

# UŽITNÝ VZOR

(11) Číslo dokumentu:

## 33 723

(13) Druh dokumentu: **U1**

(51) Int. Cl.:

*A01N 63/27* (2020.01)  
*A01N 65/08* (2009.01)  
*A01N 25/02* (2006.01)

(19)  
ČESKÁ  
REPUBLIKA



ÚŘAD  
PRŮMYSLOVÉHO  
VLASTNICTVÍ

(21) Číslo přihlášky: **2019-36880**  
(22) Přihlášeno: **13.11.2019**  
(47) Zapsáno: **13.02.2020**

(73) Majitel:  
Ústav experimentální botaniky AV ČR, v.v.i.,  
Praha 6, Lysolaje, CZ

(72) Původce:  
doc. Ing. Lenka Burketová, CSc., Praha 6, Lysolaje,  
CZ  
Ing. Barbora Jindřichová, Ph.D., Praha 9, Letňany,  
CZ

(54) Název užitého vzoru:  
**Aktivátor rezistence k chorobám pro  
jednoděložné rostliny**

## Aktivátor rezistence k chorobám pro jednoděložné rostliny

### Oblast techniky

5

Řešení se týká aktivátoru rezistence jednoděložných rostlin na bázi rhamnolipidů a saponinu

### Dosavadní stav techniky

10

Ochrana proti chorobám hospodářsky významných rostlin je v současné době založena především na využívání rezistentních odrůd a aplikaci pesticidů. Tato kombinace může být velmi účinná, ale skrývá jistá závažná úskalí. V případě řady patogenů je jím vysoký evoluční potenciál některých patogenů, kteří dokáží geneticky založenou rezistenci rostliny překonat ve velmi

15

krátkém čase (např. 2 až 3 roky), který je kratší než doba potřebná k vyšlechtění odrůdy. Navíc se v případě monokultur, které jsou běžné v konvenčním zemědělství, zvyšuje riziko vývoje ras patogena, které jsou více virulentní a tím i nebezpečnější pro další odrůdy.

20

Používání pesticidů se stává stále více problematickým. Z hlediska zemědělce je velkou komplikací legislativní omezování přípravků s určitými účinnými látkami, které vychází ze směrnice Evropské unie a dopadá tak i na zemědělství v České republice. Druhým aspektem je negativní pohled koncového spotřebitele na konvenční pesticidy. Téma chemického ošetření rostlin je v poslední době také velmi medializováno, a tak poptávka po „zdravých potravinách“

25

vzrůstá a jsou hledány alternativní metody pro ochranu rostlin. Na trhu jsou prezentovány některé přípravky určené k celkovému posílení rostlin (biostimulátory), u kterých lze přepokládat i vyšší odolnost k různým negativním činitelům díky optimalizovanému vývoji rostlin. Tyto přípravky však necílí na imunitní systém rostliny jako takový. Na trhu v minulosti byl i přípravek a aktivaci imunitního systému rostlin založený na

30

syntetických látkách, který tak neřešil potřebu netoxických prostředků na ochranu rostlin.

### Popis technického řešení

35

Výše uvedené nevýhody dosavadního stavu techniky odstraňuje následující technické řešení, které využívá schopnosti rostliny aktivovat obranný systém po rozpoznání cizích molekulových vzorů, které mohou připomínat patogen (Burketová a kol. 2015). Ošetření rostliny aktivátorem tedy vyvolává její imunizaci. Výhodou navrhovaného řešení je také to, že jako aktivátor využívá látky přírodní povahy, které nezatěžují životní prostředí.

40

Podstatou technického řešení je vodný roztok obsahující bakteriální rhamnolipidy v kombinaci se saponiny. Rhamnolipidy jsou glykolipidy produkované bakterií *Pseudomonas aeruginosa*. Tyto látky jsou rozpoznávané imunitním systémem rostliny a aktivují obranné mechanismy. Hederakosid C patří do skupiny saponinů a vyskytuje se především v břečťanu popínavém (*Hedera helix* L.). Tyto látky se přirozeně vyskytují v rostlinách a mají různé biologické funkce jako např. odpuzovat býložravce a tvořit chemickou bariéru proti napadení rostlin mikroorganismy. Rhamnolipidy i saponiny mají dále schopnost snižovat povrchové napětí a tím snadno přilnou na povrch rostliny.

50

Technické řešení představuje aktivátor rezistence, který se sestává z vodného roztoku rhamnolipidů z bakterie *Pseudomonas aeruginosa* v koncentraci 200 až 400 mg/l a saponinu hederakosidu C v koncentraci 100 až 200 mg/l.

Příklad uskutečnění technického řešení

## Příklad 1

- 5 Aktivátor rezistence je směs obsahující rhamnolipid z bakterie *Pseudomonas aeruginosa* a saponin hederakosid C. Tyto látky jsou rozpuštěny ve vodě v koncentraci: rhamnolipidy 200 mg/l a hederakosid C 100 mg/l.

## Příklad 2

- 10 Výše uvedená směs byla aplikovaná na rostliny ječmene (*Hordeum vulgare*) odrůdy Pallas. Rostliny byly pěstovány v zahradním substrátu za řízených podmínek (16 h světlo/ 8 h tma; 22 °C ve dne/ 18 °C v noci). Intaktní první pravé listy rostlin ječmene 7 dní starých byly fixovány ve vodorovné poloze abaxiální stranou nahoru na držák z plexiskla pomocí provázku, aby je bylo  
15 možné ošetřit aktivátorem rezistence a inokulovat patogenem. 10. den po výsevu byly listy ošetřeny postřikem aktivátoru rezistence. Jako kontrolní ošetření byla použita destilovaná voda. 24 h po ošetření byly rostliny inokulovány původcem padlí travního (*Blumeria graminis*). Inokulace byla provedena v inokulační věži sfouknutím konidií patogena stlačeným vzduchem a jejich volnou sedimentací. Hustota konidií po inokulaci činila přibližně 5 spor/mm<sup>2</sup>. 7. den po  
20 inokulaci byl kvantifikován rozsah napadení patogenem na základě škály (Věchet a kol., 2009). Ošetření aktivátorem rezistence snižovalo rozsah napadení patogenem až o 59 %.

## Příklad 3

- 25 Rostliny ječmene byly pěstovány stejným způsobem, jako je uvedeno v Příkladu 1. Listy rostlin fixované na držáku byly ošetřeny aktivátorem rezistence. Jako kontrolní ošetření byla použita destilovaná voda. Po 8 h od ošetření byly fixované listy rostlin sklizeny, zmrazeny v tekutém dusíku a následně z nich byla izolována RNA pomocí komerčního kitu Spectrum™ Plant Total  
30 RNA Kit (Sigma-Aldrich). Pro odstranění případné kontaminace genomovou DNA bylo 2,5 µg celkové RNA ošetřeno DNFree™ Kitem (Ambion). Následně byl 1 µg RNA převeden na RNA pomocí reverzní transkriptasy M-MLV RNase H- Point Mutant (Promega). Ekvivalent 6,25 ng RNA byl použit do 10 µl reakční směsi s Master Mixem LightCycler 480 SYBR Green Master (Roche). Po ukončení cyklické reakce byly proměřeny křivky tání produktů qPCR. CT  
35 byly stanoveny pomocí programu LightCycler® Software 4.1 (Roche). Relativní exprese byla vypočítána pomocí externí kalibrační křivky. Primery byly navrženy v aplikaci PerlPrimer v1.1.17 (Marshall, 2004).

- Aktivátor rezistence založený na zmíněné směsi rhamnolipidů a hederakosidu v ošetřených  
40 rostlinách aktivoval obranné mechanismy účinné proti patogenům, což dokládá zvýšená transkripce genu *PR3* (195x oproti kontrolnímu ošetření) a *PR4* (20x oproti kontrolnímu ošetření).

Průmyslová využitelnost

- 45 Řešení se týká složení aktivátoru rezistence rostlin. Vzhledem k účinnosti aktivátoru na ječmeni proti fungálnímu patogenu lze předpokládat účinnost aktivátoru i u jiných jednoděložných rostlin (zejména z čeledi lipnicovitých) proti biotrofním patogenům. Pozitivem řešení je, že je aktivátor rezistence komponovaný z látek přirozeně se vyskytujících v přírodě a je tudíž snadno biologicky  
50 rozložitelný. Lze jej použít samostatně nebo ve směsi s hnojivem. Kromě zemědělství může být aktivátor využíván i pro ochranu rostlin zahrádkáři.

Reference

- 5 Burketová L, Trdá L, Ott PG, Valentová O (2015) Bio-based resistance inducers for sustainable plant protection against pathogens. *Biotechnology Advances* 33: 994-1004
- Marshall, O.J., 2004. PerlPrimer: cross-platform, graphical primer design for standard, bisulphite and real-time PCR. *Bioinform.* 20, 2471–2472.
- 10 Věchet,L., Burketová,L., Šindelářová,M. (2009) A comparative study of the efficiency of several sources of induced resistance to powdery mildew (*Blumeria graminis* f. sp *tritici*) in wheat under field conditions. *Crop Protection* 28: 151-154.

**NÁROKY NA OCHRANU**

15

1. Aktivátor rezistence rostlin proti chorobám, **vyznačující se tím**, že obsahuje vodný roztok rhamnolipidů z bakterie *Pseudomonas aeruginosa* v koncentraci 200 až 400 mg/l a saponinu hederokosidu C v koncentraci 100 až 200 mg/l.
- 20 2. Aktivátor rezistence podle nároků 1, **vyznačující se tím**, že obsahuje vodný roztok rhamnolipidů z bakterie *Pseudomonas aeruginosa* v koncentraci 200 mg/l a saponinu hederokosidu C v koncentraci 100 mg/l.

25