

# UŽITNÝ VZOR

(11) Číslo dokumentu:

# 36 219

(13) Druh dokumentu: **U1**

(51) Int. Cl.:

*C12Q 1/68* (2018.01)

*C12Q 1/6876* (2018.01)

(19)  
ČESKÁ  
REPUBLIKA



ÚŘAD  
PRŮMYSLOVÉHO  
VLASTNICTVÍ

(21) Číslo přihlášky: **2022-39854**  
(22) Přihlášeno: **04.05.2022**  
(47) Zapsáno: **19.07.2022**

(73) Majitel:  
Výzkumný ústav rostlinné výroby, v. v. i., Praha 6,  
Ruzyně, CZ

(72) Původce:  
RNDr. Mgr. Leona Svobodová, Ph.D., Zákolany,  
CZ  
Ing. Tereza Sovová, Ph.D., Praha 5, Radotín, CZ  
Ing. Pavel Svoboda, Ph.D., Rochov, CZ  
Mgr. Lucia Koláriková, 85105 Bratislava, SK  
Ing. et Ing. Michaela Jungová, DiS, Praha 10,  
Vršovice, CZ

(54) Název užitého vzoru:  
**Primery DN7366 pro markerování odolnosti  
ječmene k suchu**

## Primery DN7366 pro markerování odolnosti ječmene k suchu

### Oblast techniky

5

Řešení se týká primerů pro PCR specificky se vážících na úseky DNA genu, který ovlivňuje odolnost ječmene k suchu.

10

### Dosavadní stav techniky

Sucho je dnes značně rozšířeným fenoménem. Sucho má za následek rostoucí rozdíly mezi velikostí maximálního očekávaného a skutečného výnosu rostlin, který je omezený klimatickými a půdními podmínkami. Obzvláště jarní sucho je v České republice vážným problémem, který v konečném důsledku vede ke zhoršení národního hospodářství a průmyslu snížením kvality a kvantity výnosu plodin, zejména u jarních obilovin, ke kterým patří i sladovnický ječmen.

Ječmen (*Hordeum vulgare* L.) je v České republice pěstován zejména jako surovina pro sladovnický průmysl a jako krmivo. Zejména jarní typy ječmene, které jsou vhodné pro výrobu sladu, se potýkají s problémem sucha v době vegetace. Tolerance sucha u ječmene je složitá; výzkum zaměřený na zlepšení této vlastnosti je proto obtížný (von Korff et al. 2008). Ječmen je diploidní jednoletá rostlina s krátkým životním cyklem a relativně malým (5,1 Gb), nedávno sekvenovaným genomem obsahujícím sedm chromozomů (International Barley Genome Sequencing Consortium 2012). Ječmen se dokáže adaptovat na různé podmínky prostředí, což souvisí s jeho značnou genetickou, morfologickou a fyziologickou rozmanitostí.

Primárním přístupem je šlechtění nových odrůd na odolnost k suchu. Ke zlepšení odolnosti vůči stresu u ekonomicky důležitých plodin byly použity jak konvenční metody selekce rostlin, tak metody podporované markery (Cattiveli et al. 2008; Baenziger, 2016). Molekulárně biologické nástroje se často používají k identifikaci genetického pozadí fenotypových a fyziologických charakteristik rostlin vystavených stresovým faktorům (Mir et al., 2012). Jednou z nejdůležitějších metod je selekce za pomoci markerů (MAS), jejímž cílem je identifikovat molekulární markery, které ukazují na určitý znak. MAS kombinuje znalosti o genotypu a fenotypu analyzovaných rostlin a zlepšuje efektivitu selekce rostlin v jejich raném vývojovém stádiu, čímž zkracuje dobu šlechtění a vynaložené náklady. Výhodou MAS je, že zvyšuje efektivitu konvenčních selekčních metod a nabízí možnost identifikovat genotypy, jejichž fenotypové charakteristiky jsou výsledkem současné interakce více genů. Použití molekulárních markerů v procesu šlechtění zvyšuje selekční citlivost, umožňuje identifikaci rostlin s požadovanými vlastnostmi a je citlivé k prostředí (Collard et al., 2005).

40

Přestože je tento znak komplexní a skládá se z několika dílčích znaků, z nichž každý je podmíněn účinkem mnoha genů, bylo dosud publikováno a v praxi uplatněno pouze několik molekulárních markerů (Jain et al., 2014; Fiust et al., 2015) pro identifikaci odolnosti k suchu u ječmene.

45

### Podstata technického řešení

Výše uvedený nedostatek odstraňuje marker sestávající se z páru primerů navržených na základě rozsáhlé transkriptomické analýzy, které se specificky váží na úseky DNA pouze u odrůd ječmene vykazujících odolnost k suchu. Zatímco u odrůd ječmene náchylných k suchu nedochází k amplifikaci a identifikaci žádného produktu, u odrůd ječmene odolných k suchu dochází k amplifikaci cíleného produktu o velikosti 318 bp, což je umožněno sekvenční variabilitou úseku DNA, kam se specificky váží uvedené primery.

50

Podstatou technického řešení jsou tedy primery:

DN7366\_668F (SEQ ID NO: 1) CAGGGTCACACTGGGATGA  
 DN7366\_985R (SEQ ID NO: 2) CCGAGAACTCAGATATCACGA

5

specificky se vážící na úsek DNA odrůd ječmene vykazujících odolnost k suchu.

### Objasnění výkresu

10

Na příloženém Obr. 1 je uveden obrázek elektroforetogramu PCR produktu z příkladu provedení.

### Příklad uskutečnění technického řešení

15

Ověření funkčnosti a spolehlivosti markeru odolnosti k suchu ječmene

Vzorky listových pletiv 96 odrůd a šlechtitelských linií ječmene byly získány z pracoviště Selgen, a.s. a z Genové banky (Tabulka 1). 0,1 g rostlinného materiálu bylo rozdrceno v třecí misce v prostředí tekutého dusíku. DNA byla extrahována podle optimalizovaného protokolu pomocí detergentu CTAB.

20

PCR byly prováděny v reakční směsi s primery DN7366\_663F + DN7366\_985R za uvedených reakčních podmínek (Tabulka 2 a 3) v přístroji SensoQuest Labcycler. Produkty PCR byly separovány elektroforeticky v 2% agarozovém gelu a vizualizovány pomocí Ethidiumbromidu v UV světle. Velikost produktu byla odečtena pomocí standardu 100 bp. Součástí reakce byl vzorek odrůdy ječmene Tadmor (19071), který je používám jako standard rezistence k suchu. Dále bylo součástí testu 94 odrůd a šlechtitelských linií ječmene jakožto neznámých vzorků a též negativní kontrola označená jako „nk“ (Tabulka 1; Obr. 1).

30

Tabulka 1 - Analyzované vzorky a výsledky PCR

Označení vzorku	Název	Původ	DN7366
19004	KWS Ariane	DEU	1
19008	KWS Meridian	DEU	1
20001	Sebastian	DNK	0
20002	Laudis550	CZE	0
20003	Petrus	CZE	1
20004	Spitfire	CZE	1
20005	Aligátor	CZE	0
nk	negativní kontrola	-	0
19009	Hanácký Jubilejní	CZE	1
19010	Proskowtzuv	CZE	1
19011	Scots Bere	GBR	1
19012	Kuckuck	ETH	1
19014	Nutans 187	RUS	1
19015	Persicum 64	IRN	1
19016	Siri	DNK	1
19017	Mestnyj Ethiopia 43	EGY	0
19018	Tamm i	FNL	1
19019	Herse	NOR	0
19020	Herta Wei bul Is	SWE	1
19021	Proctor	GBR	1

19022	Spratt Archer	IRE	1
19023	Lina	SWE	1
19025	Sarla	SWE	1
19026	Martin	TUN	0
19027	Morocco	TUN	1
19028	Nutans Afghanistan	AFG	0
19029	Rabat	MAR	1
19030	Arivat	USA	1
19031	Nudinka	DEU	0
19032	Vetulio	ITA	1
19033	Mobet	USA	1
19034	Gold	SWE	1
19035	Gitane	GBR	1
19036	Tibet	CUN	1
19037	Porthos	FRA	1
19040	Tokak	FUR	1
19041	Sara	SWE	1
19042	W30	KAZ	1
19043	W471	IRK	1
19048	Derkado	DEU	1
19049	Maresi	DEU	1
19061	Laudis 550	CZE	0
19071	Tadmor	SYR	1
19072	QK19ST/07	CZE	0
19073	QK19ST/08	CZE	0
19074	QK 19ST/09	CZE	0
19075	QK19ST/10	CZE	1
19076	QK19ST/11	CZE	1
19077	QK 19ST/12	CZE	0
19078	QK19ST/13	CZE	1
19079	QK 19ST/14	CZE	1
19080	QK 19ST/15	CZE	1
19081	QK 19ST/16	CZE	1
19082	QK 19ST/17	CZE	1
19083	QK19ST/18	CZE	1
19084	QK 19ST/19	CZE	1
19085	QK19ST/20	CZE	1
19094	SG-L 8030A/18	CZE	0
19095	SG-L 8030C/18	CZE	1
19096	SG-L 8030D/18	CZE	0
19097	SG-L 8030E/18	CZE	1
19098	SG-L 8030/19	CZE	0
19099	SG-L 9001 A/18	CZE	1
19100	SG-L 9001/19	CZE	1
19101	SG-L10083A/19	CZE	1
19102	SG-L 10083 B/19	CZE	1
19103	SG-L 10086/18	CZE	1
19104	SG-LI0105/18	CZE	1
19105	SG-L 15073/19	CZE	1
19106	SG-L 16072/18	CZE	0
19107	STRG 456/18	CZE	1
19108	16103/02	CZE	0
19109	16103/08	CZE	0
19110	16103/10	CZE	1

19111	16103/11	CZE	1
19112	16103/20	CZE	1
19113	16104/03/2	CZE	0
19114	16104/04	CZE	1
19115	16104/19	CZE	1
19116	16104/25	CZE	0
19117	16104/31	CZE	0
20006	QK19St7	CZE	0
20007	QK19St9	CZE	0
20008	QK19SU0	CZE	1
20009	QK19SU3	CZE	1
20010	QK19SU5	CZE	1
20011	QK20SU1	CZE	0
20012	QK20SU2	CZE	1
20013	QK20SH3	CZE	0
20014	QK20SU4	CZE	1
20015	QK20St1 5	CZE	0
20016	QK20SH6	CZE	1
20017	QK20SU7	CZE	1
20018	QK20SU8	CZE	1
20019	QK20SU9	CZE	0
20020	QK20St20	CZE	0

Tabulka 2 - Složení reakční směsi

Chemikálie	Koncentrace	Objem
Primer mix	5 uM	1,0 µl
dNTP	10 mM	0,5 µl
Pufr (Qiagen)	10x	1,5 µl
MgCl <sub>2</sub> (Qiagen)	25 mM	1,0 µl
Taq polymeráza (Qiagen)	5 U/µl	0,2 µl
H <sub>2</sub> O up		9,8 µl
Templátová RNA	100 ng/ul	1,0 µl
Reakční objem		15 µl

5 Tabulka 3 Reakční podmínky

PCR reakce	95 °C	2 minuty
	35 cyklů:	
	95 °C	30 vteřin
	T <sub>A</sub>	40 vteřin
	72 °C	1 minuta
Závěrečná syntéza	72 °C	10 minut
	10 °C	do provedení elektroforézy

## Závěr měření:

Měření prokázalo dobrou funkčnost primerového páru jakožto markeru odolnosti k suchu u ječmene (Obr. 1). Vzorky odrůd a linií ječmene vykazující odolnost k suchu se za uvedených reakčních podmínek vyznačovaly pozitivní odezvou, tj. proužkem na elektroforetogramu o velikost 318 bp (Obr. 1). U odrůd, které nejsou odolné k suchu nebyl detekován žádný produkt. Rovněž u negativní kontroly nebyl cílový fragment amplifikován, tj. nebyl nalezen žádný proužek na elektroforetogramu.

Průmyslová využitelnost

Uvedené nové markery mají využití zejména ve šlechtění ječmene na odolnost k suchu a dále pro testování odrůd ječmene přihlášených do státních odrůdových zkoušek.

## Použitá literatura:

Baenziger P.S. (2016): Wheat breeding and genetics. Ref. Modul. Food Sci.

Cattivelli E., Rizza F., Badeck F.W., Mazzucotelli E., Mastrangelo A.M. Francia E., Maré C., Tondelli A., Stanca A.M. (2008): Drought tolerance improvement in crop plants: an integrated view from breeding to genomics. *Field Crop Res.* 105: 1-14.

Collard B.C.Y., Jahufer M.Z.Z., Brouwer J.B., Pang E.C.K. (2005): An introduction to markers, quantitative trait loci (QTL) mapping and marker assisted selection for crop improvement: the basic concepts. *Euphytica* 142: 169-196.

Hu H., Yiong L. (2014): Genetic engineering and breeding of drought-resistant crops. *Annu. Rev. Plant Biol.* 65: 715-741.

International Barley Genome Sequencing consortium. Mayer K.F., Waugh R., Brown J.W., Schulman A., Langridge P., Platzer M., Fincher G.B., Muehlbauer G.J., Sato K., Close T.J., Wise R.P., Stein N. (2012): A physical, genetic and functional sequence assembly of barley genome. *Nature* 491: 711-716.

Jain N., Singh G.P., Singh P.K., Ramya P., Krishna FI., Ramya K.T., Todkar L., Amasiddha B., Kumar K.C.P., Vijay P. (2014): Molecular approaches for wheat improvement under drought and heat stress. *Indian J. Genet Plant Breed.* 74: 578.

Mir R.R., Zaman-Allah M., Screenivasulu N., Trethowan R., Varshney R.K. (2012): Integrated genomics, physiology and breeding approaches for improving drought tolerance in crops. *Theor. Appl. Genet.* 125: 625-645.

Von Korff M., Grando S., Del Greco A., This D., Baum M., Ceccarelli S. (2008): Quantitative trait loci associated with adaptation to Mediterranean dryland conditions in barley. *Theor. Appl. Genet.* 117: 653-669.

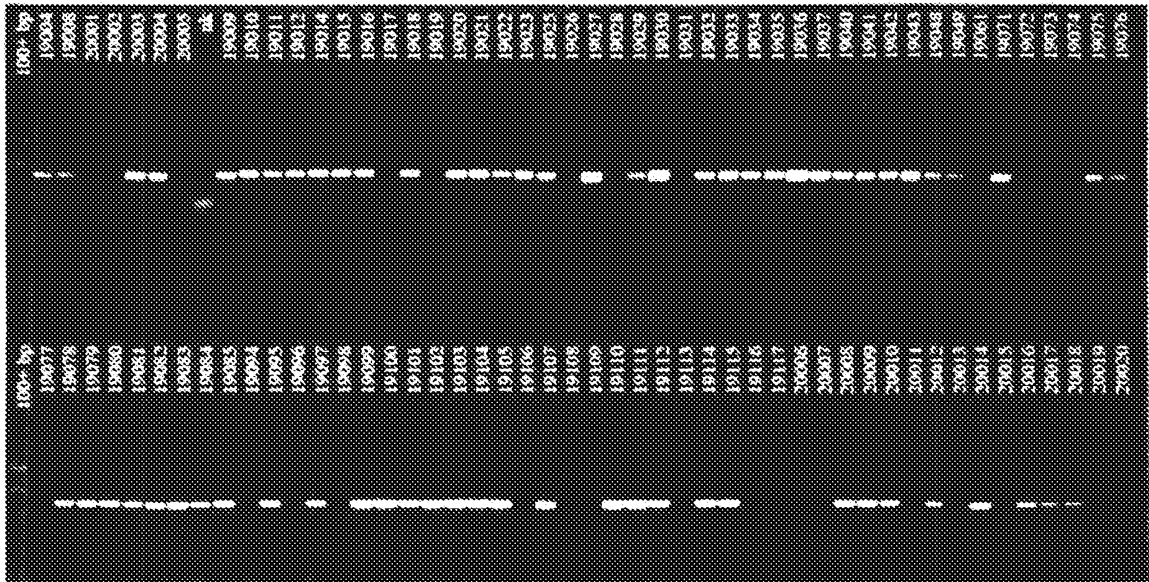
**NÁROKY NA OCHRANU**

1. Marker suchovzdornosti ječmene **vyznačující se tím**, že sestává z primerů o specifické nukleotidové sekvenci

5 DN7366\_668F (SEQ ID NO: 1) CAGGGTCACACTGGGATGA

DN7366\_985R (SEQ ID NO: 2) CCGAGAACTCAGATATCACGA

I výkres



Obr. 1