Špak Josef Prof. Ing. DrSc., Dubné, CZ  
Pavingerová Daniela Mgr. CSc., Lednice, CZ  
Špaková Vlastimila RNDr., Dubné, CZ  
Petřík Karel Doc. RNDr. CSc., České Budějovice, CZ  
Votruba Ivan RNDr. DrSc., Praha 8, CZ  
Holý Antonín Prof. RNDr. DrSc. Dr. hc.mult., Praha -  
Horní Počernice, CZ

(74) Zástupce:

RNDr. Ladislava Součková CSc., Flemingovo náměstí  
542/2, Praha 6, 16610

(54) Název vynálezu:

**Použití acyklického nukleosidfosfonátu,  
tenofoviru, k eliminaci rostlinných ssDNA virů**

(57) Anotace:

Použití acyklického nukleosidfosfonátu, tenofoviru, chemickým názvem 9-[(R)-2-(fosfonomethoxy)propyl]adeninu, k eliminaci jednovláknových, tedy ssDNA rostlinných virů z rostlin a jejich částí, včetně naklíčených semen. Dále je navrženo použití tenofoviru jako účinné látky pro výrobu prostředku, který nadto zahrnuje vodný diluent a/nebo růstové médium obsahující vitamíny, sacharózu, minerální prvky, růstové hormony, zahušťovací látky a pomocné látky usnadňující průnik účinné látky do rostlinných pletiv, přičemž je aplikován formou přidavku do živných médií in vitro, a/nebo přidavku do hydroponického roztoku, postřiku, injekce či závlivky do půdy, popřípadě jako roztok k infiltraci listů a naklíčených semen. Popsán je i agrochemický prostředek pro eliminaci ssDNA rostlinných virů z rostlin a jejich částí včetně naklíčených semen, který obsahuje acyklický nukleosidfosfonát, 9-[(R)-2-(fosfonomethoxy)propyl]adenin, diluent a pomocné látky.

CZ 303166 B6

## Použití acyklického nukleosidfosfonátu, tenofoviru, k eliminaci rostlinných ssDNA virů

### Oblast techniky

5

Vynález se týká použití tenofoviru, (R)-PMPA, ve formě přísady do živných médií *in vitro*, popřípadě do postřiku, injekce či závlaky do půdy, k eliminaci jednovláknových, tedy ssDNA rostlinných virů z rostlin a jejich částí a také prostředku s obsahem této účinné látky.

10

### Dosavadní stav techniky

Chemoterapie rostlinných virů se již s úspěchem využívá k eliminaci DNA virů z vegetativně se množících plodin, přirozeně infikovaných viry a citlivých vůči termoterapii. Tato metoda byla popsána například u ovocných stromů (James, Julius Kuhn Archiv, 427, 47, 2010), vinné révy (Panattoni se spol., J. Virol. Methods 146, 129, 2007), brambor (Faccioli a Colombarini, Potato research 39, 129, 1996; Awan se spol., Eur. J. Sci. Res. 18, 155, 2007) a okrasných rostlin (Verma se spol., Sci. Hortic. 103, 239, 2005). Založena je na odebrání meristemické tkáně špičky rostliny (kde nejsou buňky napadeny virem) a její kultivace *in vitro* v médiích doplněných antivirovou sloučeninou, často v sériích 3 až 5 pasáží. Úspěch při eliminaci viru je ověřen pomocí testů ELISA nebo PCR, opakovaných po měsících nebo i po několika letech (Verma, viz výše) k potvrzení toho, že rostlinný materiál neobsahuje virové částice.

Z mnoha testovaných antivirových sloučenin, shrnutých Hansenem (Critical Rev. Plant Sci. 8, 45, 1989) se ribavirin ukázal jako nejúčinnější vůči RNA rostlinným virům, které představují přibližně 75 % všech známých virů, napadajících rostliny (Büchen-Osmond, ICTVdB - The Universal Virus Database, ICTVdB Management, Mailman School of Public Health, Columbia University, NY, USA). Naproti tomu je jen velmi málo literárních údajů o použití antivirových sloučenin vůči rostlinným DNA virům (Helliot se spol., Antiviral Res. 59, 121, 2003; Caner se spol., Agr. Inst. Biol., Sao Paulo, 52, 39, 1985; Green a spol., Plant Protect. Bull. (Taiwan) 34, 1, 1992).

Počet známých rostlinných virů typu ssDNA, tedy s jednovláknovou DNA, rychle narůstá. Podle ICTV 2009 taxonomie (viz <http://www.ictvonline.org/>) čeleď *Geminiviridae* zahrnuje 4 rody (*Begomovirus*, *Curtovirus*, *Mastrevirus*, *Topocuvirus*) obsahující 196, 7 a 14 druhů, respektive 1 druh. Begomoviry jsou rozšířeny celosvětově a působí značné škody na ekonomicky důležitých plodinách.

Onemocnění žlutá kadeřavost listů rajčete (tomato yellow leaf curl disease - TYLCD), je jednou z nejničivějších celosvětově rozšířených chorob rajčat (*Solanum lycopersicum* L.) (Navas-Castillo a spol., J. Gen. Virol. 81, 2797, 2000). Původce nemoci přenáší molice Bemisia tabaci a příznakem je zakrslost, žloutnutí a zkroucení okrajů listů. Pokud se infekce projeví v časném stádiu růstu, dojde k zakrnění květů a až 100 % snížení výnosu. Dosud bylo popsáno nejméně jedenáct různých druhů *Begomovirů* (včetně hlavního *Tomato yellow leafcurl virus* - TYLCV, viru žluté kadeřavosti listů rajčete) asociovaných s TYLCD, přičemž v přírodních epidemiích jsou směsné infekce velmi časté.

Existence směsných infekcí je ovšem pozorně sledována, neboť tyto jsou nezbytným předpokladem možné rekombinace, která je u čeledi *Geminiviridae* častým jevem s nepředvídatelnými patologickými následky (Garcia-Andrés a spol., Virus Research 146, 66, 2009). Jasný důkaz vývoje rekombinantů v průběhu směsné begomovirové infekce jednotlivých rostlin byl popsán Garciou-Andrésem a spoluautory (Virology 365, 210, 2007). Vzhledem k této skutečnosti je jen velmi obtížně využitelný nejvhodnější prostředek ochrany proti této chorobě, tedy odolnost hostitelských rostlin vůči viru (Garcia-Andrés a spol. 2009). Je proto neobyčejně žádoucí nalézt

sloučeninu s antivirovou aktivitou vůči TYLCV (či obecně geminivirům typu ssDNA), umožňující získ bezvirových genových zdrojů a viruprostého rozmnožovacího materiálu rostlin.

5 Testování nově syntetizovaných i osvědčených humánních a veterinárních antivirových léčiv může přinést pokrok v chemoterapii fytovirů, nicméně jejich účinek vůči rostlinným DNA virům může být značně odlišný. Jako možné účinné látky jsou uvažovány i acyklické nukleosidy, stejně jako mnohé analogy nukleotidů (acyklické nukleosidfosfonáty, ANP). Tenofovir, tj. 9-[(R)-2(fosfonomethoxy)propyl]adenin, (R)-PMPA se používá jako účinná látka v léčivech, založených na principu takzvaných antimetabolitů, které v buňce brání tvorbě virů. Bylo proká-  
10 záno, že difosfát tenofoviru, vzniklý intracelulární fosforylací této účinné látky, je účinným inhibi-  
torem reverzní transkriptázy (Suo a Johnson, J. Biol. Chem. 273, 27250, 1998), ne však inhibi-  
torem DNA polymeráz (Birkuš se spol., Antimicrob. Agents Chemother. 46, 1610, 2002).  
Účinky acyklických analogů nukleosidfosfonátů, tj. tenofoviru, adefoviru a PMEDAP  
15 [9-(2-fosfonomethoxyethyl)-2,6-diaminopurin] byly dosud popsány pouze u rostlinných  
dsDNA virů (dvojvláknové DNA viry) (Helliot a spol. Antiviral Research 59, 121, 2003; Špak a  
spol., 2010 a nezveřejněné výsledky).

Použití antivirových přípravků vůči ssDNA virům (jednovláknovým) bylo zatím popsáno jen  
zřídka a některé výsledky si dokonce odporují. Green se spol. popsali úspěšnou eliminaci viru  
20 kadeřavosti listů batátů (*Ipomoea batatas*) (*Sweet potato leafcurl virus* - SPLCV) aplikací ribavi-  
rinu a použitím meristemické tkáně špičky rostliny (1992, viz výše), která byla před odebráním  
z rostliny zahřívána na 37 °C a poté kultivována za přídavku ribavirinu do kultivačního média.  
Podle výsledků jiných autorů (Caner a spol., 1985, viz výše) byl ale ribavirin při testech vůči  
jinému ssDNA geminiviru (*Bean golden mosaic virus*) neúčinný.

25 Zatímco u dsDNA virů se předpokládá, že selektivní antivirová aktivita tenofoviru na viry BSV  
(*Banana streak virus*, virus čárkovitosti banánovníku) či CaMV (*Cauliflower mosaic virus*, virus  
žilkové mozaiky kvěťáku) je vyvolána inhibicí aktivity reverzní transkriptázy, u ssDNA virů (a  
tedy i geminivirů) nelze takový mechanismus účinku předpokládat. Geminiviry se replikují  
30 uvnitř jádra infikované hostitelské buňky. Prvním krokem jejich zmožení je konverze virové  
ssDNA na dsDNA replikační meziproduct, podporovaná výhradně faktory, kódovanými  
hostitelskou buňkou. Poté virové faktory spolu s buněčnými faktory syntetizují za využití ds  
templátu ssDNA. Geminiviry kódují pouze jediný virový protein (Rep) nutný k jejich replikaci a  
změně buněčného cyklu z klidového stavu do stádia syntézy DNA. Tento Rep protein nesdílí  
35 homologii s žádnou dosud známou DNA polymerázou, je příbuzný s proteiny, účastnicími se  
iniciace DNA replikace ssDNA bakteriálních plazmidů (Illyina a Koonin, 1992).

Z výše popsaného je zřejmé, že z dosud známých skutečností není možné předpokládat účinek  
40 tenofoviru na rostlinné ssDNA viry, které působí značné škody u rostlin; zejména pak u rajčat ve  
všech evropských středomořských zemích.

#### Podstata vynálezu

45 Předkládaný vynález prokázal překvapivou možnost využití acyklického nukleosidfosfonátu,  
tenofoviru, rovněž proti rostlinným ssDNA virům. Poprvé byla prokázána účinnost tenofoviru  
na ssDNA virus TYLCV (virus žluté kadeřavosti listů rajčete) v rostlinách rajčat, pěstovaných v  
polopevném médiu *in vitro*. Potvrzena byla relativní kvantifikací virového proteinu a nukleových  
kyselin v rostlinách za použití metody sendvičového testu ELISA (enzyme linked immuno-  
50 sorbent assay, enzymové imunoabsorpční stanovení) a PCR (polymerase chain reaction, polyme-  
rázová řetězová reakce).

Podstatou vynálezu je použití acyklického nukleosidfosfonátu, 9-[(R)-2-(fosfonomethoxy)-propyl]adeninu, k eliminaci jednovláknových, tj. ssDNA rostlinných virů z rostlin a jejich částí, včetně naklíčených semen.

5 Dále je podstatou tohoto vynálezu i použití acyklického nukleosidfosfonátu, 9-[(R)-2-(fosfonomethoxy)propyl]adeninu, jako účinné látky pro výrobu prostředku k eliminaci jednovláknových, tedy ssDNA rostlinných virů z rostlin a jejich částí, včetně naklíčených semen.

10 Podstatou vynálezu je i použití acyklického nukleosidfosfonátu, 9-[(R)-2-(fosfonomethoxy)-propyl]adeninu, jako účinné látky pro výrobu prostředku k eliminaci jednovláknových, tedy ssDNA rostlinných virů z rostlin a jejich částí, včetně naklíčených semen, který dále zahrnuje vodný diluent a/nebo růstové médium a běžné pomocné látky, zvolené ze skupiny, zahrnující vitamíny, sacharózu, minerální prvky, růstové hormony, zahušťovací látky a látky usnadňující průnik účinných látek do rostlinných pletiv, tzv. surfaktanty.

15 Význakem zmíněného použití je skutečnost, že acyklický nukleosidfosfonát, 9-[(R)-2-(fosfonomethoxy)propyl]adenin, je aplikován formou přídavku do živných médií *in vitro*, a/nebo přídavku do hydroponického roztoku, postřiku, injikace či zálivky do půdy, popřípadě jako roztok k infiltraci listů a naklíčených semen.

20 Dalším význakem uvedeného použití je i skutečnost, že 9-[(R)-2-(fosfonomethoxy)-propyl]adenin je aplikován v rozmezí koncentrací od 1,25 do 100 mg/l média, hydroponického roztoku, postřiku, injikovaného roztoku či zálivky po dobu od nejméně 3 do alespoň 18 týdnů.

25 Význakem předkládaného použití je i možnost přípravy prostředku k eliminaci ssDNA rostlinných virů jako zásobního roztoku v koncentrované formě, přičemž pro použití se ředí tak, aby bylo dosaženo koncentrace 9-[(R)-2-(fosfonomethoxy)propyl]adeninu v rozmezí od 20  $\mu$ mol do 0,4 mmol.

30 Význakem použití je dále skutečnost, že eliminovaným jednovláknovým, tedy ssDNA rostlinným virem je virus žluté kadeřavosti listů rajčete, tj. TYLCV.

Dalším význakem použití je skutečnost, že rostlinný jednovláknový DNA virus žluté kadeřavosti listů rajčete, tj. TLCV, je eliminován v rostlinách rajčete jedlého. *Solanum lycopersicum*.

35 Podstatou vynálezu je nadále i agrochemický prostředek pro eliminaci jednovláknových, tedy ssDNA rostlinných virů z rostlin a jejich částí včetně naklíčených semen, který obsahuje jako účinnou složku acyklický nukleosidfosfonát, 9-[(R)-2-(fosfonomethoxy)propyl]adenin.

40 Význakem vynálezu je také skutečnost, že uvedený agrochemický prostředek dále zahrnuje i vodný diluent a pomocné látky, zvolené ze skupiny, zahrnující vitamíny, sacharózu, minerální prvky, růstové hormony, zahušťovací látky a látky usnadňující průnik účinné látky do rostlinných pletiv.

45 Význakem vynálezu je dále to, že vodným diluentem je růstové médium, zahušťovací látkou agar a látkou usnadňující průnik účinné látky je surfaktant.

Nadto je význakem vynálezu i to, že agrochemický prostředek je aplikován formou přídavku do živného média, hydroponického roztoku, postřiku, injikace či zálivky do půdy, nebo jako roztok k infiltraci semen, popřípadě naklíčených.

50 Význakem vynálezu je i skutečnost, že agrochemický prostředek je aplikován formou poprášení rostlin, jejich částí či semen, popřípadě naklíčených.

Použitým surfaktantem může být například sloučenina na bázi ethoxylátů, jako je prostředek Spartan, propoxylát alkylaminethoxylátu (distribuce SUMI AGRO CZECH s.r.o.), který jako absorpční činidlo zvyšuje pokrývnost a přilnavost aplikační kapaliny na ošetřené rostliny, distribuci a prostoupení postřikového přípravku. Nadto zvyšuje odolnost aplikační kapaliny proti nepříznivým povětrnostním vlivům a je pro rostliny bezpečný.

#### Přehled obrázků na výkresech

Obr. 1A a 1B znázorňují účinek dvou různých koncentrací tenofoviru (25 a 12,5 mg/ml) v polo-pevném kultivačním MS médiu na koncentraci viru TYLCV v rostlinách rajčete jedlého (*Solanum lycopersicum* L.) v závislosti na době kultivace rostlin, měřený pomocí testu ELISA. Na osách x je vynesena doba kultivace rostlin v týdnech, na osách y relativní koncentrace viru v jednotkách absorbance při vlnové délce 405 nm. V obr. 1B jsou vyznačeny i hodnoty směrodatných odchylek naměřených hodnot absorbance.

Obr. 2 znázorňuje výsledek PCR stanovení, elektroforézu v 1,5 % (hm./obj.) agarózovém gelu, prokazující virovou DNA, získanou z rostlin rajčete jedlého, (*Solanum lycopersicum* L.). U rostliny č. 74, pěstované v přítomnosti 25 mg/l tenofoviru, nebyla virová DNA prokázána, tj. virus byl z rostliny eliminován. M je molekulární marker, PC je pozitivní kontrola. NC je negativní kontrola.

Obr. 3 znázorňuje účinek ribavirinu a tenofoviru v koncentracích 25 a 50 mg/ml v kapalném kultivačním MS médiu na čerstvou hmotnost rostlin rajčete jedlého (*Solanum lycopersicum* L.). Uvedené hodnoty představují průměrnou čerstvou hmotnost hypokotylu a listů včetně směrodatné odchylky po 6 týdenní kultivaci rostlin *in vitro*. Na ose x jsou vyneseny použité sloučeniny a jejich koncentrace, na ose y hmotnost v gramech.

#### Příklady provedení vynálezu

9-[(R)-2-(fosfonomethoxy)propyl]adenin, (R)-PMPA neboli tenofovir, byl syntetizován tak, jak popsal Holý se spoluautory (Coll. Czech. Chem. Commun. 54, 2190, 1989).

#### *Kultivace rostlin in vitro*

Semena rajčete *Solanum lycopersicum* L.) odrůdy MoneyMaker byla povrchově sterilizována ponořením do 10 % (obj./obj.) vodného roztoku komerčního bělidla (SAVO, Bochemie, ČR, přibližně 3 % obj. chlornan sodný) na dobu 10 minut a následně byla pětinašobně promyta sterilní vodou. Poté byla semena asepticky přemístěna do nádoby Magenta® Sigma-Aldrich (o výšce 97 mm), obsahující agarové polo-pevné médium podle Murashige a Skooga (MS médium), které zahrnovalo vitamíny (glycin o koncentraci 2,0 mg/l, myo-inositol v konc. 100 mg/l, kyselinu nikotinovou v konc. 0,5 mg/l, pyridoxin v konc. 0,5 mg/l a thiamin v konc. 0,1 mg/l) a sacharózu v koncentraci 20 g/l. Rostliny byly kultivovány v průběhu všech experimentů s fotoperiodou 16 hodin při teplotě 23 °C a intenzitě světla 90  $\mu\text{mol}\cdot\text{m}^{-2}\cdot\text{s}^{-1}$ .

#### *Očkování rostlin rajčat virem*

Pro agroinokulaci byl použit bakteriální vektor *Agrobacterium tumefaciens*, obsahující infekční klon begomoviru *Tomato yellow leaf curl virus* - Mild [Spain:72:97] (přirůstkové číslo v GenBank AF071228), (TYLC-Mld[ES:72:97]. Klon pSP72/97i byl připraven v binárním vektoru Bin19, který byl začleněn do *Agrobacterium tumefaciens* LBA4404, týmem Dr. Moriones,

Estación Experimental La Mayora, CSIC, Málaga, Španělsko (viz Navas-Castillo se spol., Plant. Dis. 83, 29, 1999). Pelet získaný z kapalně kultury *A. tumefaciens*, pěstované přes noc, byl resuspendován v 1,2 ml sterilní vody a udržován v ledové lázni až do očkování rostlin. Rostliny byly očkované metodou propíchnutí stonku. Několik kapek (přibližně 20  $\mu\text{l}$  kultury) bylo vnese-  
 5 no do rajčatových stonků propíchnutím injekční jehlou. Po této agroinokulaci byly rostliny uchovávány v růstové komoře (fotoperioda 16 hodin, teplota 23 °C a intenzita světla 90  $\mu\text{mol}\cdot\text{m}^{-2}\cdot\text{s}^{-1}$ ) v polykarbonátových kultivačních nádobách Magenta® Sigma-Aldrich. Po 3 týdnech byly rostliny podrobeny testu ELISA k ověření zmnožení viru. Virem infikované rost-  
 10 liny byly odříznuty a namnoženy v subkultuře na polopevném agarovém médiu.

#### Stanovení inhibice viru

K testování účinku tenofoviru byly vybrány rostliny infikované TYLCV, mající absorbanci při 405 nm vyšší než byla její průměrná hodnota + trojnásobek směrodatné odchylky (viz Sutula se spol., Plant. Dis. 70, 722, 1986) u neinfikovaných kontrol. Pro stanovení byly vytvořeny dvě skupiny po 20 infikovaných rostlinách s minimálními rozdíly průměrné absorbance, sloužící jako infikovaná kontrola a skupina ovlivňovaná tenofovirem. Stejně množství rostlin bylo použito i pro neinfikovanou kontrolní skupinu. Sterilní roztok tenofoviru byl rozpuštěn v polopevném MS médiu ve výsledné koncentraci 12,5 a 25 mg/ml a médium bylo filtrováno přes sterilní filtr o průměru pórů 0,22 nm (Millipore). Vzorčky listů pro následné stanovení koncentrace viru meto-  
 15 dou ELISA byly z pěstovaných rostlin odebrány v intervalu 6 týdnů (v týdnu 6, 12 a 18). Po každém odběru byl seříznut vršek rostliny a umístěn do čerstvého média. Na konci pokusu byl proveden PCR test u těch rostlin, které vykazaly nejnižší hodnoty absorbance v testu ELISA.

#### Stanovení ELISA

Inhibice viru, vyjádřená jako relativní koncentrace viru v rostlině, byla stanovena standardním dvojitým sendvičovým testem ELISA (viz Clark a Adams, J. Gen. Virol. 37, 475, 1977), za pou-  
 20 žití diagnostické sady pro TYLCV od firmy Bioreba, AG, Švýcarsko, podle instrukcí výrobce. Do destiček o 96 jamkách byl pipetován imunoglobulin G (protilátka proti viru TYLCV) v koncentraci 1  $\mu\text{g}/\text{ml}$  a inkubován 4 hodiny při teplotě 36 °C. Testované vzorky byly z rostlin odebírány v laminárním boxu. Veškeré první pravé listy byly odstříženy, zváženy a homogenizovány v extrakčních sáčcích Bioreba za použití caulimo-homogenizačního pufru Bioreba v poměru 1:10 (hmotnost/objem) a zařízení Homex (Bioreba, Švýcarsko). Po promytí destiček byly do jamek  
 35 duplicitně napipetovány vzorky a inkubovány přes noc v lednici při teplotě 4 °C. Následně po promytí destiček byly pipetovány protilátky konjugované s enzymem a destičky byly inkubovány 4 hodiny při 36 °C. Po promytí destiček byl přidán 4-nitrofenol fosfát (substrát pro enzym); po 40 minutách byla měřena absorbance vzorků při 405 nm na přístroji „Tecan Spectra Classic ELISA reader“ a vyhodnocena za použití softwaru KIM-W. Pro srovnání výsledků na jednotlivých destičkách v průběhu pokusu byly použity identické pozitivní a negativní kontrolní vzorky. Údaje o absorbanci byly hodnoceny jednosměrnou analýzou ANOVA za následného použití Tukeyova HSD testu (Tukey's Honestly Significant Differences Test) v softwaru Statistica (StatSoft Inc.).

Výsledky jsou shrnuty na obr. 1A a 1B; u obou koncentrací tenofoviru byl nalezen progresivní virostatický účinek. Statistická analýza odhalila významné snížení koncentrace viru ( $P < 0,05$ ) už u vzorků odebraných po 6. týdnu působení tenofoviru v koncentraci 25 mg/l oproti infikovaným kontrolám. Rozdíl v účinku mezi skupinami rostlin, ovlivňovaných tenofovirem v koncentraci 25 mg/ml a v koncentraci 12,5 mg/ml, nebyl významný.  
 50

Stejně výsledky byly získány i po 12 týdnech aplikace tenofoviru. Po 18 týdnech aplikace tenofoviru bylo zaznamenáno statisticky významné snížení koncentrace viru i u rostlinných vzorků, na něž tato účinná látka působila v koncentraci 12,5 mg/l.

### Polymerázová řetězová reakce

DNA byla izolována z přibližně 0,1 g infikovaných listů za použití sady NucleoSpin Plant II (Macherey Nagel, Německo) podle instrukcí výrobce a získaná DNA byla promyta 30  $\mu$ l vody. Popsaná metoda zahrnuje i působení na vzorek prostřednictvím RNasy A. K amplifikaci segmentu 187 bp genu kapsidového proteinu byly použity vůči TYLCV specifické primery SF301 5'-GTCTTATGAGCAACGGGATG a SF303 5'-GAACATGACCTGATTAGTGTG (Fukuta se spol., J. Virol. Methods 112, 35, 2003). Reakční směs pro PCR o objemu 20  $\mu$ l obsahovala 10 mmol.l<sup>-1</sup> Tris-HCl, pH 8, 8;50 mmol.l<sup>-1</sup> KCl, 0,1 % Triton X-100; 1,5 mmol.l<sup>-1</sup> MgCl<sub>2</sub>; 200 mmol.l<sup>-1</sup> každého z dinukleotidtrifosfátů; 16,67 nanokatalů Taq DNA polymerázy, 1  $\mu$ l DNA a 20 pmol TYLCV primerů. Amplifikace byly provedeny za použití amplifikačního programu zahrnujícího 35 cyklů, sestávajících každý z denaturace při 95 °C (20 sekund), rychlého zchlazení při 55 °C (30 sekund) a syntézy při 72 °C (20 sekund). Všechny vzorky byly analyzovány elektroforeticky v 1,5 % (hm./obj.) agarózovém gelu, viz obr. 2. Ten ukazuje, že u rostliny rajčete, pěstované za přítomnosti 25 mg/l tenofoviru, nedošlo k žádnému namnožení virové DNA, tj. virus byl z rostliny eliminován.

### Stanovení fytotoxicity tenofoviru v rostlinách rajčete jedlého

Semena rajčete jedlého (*Solanum lycopersicum* L.) odrůdy Moneymaker (30 ks ve zkumavce Eppendorf o objemu 2 ml) byla povrchově sterilizována ponořením do 10 % (obj./obj.) vodného roztoku komerčního bělidla (SAVO, Bochemie, ČR, přibližně 3 % (hm./obj.) chlornan sodný) na dobu 10 minut a následně byla pětinasobně promyta sterilní vodou. Poté byla semena asepticky přemístěna do nádob Magenta® Sigma-Aldrich (o výšce 97 mm), obsahujících můstek z filtračního papíru a 12 ml kapalného média podle Murashige a Skooga (MS médium), které zahrnovalo vitamíny (glycin o koncentraci 2,0 mg/l, myo-inositol v konc. 100 mg/l, kyselinu nikotinovou v konc. 0,5 mg/l, pyridoxin v konc. 0,5 mg/l a thiamin v konc. 0,1 mg/l) a sacharózu v koncentraci 20 g/l. Tenofovir byl rozpuštěn v kapalném MS médiu v koncentracích 25 a 12,5 mg/ml, zfiltrován přes sterilní filtr o průměru pórů 0,22 mm (Millipore) a přidán k rostlinám pěstovaným 3 týdny v nádobách Magenta tak, že bylo původní MS médium odpipetováno a nahrazeno tímž médiem s obsahem účinné látky. Jako kontroly bylo použito 8 rostlin, pěstovaných v čistém MS médiu a po osmi rostlinách bylo pěstováno v přítomnosti každé z testovaných koncentrací tenofoviru. Rostliny byly kultivovány v průběhu všech experimentů s fotoperiodou 16 hodin při teplotě 23 °C a intenzitě světla 90  $\mu$ mol.m<sup>-2</sup>.s<sup>-1</sup>. Po šestitýdenní kultivaci byla zaznamenána hmotnost čerstvého hypokotylu a listů. Údaje byly hodnoceny analýzou ANOVA za následného použití Tukeyova HSD testu v softwaru Statistica (StatSoft Inc.).

Předběžné pokusy prokázaly, že aplikace tenofoviru v koncentraci 50 mg/ml vede u rostlin rajčat infikovaných TYLCV k významnému snížení koncentrace viru ( $P < 0,05$ ) oproti infikovaným kontrolním rostlinám, a to už po 12 týdnech od počátku aplikace. Zároveň se ovšem projevil fytotoxický účinek tenofoviru. Přítomnost tenofoviru v médiu v koncentraci 50 mg/ml vedla k významnému snížení čerstvé hmotnosti rostlin rajčete ( $P < 0,05$ ) ve srovnání s kontrolami; koncentrace 25 mg/ml těžce účinné látky signifikantní snížení čerstvé hmotnosti ve srovnání s kontrolami nevyvolala, viz obr. 3.

Průmyslová využitelnost

Použití 9-[(R)-2-(fosfonomethoxy)propyl]adeninu, (R)-PMPA neboli tenofoviru, ve formě pří-  
 5 davku do médií pro kultivaci a rozmnožování rostlin *in vitro*, postřiku, injekce či zálivky do  
 půdy k eliminaci jednovláknových, tj. ssDNA rostlinných virů z rostlin a jejich částí umožní pro-  
 dukci bezvírových rostlin a zásadním způsobem potlačit jednu z nejničivějších celosvětově  
 rozšířených chorob rajčat (*Solanum lycopersicum* L.) a dalších chorob působených geminiviry.

10

## P A T E N T O V É   N Á R O K Y

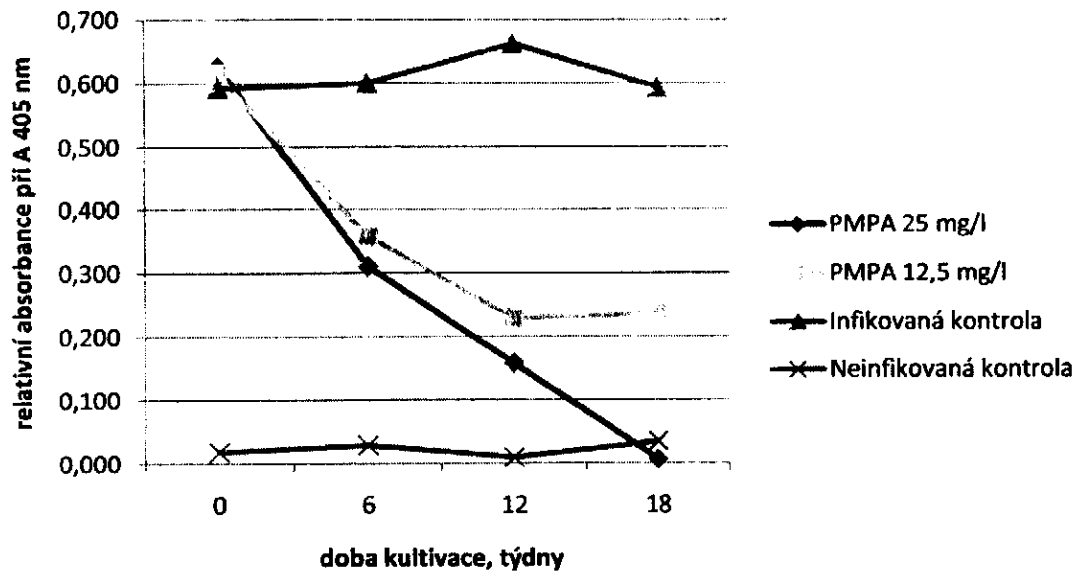
- 15 **1.** Použití acyklického nukleosidfosfonátu, 9-[(R)-2-(fosfonomethoxy)propyl]adeninu, k eli-  
 minaci jednovláknových, tedy ssDNA rostlinných virů z rostlin a jejich částí, včetně naklíčených  
 semen.
- 20 **2.** Použití acyklického nukleosidfosfonátu, 9-[(R)-2-(fosfonomethoxy)propyl]adeninu, jako  
 účinné látky pro výrobu prostředku k eliminaci jednovláknových, tedy ssDNA rostlinných virů z  
 rostlin a jejich částí, včetně naklíčených semen.
- 25 **3.** Použití acyklického nukleosidfosfonátu, 9-[(R)-2-(fosfonomethoxy)propyl]adeninu, jako  
 účinné látky pro výrobu prostředku k eliminaci jednovláknových, tedy ssDNA rostlinných virů z  
 rostlin a jejich částí, včetně naklíčených semen, který dále zahrnuje vodný diluent a/nebo růstové  
 médium a pomocné látky, zvolené ze skupiny, zahrnující vitamíny, sacharózu, minerální prvky,  
 růstové hormony, zahušťovací látky a látky usnadňující průnik účinné látky do rostlinných pletiv,  
 tzv. surfaktanty.
- 30 **4.** Použití acyklického nukleosidfosfonátu, 9-[(R)-2-(fosfonomethoxy)propyl]adeninu, podle  
 nároků 1, 2 nebo 3, přičemž je aplikován formou přídávku do živných médií *in vitro*, a/nebo pří-  
 dávku do hydroponického roztoku, postřiku, injekce či zálivky do půdy, popřípadě jako roztok k  
 infiltraci listů a naklíčených semen.
- 35 **5.** Použití podle kteréhokoliv z nároků 1 až 4, přičemž 9-[(R)-2-(fosfonomethoxy)propyl]-  
 adenin je aplikován v rozmezí koncentrací od 1,25 do 100 mg/l média, hydroponického roztoku,  
 injikovaného roztoku, postřiku či zálivky po dobu nejméně od 3 do alespoň 18 týdnů.
- 40 **6.** Použití podle kteréhokoliv z nároků 2, 3, 4 nebo 5, přičemž prostředek k eliminaci ssDNA  
 rostlinných virů je připraven jako zásobní roztok v koncentrované formě a pro použití je ředěn k  
 dosažení koncentrace 9-[(R)-2-(fosfonomethoxy)propyl]adeninu v rozmezí od 20 μmol do  
 0,4 mmol.
- 45 **7.** Použití podle kteréhokoliv z předcházejících nároků, přičemž eliminovaným jednovláknov-  
 ým, tedy ssDNA rostlinným virem je virus žluté kadeřavosti listů rajčete, tj. TLCV.
- 8.** Použití podle kteréhokoliv z předcházejících nároků, přičemž rostlinný jednovláknový DNA  
 virus žluté kadeřavosti listů rajčete, tj. TYLCV virus, je eliminován v rostlinách rajčete jedlého,  
*Solanum lycopersicum*.
- 50 **9.** Agrochemický prostředek pro eliminaci jednovláknových, tedy ssDNA rostlinných virů z  
 rostlin a jejich částí včetně naklíčených semen, **v y z n a ě u j í c í s e t í m**, že obsahuje jako  
 účinnou složku acyklický nukleosidfosfonát, 9-[(R)-2-(fosfonomethoxy)propyl]adenin.



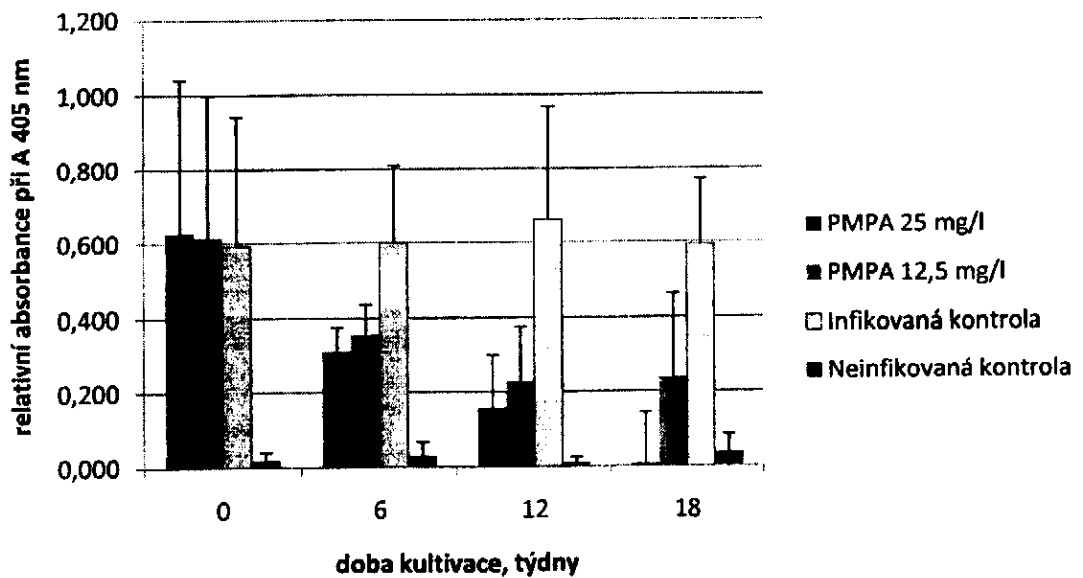
- 5 10. Agrochemický prostředek podle nároku 9, **vyznačující se tím**, že dále zahrnuje vodný diluent a pomocné látky, zvolené ze skupiny, zahrnující vitamíny, sacharózu, minerální prvky, růstové hormony, zahušťovací látky a látky usnadňující průnik účinné látky do rostlinných pletiv.
- 10 11. Agrochemický prostředek podle nároku 10, **vyznačující se tím**, že vodným diluentem je růstové médium, zahušťovací látkou agar a látkou usnadňující průnik účinné látky je surfaktant.
- 15 12. Agrochemický prostředek podle nároků 9, 10 nebo 11, **vyznačující se tím**, že je aplikován formou přídatku do živného média, hydroponického roztoku, postřiku, injekce či závlivky do půdy, nebo jako roztok k infiltraci semen, popřípadě naklíčených.
- 20 13. Agrochemický prostředek podle nároku 9, **vyznačující se tím**, že je aplikován formou poprášení rostlin, jejich částí či semen, popřípadě naklíčených.

2 výkresy

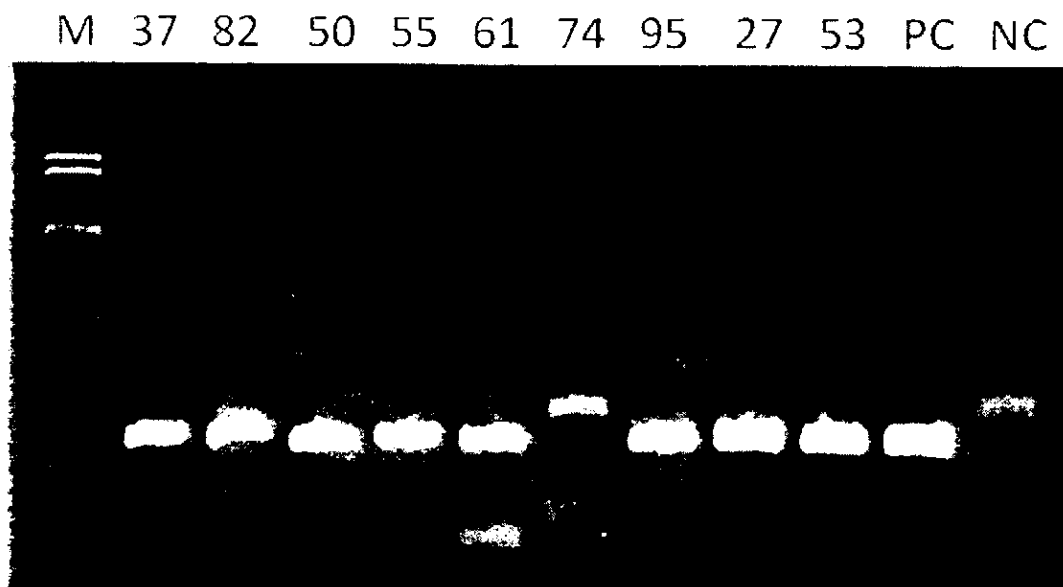
Obr. 1A



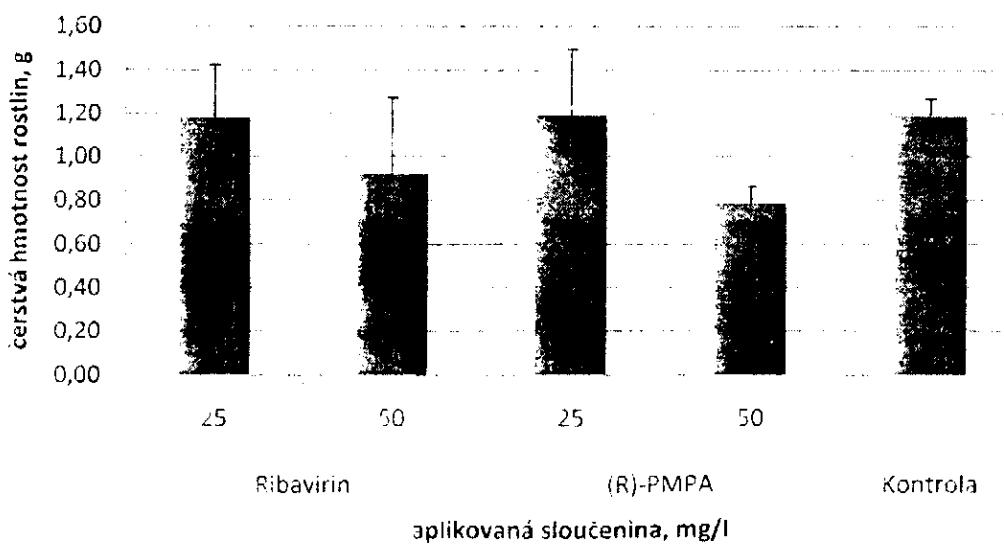
Obr. 1B



Obr. 2



Obr. 3



Konec dokumentu