

UŽITNÝ VZOR

(11) Číslo dokumentu:

31 219

(13) Druh dokumentu: **U1**

(51) Int. Cl.:

C12Q 1/68 (2006.01)
C12N 15/11 (2006.01)

(19)
ČESKÁ
REPUBLICA



ÚŘAD
PRŮMYSLOVÉHO
VLASTNICTVÍ

(21) Číslo přihlášky: **2017-34130**
(22) Přihlášeno: **22.09.2017**
(47) Zapsáno: **21.11.2017**

(73) Majitel:
Mendelova univerzita v Brně, Brno, Černá Pole, CZ

(72) Původce:
Mgr. Jana Raddová, Ph.D., Břeclav, Poštorná, CZ
doc. Mgr. Miroslav Baránek, Ph.D., Lednice, CZ
Ing. Jakub Pečenka, Choryně, CZ

(54) Název užitého vzoru:
**Sada pramerů pro rozlišení rodičovských
linií a hybridních jedinců v osivech
vybraných odrůd zelí hlávkového analýzou
mikrosatelitní DNA**

CZ 31219 U1

Sada primerů pro rozlišení rodičovských linií a hybridních jedinců v osivech vybraných odrůd zelí hlávkového analýzou mikrosatelitní DNA

Oblast techniky

5 Technické řešení se týká sady primerů pro amplifikaci mikrosatelitní DNA metodou polymerázové řetězové reakce (PCR) k následnému stanovení množství hybridních a nehybridních jedinců v osivech vybraných odrůd a tím k určení míry genetické čistoty osiva těchto odrůd.

Dosavadní stav techniky

10 Křížením inbredních rodičovských linií vznikají F1 hybridní rostliny, které svými vlastnostmi v důsledku heterózního efektu překonávají vlastnosti rodičovských rostlin. Tento jev je využíván při tvorbě tzv. F1 odrůd, které jsou v segmentu zelinářství stále více preferovány díky své bujnosti růstu, uniformitě, rezistenci k chorobám, toleranci ke stresům a užitečným pěstitelským vlastnostem jako je ranost a trvanlivost. Chování F1 hybridních rostlin v různých podmínkách je také lépe předvídatelné, všechny rostliny by měly reagovat stejným způsobem. Sjednocené vývojové fáze vyhovují velkoproducentům. O vzrůstající počet F1 hybridních odrůd rodu Brassica na trhu se zasloužily především semenářské firmy (Izzah a kol., 2013).

15 Nevýhodou F1 hybridních rostlin je nutnost udržování jejich rodičovských linií a finanční nákladnost následného kontrolovaného křížení. Jednou z nejdůležitějších vlastností kvalitního osiva je pravost hybridu. Je proto důležité, aby dodavatelé před uvedením na trh osiva kontrolovali jejich genetickou čistotu. Dosavadní postupy pro tuto kontrolu jsou však časově a prostorově náročné, obvyklá praxe v semenářských firmách dosud spočívala v prostém vysazení a kontrole uniformity porostu.

25 Genetické markery, tvořené dvojicemi primerů, vycházející z metody SSR (Simple Sequence Repeat) jsou v současné době výhodnými molekulárními markery pro identifikaci genetické čistoty u mnoha plodin vzhledem ke své vysoké účinnosti a jednoduchosti aplikace. Metodou SSR jsou sledovány jedolokusové vícealelické, tandemové repetice o délce 1 až 6 bází, které mohou být opakovány více než stokrát (Tautz a Schlotterer, 1994) a které označujeme jako mikrosatelitní DNA. Rozdíly v počtu repetic mezi rostlinami mohou být zjištěny pomocí PCR polymerázové řetězové reakce (PCR; Weber a May, 1989). Mikrosatelity se vyznačují vysokou mírou variability v počtu opakování jejich motivů, která se při PCR analýze projeví jako vysoká míra 30 délkového polymorfizmu amplifikovaných fragmentů DNA. Výhodou analýzy mikrosatelitů je jejich hypervariabilita, kodominance alel, hojný výskyt v genomech eukaryot, potřeba malého množství DNA, vysoká reprodukovatelnost a stálost v rámci jedinců dané odrůdy.

35 V literatuře byly popsány studie testování genetické čistoty hybridního osiva a SSR markerů pro rozlišení F1 hybridních rostlin u některých druhů rostlin. Například Sudharani a kol. (2014) identifikovali SSR markery pro testování hybridnosti a genetické čistoty osiva u kukuřice (*Zea mays* L.). Další studie zabývající se genetickou čistotou osiva a SSR markery byly provedeny např. u slunečnice (Pallavi a kol., 2011), manioku (Mohan a kol., 2013), sóji (Zhang a kol., 2014) a rajčat (Liu a kol., 2008).

40 Pro rozlišení hybridních a nehybridních jedinců v osivech zelí hlávkového (*Brassica oleracea* var. *capitata* L.) pomocí metody SSR (Simple Sequence Repeat) bylo dosud nalezeno a publikováno jen několik málo vhodných markerů, které navíc byly navrženy pro odrůdy s původem z Asie (Ye et al. 2013 – systém SSR markerů pro odrůdu Sugan 21; Liu et al., 2007 – systém SSR markerů pro odrůdu Zaoxia 16; Tomita et al., 2013 - systém SSR markerů pro odrůdu YR Kinshukyoryoku 152). Podobné systémy pro odrůdy registrované v zemích EU či ve státní odrůdové knize ČR 45 chybí.

Podstata technického řešení

Cílem technického řešení je poskytnout sadu primerů pro rozlišení rodičovských linií a hybridních jedinců v osivech vybraných odrůd zelí hlávkového analýzou mikrosatelitní DNA, jejíž pod-

stata spočívá v tom, že pro odrůdy Dynamic, Target, Avak a Hornet, které byly vybrány ze státní odrůdové knihy ČR pro zelí hlávkové, obsahuje tato sada primerů následující dvojice:

první dvojici primerů

5'- GTGTGAATGGTGGACAGTCG-3' a

5'- TGCTGAGATTGACTCCGTTG-3' (dvojice dále vedena také jako SSR marker Br21II),

druhou dvojici primerů

5'- GTTAAGTGTGGCGTTAGAGG-3' a

5'- CCTTGGTACATGCCACTGAA-3' (dvojice dále vedena také jako SSR marker Br25II),

třetí dvojici primerů

5'- TCCCAACAAAAGAGTCCA-3' a

5'- CAGCGAACCGAGTCTAAA'-3' (dvojice dále vedena také jako SSR marker Br29II),

čtvrtou dvojici primerů

5'-TTGTTGTAATCCGTACAAGTT -3' a

5'- CAGAAGAGGAGGGGGATA-3' (dvojice dále vedena také jako SSR marker Br30II)

pátou dvojici primerů

5'- AGTCGGGCTCGTATATCTCG-3' a

5'- GTTTCGTGGCGGAAATTAGA-3' (dvojice dále vedena také jako SSR marker Br32II),

a šestou dvojici primerů

5'- TTTCCGAAACTTGTCGTTAT -3' a

5'- CGCTGTAAGCATTGTTGTAA-3' (dvojice dále vedena také jako SSR marker Br33II),

které jsou při aplikaci na reálná osiva výše uvedených 4 odrůd schopny dle schématu v Tabulce č. 1 rozlišit hybridní a nehybridní jedince v okruhu odrůd Dynamic, Target, Avak a Hornet.

Tabulka č. 1 Vybrané SSR markery (+) pro rozlišení F1 odrůd a příslušných rodičovských linií

| Označení SSR markeru | Odrůda | | | |
|----------------------|--------|---------|-------|--------|
| | Hornet | Dynamic | Aavak | Target |
| Br21 II | | | + | |
| Br25 II | | + | | + |
| Br29 II | + | | | + |
| Br30 II | + | | | |
| Br32 II | | + | | |
| Br33 II | | | | + |

* znaménko plus označuje SSR markery vhodné pro rozlišení hybridních a nehybridních jedinců u dané odrůdy.

Tyto ověřené kombinace dvojic primerů, respektive SSR markerů, pro PCR reakci vytvářejí vhodnou formu signálu a umožňují tak rozlišit hybridní jedince a jeho rodičovské linie u osiv zelí hlávkového odrůd Dynamic, Target, Avak a Hornet. Tím je možné hned před distribucí osiv do prodeje zaručit kvalitu osiva a předcházet případným reklamám ze strany zákazníků.

Objasnění výkresu

Podstata technického řešení je dále objasněna na příkladech jeho uskutečnění, které jsou popsány s využitím připojených výkresů, kde na:

5 obr. 1 je schematicky znázorněn příklad vhodné formy signálu ve formě fragmentů získaných amplifikací vybraných SSR markerů.

Příklady uskutečnění technického řešení

10 Před samotnou analýzou osiva některé z odrůd Dynamic, Hornat, Avak, Target je potřebné vybrat jeden ze sady SSR markerů uvedených v tabulce č. 1, který je schopen rozlišit pro danou odrůdu hybridní a nehybridní jedince. U odrůdy Hornet je tedy možné vybrat 2 SSR markery (Br25 II a Br30 II), u odrůdy Dynamic také 2 SSR markery (Br29 II a Br32 II), u odrůdy Avak jeden SSR marker (Br21 II) a u odrůdy Target 3 SSR markery (Br25 II, Br29 II a Br33 II). Primery odpovídající vybraným SSR markerům jsou pak přidány do polymerázové řetězové reakce (viz níže).

15 Dále následuje izolace DNA z jedinců, kteří jsou součástí daného osiva. Počet analyzovaných jedinců přitom určuje přesnost stanovení genetické čistoty osiva. Například pro ověření v praxi používaného požadavku na maximálně 4% zastoupení nehybridních jedinců v osivu je potřebné analyzovat alespoň 80 semen daného osiva. Vzhledem k tomu je tedy obvykle potřeba analyzovat větší počet jedinců a pro celkovou rentabilitu analýzy je potom vhodné zvolit pro izolaci DNA levný a rychlý postup. Pro tyto účely se ukázala jako dostačující metoda expresní izolace DNA odvozená od postupu popsáného Klimyukem a kol. (1993).

20 Potřebný počet semen odrůd Hornet, Avak, Dynamic a Target byl naklíčen, a byly odebrány první dva lístky z 80 jedinců každé odrůdy, které byly vloženy do zkumavek a zmrazeny na -60 °C. Izolace DNA proběhla expresní izolací dle Klimyuk a kol. (1993).

Následovala amplifikace – namnožení DNA pomocí metody PCR. V příkladném provedení byla amplifikace DNA provedena v objemu 12 mikrolitrů reakční směsi.

25 V tomto příkladném provedení reakční směs obsahuje 2,5 mikrolitru 5x PCR pufru dodávaného s použitou DNA polymerázou; 0,75 mikrolitru $MgCl_2$ o koncentraci 25 milimolární; 0,1 mikrolitru dNTPs o koncentraci 25 milimolární; 0,25 mikrolitru jednoho z dvojice primerů o koncentraci 10 mikromolární; 0,25 mikrolitru druhého z dvojice primerů o koncentraci 10 mikromolární; 1 jednotku Taq polymerázy. Následně je reakční směs doplněna vodou pro PCR bez DNáz a RNáz do objemu 12 mikrolitrů. V posledním kroku je DNA izolovaná z daného vzorku osiva (o koncentraci 10 až 20 nanogramů na mikrolitr) přidána v objemu 2 mikrolitrů vzorku ke 12 mikrolitrům reakční směsi.

35 Polymerázová řetězová reakce PCR probíhá v tomto příkladném provedení v termocykleru při následujícím teplotním profilu: 3 minuty při 94 °C, následuje 10 cyklů skládajících se ze tří kroků:

- 45 sekund při 94 °C,
- 30 sekund při teplotě o 10 °C vyšší, než je teplota T_m uvedená v Tabulce č. 2 pro příslušný SSR marker, přičemž v každém z 10 cyklů dochází ke snížení teploty o 1 °C,
- a 30 sekund při 72 °C.

40 Následuje 25 cyklů skládajících se ze tří kroků:

- 30 sekund při 94 °C,
- 30 sekund při teplotě T_m uvedené v Tabulce č. 2 pro příslušný SSR marker a
- 30 sekund při 72 °C.

Celý program je ukončen krokem 7 minut při 72 °C.

Tabulka č. 2 Použité primery, jejich sekvence, optimalizovaná teplota pro hybridizaci primerů – T_m a očekávaná velikost amplifikovaných produktů

| Označení SSR mar- keru | Sekvence prvního a druhého primeru | T _m (°C) | Očekávaná velikost pro- duktu (v párech bází) |
|------------------------------|------------------------------------|------------------------|---|
| Br21 II | GTGTGAATGGTGGACAGTCG | 49 | 220-260 |
| | TGCTGAGATTGACTCCGTTG | | |
| Br25 II | GTTAAGTGTGGCGTTAGAGG | 47 | 140-200 |
| | CCTTGGTACATGCCACTGAA | | |
| Br29 II | TCCAACAAAAGAGTCCA | 44 | 150-180 |
| | CAGCGAACCGAGTCTAAA | | |
| Br30 II | TTGTTGTAATCCGTACAAGTT | 46 | 100-150 |
| | CAGAAGAGGAGGGGGATA | | |
| Br32 II | AGTCGGGCTCGTATATCTCG | 49 | 150-200 |
| | GTTTCGTGGCGGAAATTAGA | | |
| Br33 II | TTCCGAACTTGTCGTTAT | 43 | 280-380 |
| | CGCTGTAAGCATTGTTGTAA | | |

5 Pro rozlišení namnožených fragmentů DNA získaných u testovaných jedinců jsou vzorky následně separovány na horizontální elektroforéze na 2% agarózovém gelu. Pouze u odrůdy Dynamic bylo vhodné výsledky amplifikace získané při použití primeru Br32 II otestovat i na agaróze se nadstandardní separační schopností (výsledky byly sice lépe viditelné, ale analýza byla pracovně a finančně náročnější). DNA byla zviditelněna přidávkem některého z interkalačních barviv pro DNA. Elektroforetické záznamy byly fotograficky zdokumentovány na UV transiluminátoru pomocí fotoaparátu propojeného s PC.

10 Informace o hybridním charakteru jedince byla získána porovnáním signálu tohoto jedince a rodičovských odrůd. Přitom bylo využito vlastnosti kodominance u SSR markerů, kdy u diploidních druhů jako je zelí, jedna alela pochází od jednoho z rodičů, druhá od druhého rodiče a hybrid vzniklý jejich křížením obsahuje tedy alely obě. Tyto alely byly na agarózovém gelu viditelné jako pruhy, viz obr. 1, který znázorňuje příklad fragmentů získaných amplifikací vhodného SSR lokusu. Řazení vzorků na obr. 1 je: F1 hybridní odrůda, první rodič, druhý rodič, M - hmotnostní a molekulární standard (pro určení velikosti PCR produktu, tj. jednotlivých alel, která se udává v párech bází DNA), 1 + 2 - vzorky hybridních potomků.

15 Všech šest dvojic primerů amplifikovalo produkty, jejich kombinace byla schopna odlišit F1 hybridy a rodičovské linie. U odrůdy Dynamic dva z testovaných SSR markerů (Br25 II a Br32 II) produkovaly pruhy obou rodičovských rostlin u F1 hybridů. Pomocí těchto markerů byla genetická čistota hybridního osiva odrůdy Dynamic stanovena na 100 %. U odrůdy Hornet dva z testovaných SSR markerů (Br29 II a Br30 II) produkovaly pruhy obou rodičovských rostlin u F1 hybridů. Pomocí těchto markerů byla genetická čistota hybridního osiva odrůdy Hornet stanovena na 98,57 %. U odrůdy Target tři z testovaných SSR markerů (Br25 II, Br29 II a Br33 II) produkovaly pruhy obou rodičovských rostlin u F1 hybridů. Pomocí těchto markerů byla genetická čistota hybridního osiva odrůdy Target stanovena na 98,57 %. U odrůdy Avak byl stanoven jako vhodný jeden primer (Br21 II). Pomocí tohoto markeru byla genetická čistota hybridního osiva odrůdy Avak stanovena na 96,3 %.

Průmyslová využitelnost

Sadu primerů dle technického řešení lze použít pro rychlou a spolehlivou kontrolu a sledování stavu genetické čistoty potomstev osiv odrůd Hornet, Avak, Dynamic a Target a jejich rodičovských linií například před uvedením osiva na trh.

5 Použité literární zdroje

- Izzah N. K., Lee J., Perumal S., Park J. Y., Ahn K., Fu D., Kim G. -B., Nam Y. -W. a Yang T. -J. (2013): Microsatellite-based analysis of genetic diversity in 91 commercial Brassica oleracea L. cultivars belonging to six varietal groups. Genetic Resources and Crop Evolution [online]., vol. 60, issue 7:1967-1986. Dostupné z: <http://link.springer.com/10.1007/s10722-013-9966-3>
- 10 Klimyuk V. I, Carroll B. J., Thomas C. M., Jones J. D. G. (1993): *Alkali treatment for rapid preparation of plant material for reliable PCR analysis*. The Plant Journal, Vol. 3:493-494.
- Liu, L., Liu, G., Gong, Y., Dai, W., Wang, Y., Yu, F., & Ren, Y. (2007). Evaluation of genetic purity of F1 hybrid seeds in cabbage with RAPD, ISSR, SRAP, and SSR markers. *Hortscience*, 42(3), 724-727.
- 15 Liu L., Wang Y., Gong Y., Zhai X., Yu F. a Shen H. (2008): *Genetic Purity Test of F1 Hybrid Tomato Using Molecular Marker Analysis*. *Acta Horticulturae (ISHS)* [online]. roč. 771: 231–238. Dostupné z: http://www.actahort.org/members/showpdf?booknrnrnr=771_34
- Mohan C., Shanmugasundaram P. a Senthil N. (2013): *Identification of True Hybrid Progenies in Cassava Using Simple Sequence Repeat (SSR) Markers*. Bangladesh Journal of Botany [online]. roč. 42, č. 1:155–159. Dostupné z: <http://www.banglajol.info/index.php/BJB/article/view/15906>
- 20 Pallavi H.M., Gowda R., Shadakshari Y.G., Bhanuprakash K. a Vishwanath K. (2011): *Identification of SSR Markers for Hybridity and Seed Genetic Purity Testing in Sunflower (Helianthus annuus L.)*. Helia [online]. roč. 34, č. 54:59–66. Dostupné z: <https://www.degruyter.com/view/j/helia.2011.34.issue-54/hel1154059p/hel1154059p.xml>
- 25 Sudharani M., Rao P. S. a Subba Rao L. V. (2014): *Identification of SSR Markers for Testing of Hybridity and Seed Genetic Purity in Maize (Zea Mays L.)*. International Journal of Science and Research [online]. roč. 3, č. 10: 92–95. Dostupné z: <https://www.ijsr.net/archive/v3i10/T0NUMTQ0.pdf>
- 30 Tautz D., Schlötterer Ch., Ren Z., Zou Y., Pandit M. W., Singh L., Katrin L. a Fu D. (1994): *Simple sequences: Simple Sequence Repeats Database of the Human Genome*. Current Opinion in Genetics [online], vol. 4, issue 6: 832-837. Dostupné z: <http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/0959437X94900671>
- Tomita, H., Shimizu, M., Kume, C., Kawanabe, T., Osabe, K., Okazaki, K., & Fujimoto, R. (2013). Screening of DNA markers suitable for purity test of inbred lines in Brassica oleracea.
- 35 Weber J. L., May P. E. (1989): *Abundant class of human DNA polymorphisms which can be typed using the polymerase chain reaction*. American journal of human genetics [online], 44.3, s. 388. Dostupné z: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC1715443/>
- 40 Ye S., Wang Y., Huang D., Li J., Gong Y., Xu L. a Liu L. (2013): *Genetic purity testing of F1 hybrid seed with molecular markers in cabbage (Brassica oleracea var. capitata)*. Scientia Horticulturae [online]. [cit. 2017-02-26]. B.m.: Elsevier B. V., roč. 155: 92–96. Dostupné z: <http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0304423813001301>.
- 45 Zhang C. B., Peng B., Zhang W. L., Wang S. M., Sun H., Dong Y. S. a Zhao L. M. (2014): *Application of SSR Markers for Purity Testing of Commercial Hybrid Soybean (Glycine max L.)*. Journal of Agricultural Science and Technology [online]. roč. 16, č. 6:1389–1396. Dostupné z: http://jast.modares.ac.ir/article_11663_0.html

NÁROKY NA OCHRANU

1. Sada primerů pro rozlišení rodičovských linií a hybridních jedinců v osivech vybraných odrůd zelí hlávkového analýzou mikrosatelitní DNA, **v y z n a č u j í c í s e t í m**, že pro odrůdy Dynamic, Target, Avak a Hornet, které byly vybrány ze státní odrůdové knihy ČR pro zelí hlávkové, obsahuje následující dvojice primerů:

první dvojici primerů

5'- GTGTGAATGGTGGACAGTCG -3' a

5'- TGCTGAGATTGACTCCGTTG -3',

druhou dvojici primerů

10 5'- GTTAAGTGTGGCGTTAGAGG-3' a

5'- CCTTGGTACATGCCACTGAA-3',

třetí dvojici primerů

5'- TCCCAACAAAAGAGTCCA-3' a

5'- CAGCGAACCGAGTCTAAA'-3',

15 čtvrtou dvojici primerů

5'-TTGTTGTAATCCGTACAAGTT -3' a

5'- CAGAAGAGGAGGGGGATA -3',

pátou dvojici primerů

5'- AGTCGGGCTCGTATATCTCG -3' a

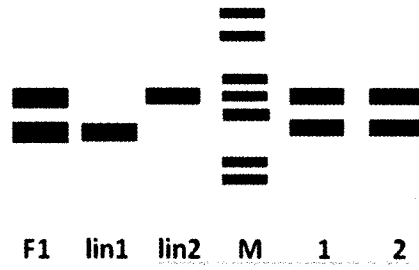
20 5'- GTTTCGTGGCGGAAATTAGA -3',

a šestou dvojici primerů

5'- TTTCCGAAACTTGTCGTTAT -3' a

5'- CGCTGTAAGCATTGTTGTAA -3'.

1 výkres



Obr. 1

Konec dokumentu
