

(19)



URZĄD
PATENTOWY
RZECZYPOSPOLITEJ
POLSKIEJ

(10)

PL 244512 B1

(12)

Opis patentowy

(21) Numer zgłoszenia: **438759**

(22) Data zgłoszenia: **2021.08.16**

(43) Data publikacji o zgłoszeniu: **2023.02.20 BUP 08/2023**

(45) Data publikacji o udzieleniu patentu: **2024.02.05 WUP 06/2024**

(51)

MKP:

C12Q 1/6895 (2018.01)

- (73) Uprawniony z patentu:
UNIwersytet Przyrodniczy w Lublinie, Lublin, PL
- (72) Twórca(-y) wynalazku:
SYLWIA SOWA, Lublin, PL
EDYTA PACZOS-GRZĘDA, Lublin, PL
JOANNA TOPOROWSKA, Zakrzówek Wieś, PL
ANETA KOROLUK, Motycz, PL
KRZYSZTOF KOWALCZYK, Motycz, PL
- (74) Pełnomocnik:
rzecz. pat. Magdalena Tarała, Lublin, PL

(54) Tytuł:

Para oligonukleotydowych starterów do wykrywania oraz sposób wykrywania allelu dominującego genu odporności na rdzę koronową z sublinii formy mieszańcowej Avena sativa 'Pendek' x Avena sterilis CW-486 w roślinach owsa zwyczajnego (Avena sativa L.)

PL 244512 B1

Opis wynalazku

Przedmiotem wynalazku jest para oligonukleotydowych starterów inicjujących amplifikację markera molekularnego pozwalającego na wykrycie obecności allelu dominującego genu odporności na rdzę koronową z sublinii formy mieszańcowej *Avena sativa* 'Pendek' x *Avena sterilis* CW-486 oraz sposób detekcji tego markera w łańcuchowej reakcji polimerazy (PCR).

Rdza koronowa to obok mączniaka prawdziwego najpowszechniejsza choroba grzybowa owsa, występująca w każdym rejonie uprawy tego zboża. Chorobę powoduje grzyb *Puccinia coronata* Cda. f. sp. *avenae* P. Syd. & Syd. (Chong, J., 2003. *Disease of Oat*. W: Bailey, K., Gossen, B., Gugel, R., Morrall, R. (Red.), *Diseases of Field Crops. The Canadian Phytopathological Society*, ss. 74–88.), który atakuje głównie liście i zaburza transport produktów fotosyntezy do rosnącego ziarna, znacząco obniżając jego jakość. Porażone rośliny rozwijają zredukowany system korzeniowy, co osłabia ich tolerancję na suszę (Simons, M.D., 1985. *Crown rust*. W: Roelfs, A.P., Bushnell, W.R. (Red.), *The cereal rust Vol. 2 Diseases, Distribution, Epidemiology, and Control*. Academic Press, Orlando, ss. 131–172). Choroba obniża jakość słomy, co potęguje wylęganie roślin, które nie tylko uniemożliwia efektywną wegetację, ale również wzmacnia podatność na atak innych patogenów i bardzo utrudnia zbiory.

Odporność na rdzę koronową warunkowana genetycznie jest obecnie jednym z ważniejszych celów hodowlanych owsa. Stanowi alternatywę dla chemicznej ochrony roślin z użyciem fungicydów, sprzyja uzyskaniu wysokiego i stabilnego plonu, a także podnosi wartość ekologiczną rośliny. Genem, który może być wykorzystany w hodowli odpornościowej owsa jest dominujący gen zidentyfikowany w mieszańcach kombinacji *Avena sativa* 'Pendek' x *Avena sterilis* CW-486. Gen ten ulega ekspresji zarówno w stadium siewki, jak i rośliny dorosłej i jest efektywny w stosunku do większości ras *P. coronata* występujących w Polsce, dzięki czemu może stanowić obiecujący pod względem efektywności i trwałości komponent piramid genowych.

Wyprowadzenie odmiany genetycznie odpornej wymaga precyzyjnego i długotrwałego procesu selekcji genotypów z pożądanymi genami. Identyfikacja genów odporności na rdzę koronową owsa bazująca na obserwacji fenotypu jest trudna i czasochłonna, a często wręcz niemożliwa, ze względu na brak izolatów *P. coronata* o odpowiednich profilach porażenia, czy epistatyczne właściwości niektórych genów współdziałających. Selekcja przy udziale markerów DNA sprzężonych z allelem dominującym i recesywnym pożądanego genu może z powodzeniem zastąpić żmudne testy fizjologiczne. Zapewnia niezależną od czynników środowiskowych i obiektywną ocenę fenotypu w krótkim czasie i niewielkim nakładem pracy (Cabral, A.L., Gnanesh, B.N., Fetch, J.M., McCartney, C., Fetch, T., Park, R.F., Menzies, J.G., McCallum, B., Nanaiah, G.K., Goyal, A., 2014. *Oat fiingal diseases and the application of molecular marker technology for their control*, in: Goyal, A., Manoharachary, C. (Eds.), *Future Challenges in Crop Protection Against Fungal Pathogens*. Springer Science+Business Media, New York, 343–358).

Celem wynalazku było znalezienie takiej pary oligonukleotydów, które umożliwiłyby identyfikację allelu dominującego genu odporności na rdzę koronową z sublinii formy mieszańcowej *Avena sativa* 'Pendek' x *Avena sterilis* CW-486 zarówno w stadium siewki, jak i rośliny dorosłej.

Przedmiot wynalazku stanowi para oligonukleotydowych starterów do wykrywania allelu dominującego genu odporności na rdzę koronową z sublinii formy mieszańcowej *Avena sativa* 'Pendek' x *Avena sterilis* CW-486 w roślinach owsa o sekwencjach nr 1 i 2, przedstawionych na liście sekwencji.

Sposób identyfikacji allelu dominującego genu odporności na rdzę koronową z sublinii formy mieszańcowej *Avena sativa* 'Pendek' x *Avena sterilis* CW-486 w roślinach owsa, w którym to sposobie polimorficzny fragment DNA sprzężony zbadanym genem amplifikowany jest w reakcji PCR z zastosowaniem pary starterów, po czym dokonuje się detekcji produktu amplifikacji, charakteryzuje się tym, że parę starterów stanowi para oligonukleotydów o sekwencjach nr 1 i 2, przedstawionych na liście sekwencji, przy czym stosuje się marker 809, przedstawiony na Fig. 1, o długości 60 pz związany z obecnością allelu dominującego genu odporności na rdzę koronową z sublinii formy mieszańcowej *Avena sativa* 'Pendek' x *Avena sterilis* CW-486 w roślinach owsa (sekwencja nr 3).

Fig. 1 przedstawia produkty PCR uzyskane w wyniku amplifikacji DNA roślin pokolenia F₂ populacji 'Kasztan' x (*Avena sativa* 'Pendek' x *Avena sterilis* CW-486) po włączeniu do reakcji pary starterów nr 1 i 2, przedstawionych na liście sekwencji.

M – marker wielkości GeneRuler™ 100 bp Plus DNA Ladder;

P1 – 'Kasztan', P2 – *Avena sativa* 'Pendek' x *Avena sterilis* CW-486 – formy rodzicielskie badanej populacji;

19–244 – numery roślin populacji 'Kasztan' x (*Avena sativa* 'Pendek' x *Avena sterilis* CW-486) zaznaczone pod względem fenotypu: litera A – homozygoty odporne; litera B – homozygoty wrażliwe na porażenie; litera C – heterozygoty.

W pierwszym etapie wytworzono populację mieszańcową 'Kasztan' x (*Avena sativa* 'Pendek' x *Avena sterilis* CW-486), w której dawcą genu odporności na rdzę koronową owsa jest forma mieszańcowa *Avena sativa* 'Pendek' x *Avena sterilis* CW-486. Następnie za pomocą testu fizjologicznego zidentyfikowano 36 roślin homozygotycznych, dominujących – odpornych oraz 36 roślin homozygotycznych, recesywnych – wrażliwych na porażenie. Po wyizolowaniu DNA roślin o przeciwstawnych fenotypach poddano je komercyjnej analizie polimorfizmu DArTseq polegającej na sekwencjonowaniu zredukowanej reprezentacji genomu. Wyniki uzyskano w postaci macierzy binarnych. Po przyporządkowaniu segregacji fenotypów i genotypów zidentyfikowano sekwencje silicoDArT, które stały się podstawą do zaprojektowania odpowiednich par starterów nr 1 i 2, przedstawionych na liście sekwencji.

Z udziałem oligonukleotydowych starterów nr 1 i 2, przedstawionych na liście sekwencji, uzyskano dominujący marker 809 (Fig. 1), który w prosty i szybki sposób identyfikuje rośliny owsa posiadające allel dominujący genu odporności na rdzę koronową z sublinii formy mieszańcowej *Avena sativa* 'Pendek' x *Avena sterilis* CW-486. Marker 809 został opracowany w oparciu o wyniki analizy segregacji produktu 809 o masie 60 pz, wykazywał sprzężenie genetyczne z locus genu odporności na rdzę koronową z sublinii formy mieszańcowej *Avena sativa* 'Pendek' x *Avena sterilis* CW-486, ma charakter specyficzny, bazuje na reakcji PCR oraz generuje łatwe w interpretacji i powtarzalne wyniki umożliwiające jego zastosowanie w selekcji wspomaganej markerami.

Przeprowadzone badania markera 809 wykazały, że jest on znacznikiem allelu dominującego genu odporności na rdzę koronową z sublinii formy mieszańcowej *Avena sativa* 'Pendek' x *Avena sterilis* CW-486 w owsie zwyczajnym. Zastosowanie markera 809 może być przydatne do identyfikacji genu odporności na rdzę koronową z sublinii formy mieszańcowej *Avena sativa* 'Pendek' x *Avena sterilis* CW-486 obecnego w materiałach hodowlanych owsa. Podstawową zaletą opracowanego systemu identyfikacji jest możliwość analizy roślin w bardzo wczesnym stadium rozwojowym, a wynik uzyskiwany jest w krótkim czasie i jest niezależny od warunków środowiska wzrostu i rozwoju rośliny.

Sposób identyfikacji markera 809

Materiał:

DNA izolowane z liści owsa przy wykorzystaniu komercyjnie dostępnych zestawów.

Skład mieszaniny reakcji PCR (Polymerase chain reaction):

DNA	10 - 50 ng
2x JumpStart™ Taq ReadyMix™	1x
Starter 809_F1 (sekwencja nr 1)	0,1 – 0,5 μM
Starter 809_R1 (sekwencja nr 2)	0,1 – 0,5 μM
H ₂ O	W zależności od objętości końcowej mieszaniny PCR

Sekwencje starterów:

Sekwencja nr 1: 809_F1 5' CAGCTGCTGATTAACAAAAGCTCAC 3'

Sekwencja nr 2: 809_R15' GCCGTGAGTGCGCGGAG 3'

Startery projektowano przy użyciu programu Primer 3.0.

Warunki amplifikacji DNA

Reakcję PCR przeprowadzono w termocyklerach: Biometra T1 (Biometra) lub Biometra Proffesional (Biometra).

Profil termiczny reakcji PCR: 94°C – 4 min., 38 cykli (94°C – 30 s., 67°C – 45 s., 72°C – 1 min.), 72°C – 7 min.

Identyfikacja markera 809:

Elektroforeza na 1,5% żelu agarozowym zawierającym 0,5 μg/ml bromku etydy w buforze TBE (pH 8,0) przy napięciu 100 V przez 2 godziny. Jako wzorzec długości fragmentów DNA użyto GeneRuler™ 100 bp plus DNA Ladder (ThermoFisher). Wizualizacji markera dokonano wykorzystując system DigiGeminus (Syngene).

Wyniki:

Testowanie markera 809 na osobnikach populacji 'Kasztan' x (*Avena sativa* 'Pendek' x *Avena sterilis* CW-486) wykazało wysoką zgodność segregacji markera z odpornością na rdzę koronową owsa (Fig. 1). Na 140 testowanych roślin ilość niedopasowań wyniosła 2, czyli 1,43% niewłaściwie zakwalifikowanych genotypów na podstawie detekcji markera 809. Na elektroforegramie przedstawiono amplifikowane fragmenty DNA po włączeniu do analizy pary starterów nr 1 i 2, przedstawionych na liście sekwencji, świadczące o obecności w badanych genotypach allelu dominującego genu odporności na rdzę koronową z sublinii formy mieszańcowej *Avena sativa* 'Pendek' x *Avena sterilis* CW-486.

LISTA SEKWENCJI

<110> Uniwersytet Przyrodniczy w Lublinie

<120> Para oligonukleotydowych starterów do wykrywania oraz sposób wykrywania allelu dominującego genu odporności na rdzę koronową z sublinii formy mieszańcowej *Avena sativa* 'Pendek' x *Avena sterilis* CW-486 w roślinach owsa zwyczajnego (*Avena sativa* L.)

<130> P.438759

<140> P.438759

<141> 2021-08-16

<160> 3

<170> PatentIn version 3.5

<210> 1

<211> 25

<212> DNA

<213> *Avena sativa* 'Pendek' x *Avena sterilis* CW-486

<400> 1

cagctgctga ttaacaaaag ctcac 25

<210> 2

<211> 17

<212> DNA

<213> *Avena sativa* 'Pendek' x *Avena sterilis* CW-486

<400> 2

gccgtgagtg cgcggag 17

<210> 3

<211> 60

<212> DNA

<213> *Avena sativa* 'Pendek' x *Avena sterilis* CW-486

<400> 3

agctgtgat taacaaaage tcacattagt aaagccgaag cctctccgag cactcacggc 60

Zastrzeżenia patentowe

1. Para oligonukleotydowych starterów do wykrywania allelu dominującego genu odporności na rdzę koronową z sublinii formy mieszańcowej *Avena sativa* 'Pendek' x *Avena sterilis* CW-486 w roślinach owsa zwyczajnego o sekwencjach nr 1 i 2, przedstawionych na liście sekwencji.
2. Sposób identyfikacji allelu dominującego genu odporności na rdzę koronową z sublinii formy mieszańcowej *Avena sativa* 'Pendek' x *Avena sterilis* CW-486 w roślinach owsa zwyczajnego, w którym to sposobie polimorficzny fragment DNA sprzężony z badanym genem amplifikowany jest w reakcji PCR z zastosowaniem pary starterów, po czym dokonuje się detekcji produktu amplifikacji, **znamienny tym**, że parę starterów stanowi para oligonukleotydowych starterów o sekwencjach nr 1 i 2, przedstawionych na liście sekwencji, przy czym stosuje się marker 809, przedstawiony na Fig. 1.
3. Sposób według zastrz. 2, **znamienny tym**, że w wyniku PCR amplifikowany jest fragment DNA o długości 60 par zasad o sekwencji nr 3, przedstawionej na liście sekwencji.

Rysunek

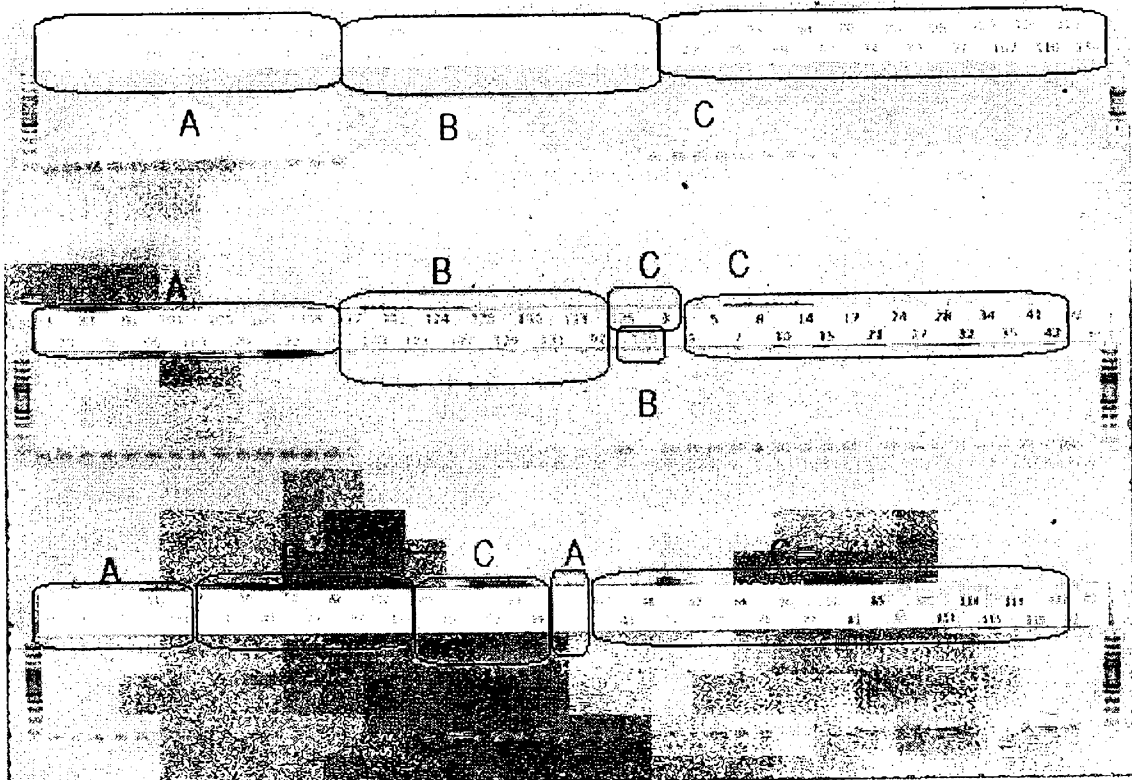


Fig.1