

(19)



URZĄD
PATENTOWY
RZECZYPOSPOLITEJ
POLSKIEJ

(10)

PL 438754 A1

(12)

Opis zgłoszeniowy wynalazku (z daty zgłoszenia)

(21) Numer zgłoszenia: **438754**

(51) MKP:

(22) Data zgłoszenia: **2021.08.16****C12Q 1/6895 (2018.01)**(43) Data publikacji o zgłoszeniu: **2023.02.20 BUP 08/2023**

(71) Zgłaszający:

**UNIWERSYTET PRZYRODNICZY
W LUBLINIE, Lublin, PL**

(72) Twórca(-y):

**SYLWIA SOWA, Lublin, PL
EDYTA PACZOS-GRZĘDA, Lublin, PL
JOANNA TOPOROWSKA, Zakrzówek Wieś, PL
ANETA KOROLUK, Motycz, PL
KRZYSZTOF KOWALCZYK, Motycz, PL**

(74) Pełnomocnik:

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.)

(57) Skrót opisu:

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. Przedmiotem wynalazku jest ponadto 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 polimorficzny fragment DNA sprzężony z badanym genem amplifikowany jest w reakcji PCR z zastosowaniem pary starterów, po czym dokonuje się detekcji produktu amplifikacji, a parę starterów stanowi para oligonukleotydowych starterów o sekwencjach nr 1 i 2 przedstawionych na liście sekwencji, przy czym stosuje się marker 978. W wyniku PCR amplifikowany jest fragment DNA o długości 57 par zasad o sekwencji nr 3 przedstawionej na liście sekwencji.

LISTA SEKWENCJI

Sekwencja nr 1 (Starter 978_F1)

5' TGCAGGTATATCCTCTCCG 3'

Sekwencja nr 2 (Starter 978_R2)

5' GAATTCTCTCCACTGTCGT 3'

Sekwencja nr 3

5' TGCAGGTATATCCTCTCCGAAGGAGTCGCTCAACGCCACGACAGTG
GAGGAGAATTC 3'

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

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' × *Avena sterilis* CW-486 oraz sposób detekcji tego markera w łańcuchowej reakcji polimerazy (PCR).

Produkcja owsa stanowi 1% światowej produkcji zbóż, w 2019 było to około 23,1 mln ton, a jednym z czołowych producentów tego zboża jest Polska [www.fao.org]. Rdza koronowa, jest jedną z najczęściej występujących chorób grzybowych owsa, powodującą rokrocznie bardzo duże straty plonów. Czynnikiem wywołującym chorobę jest grzyb *Puccinia coronata* Cda. f. sp. *avenae* P. Syd. & Syd. atakujący wiele gatunków traw, ale nie porażający innych, poza owsem, gatunków zbóż (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).

Najprostszą metodą walki z rdzą koronową jest stosowanie fungicydów, jednak chemiczne środki ochrony roślin stanowią poważne zagrożenie dla środowiska naturalnego, a ich wysokie koszty w porównaniu z ceną ziarna owsa czynią ten zabieg nieopłacalnym. Pożądaną alternatywą, zarówno tańszą, jak i przyjazną dla środowiska jest genetycznie dziedziczona odporność na porażenie rdzą koronową, która sprzyja nie tylko uzyskaniu wysokiego i stabilnego plonu, ale także podnosi wartość ekologiczną rośliny. Odporność na określoną rasę rdzy koronowej jest zazwyczaj warunkowana jednogenowo. Dotychczas opisano ponad 100 genów odporności na różne rasy fizjologiczne *P. coronata* (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 fungal 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). W mieszańcach kombinacji *Avena sativa* 'Pendek' × *Avena sterilis* CW-486 zidentyfikowano dotychczas gen *Pc50*, jednak porównanie profilu odpornościowego wyselekcjonowanej przez nas sublinii z profilem linii referencyjnej dla genu *Pc50* wykazało, że każda z linii zawiera inny gen odporności na rdzę koronową. Oznacza to, że w mieszańcach kombinacji *Avena sativa* 'Pendek' × *Avena sterilis* CW-486 zdiagnozowano występowanie nowego genu odporności.

Identyfikacja tego genu z wykorzystaniem testów fizjologicznych, podobnie jak innych genów odporności, jest trudna i czasochłonna, a często wręcz niemożliwa, ze względu na brak izolatów *P. coronata* o odpowiednich profilach porażenia, które wykorzystywane są w testach żywiciel-patogen. Przeprowadzenie testu fizjologicznego wymaga posiadania specjalistycznych pomieszczeń, zestawu linii referencyjnych z genami *Pc*, zestawu izolatów *P. coronata* oraz doświadczonego i wyspecjalizowanego personelu, w celu identyfikacji wyników testu. Spełnienie powyższych warunków jest bardzo trudne i na terenie kraju tego typu testy przeprowadzane są tylko w jednym miejscu, na Uniwersytecie Przyrodniczym w Lublinie. Selekcja przy udziale markerów DNA zapewnia obiektywną, niezależną od czynników środowiskowych, ocenę fenotypu i może z powodzeniem zastąpić żmudne testy fizjologiczne.

Celem wynalazku było znalezienie takiej pary oligonukleotydów, które umożliwiłyby identyfikację allelu dominującego genu odporności na rdzę koronową z sublinii formy mieszańcowej *Avena sativa* 'Pendek' × *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' × *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' × *Avena sterilis* CW-486 w roślinach owsa, 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, charakteryzuje się tym, że parę starterów stanowi para oligonukleotydów o sekwencjach nr 1 i 2, przedstawionych na liście sekwencji, przy czym stosuje się marker 978, przedstawiony na Fig.1, o długości 57 pz związany z obecnością allelu dominującego genu odporności na rdzę koronową z sublinii formy mieszańcowej *Avena sativa* 'Pendek' × *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' × (*Avena sativa* 'Pendek' × *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' × *Avena sterilis* CW-486 – formy rodzicielskie badanej populacji;

19-244 – numery roślin populacji 'Kasztan' × (*Avena sativa* 'Pendek' × *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' × (*Avena sativa* 'Pendek' × *Avena sterilis* CW-486), w której dawcą genu odporności na rdzę koronową owsa jest forma mieszańcowa *Avena sativa* 'Pendek' × *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 przeciwnych 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 978 (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' × *Avena sterilis* CW-486. Marker 978 został opracowany w oparciu o wyniki analizy segregacji produktu 978 o masie 57 pz, wykazywał sprzężenie genetyczne z locus genu odporności na rdzę koronową z sublinii formy mieszańcowej *Avena sativa* 'Pendek' × *Avena sterilis* CW-486, ma charakter specyficzny, bazuje na reakcji PCR oraz generuje łatwe w interpretacji i powtarzalne wyniki umożliwiając jego zastosowanie w selekcji wspomaganej markerami.

Przeprowadzone badania markera 978 wykazały, że jest on znacznikiem allelu dominującego genu odporności na rdzę koronową z sublinii formy mieszańcowej *Avena sativa* 'Pendek' × *Avena sterilis* CW-486 w owsie zwyczajnym.

Zastosowanie markera 978 może być przydatne do identyfikacji genu odporności na rdzę koronową z sublinii formy mieszańcowej *Avena sativa* 'Pendek' × *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 978**Material:**

DNA izolowane z liści owsa przy wykorzystaniu komercyjnie dostępnych zestawów.

Skład mieszaniny reakcji PCR (Polymerase chain rection):

DNA	10 - 50 ng
2x JumpStart™ Taq ReadyMix™	1x
Starter 978_F1(sekwencja nr 1)	0,1 – 0,5 µM
Starter 978_R2 (sekwencja nr 2)	0,1 – 0,5 µM
H ₂ O	W zależności od objętości końcowej mieszaniny PCR

Sekwencje starterów:

Sekwencja nr 1: 978_F1 5' TGCAGGTATATCCTCTCCG 3'

Sekwencja nr 2: 978_R2 5' GAATTCTCCTCCACTGTCGT 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 – 30s., 67°C – 45s., 72°C - 1 min.), 72°C -7 min.

Identyfikacja markera 978:

Elektroforeza na 1,5 % żelu agarozowym zawierającym 0,5 µg/ml bromku etydyny w buforze TBE (pH 8,0) przy napięciu 100V 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 978 na osobnikach populacji 'Kasztan' $\times$ (*Avena sativa* 'Pendek' $\times$ *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 978. 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' $\times$ *Avena sterilis* CW-486.

LISTA SEKWENCJI

Sekwencja nr 1 (Starter 978_F1)

5' TGCAGGTATATCCTCTCCG 3'

Sekwencja nr 2 (Starter 978_R2)

5' GAATTCTCCTCCACTGTCGT 3'

Sekwencja nr 3

5'TGCAGGTATATCCTCTCCGAAGGAGTCGCTCAACGCCACGACAGTG
GAGGAGAATTC3'

Zastrzeżenia patentowe:

1. Para oligonukleotydowych starterów do wykrywania allelu dominującego genu odporności na rdzę koronową z sublinii formy mieszańcowej *Avena sativa* 'Pendek' × *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' × *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 978, przedstawiony na Fig. 1.
3. Sposób według zastrz. 2, **znamienny tym**, że w wyniku PCR amplifikowany jest fragment DNA o długości 57 par zasad o sekwencji nr 3, przedstawionej na liście sekwencji.

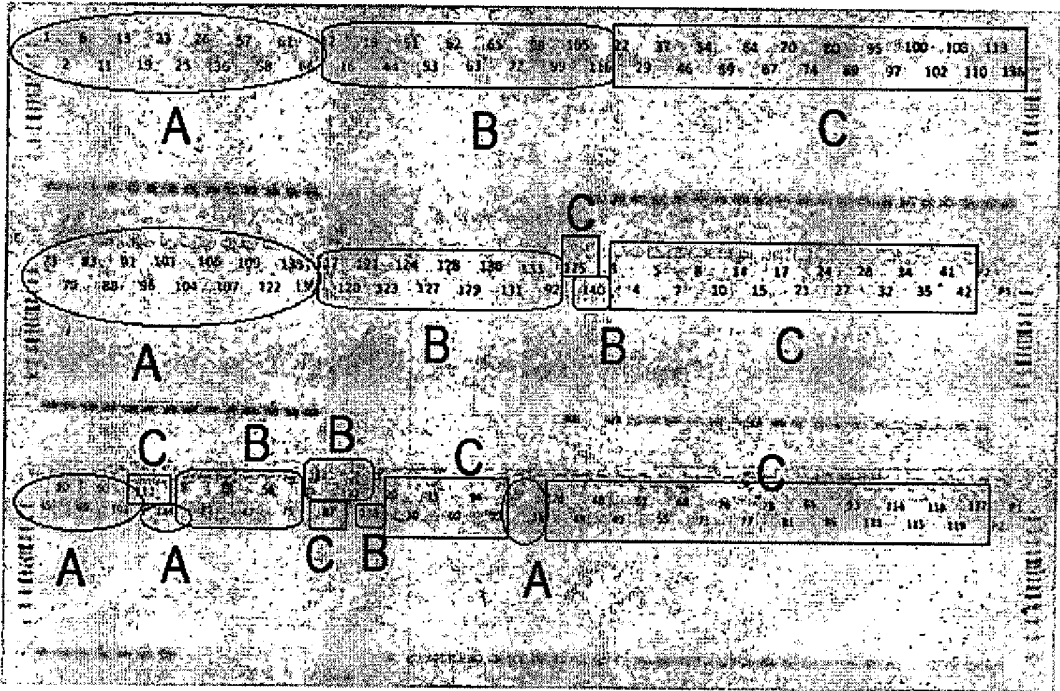
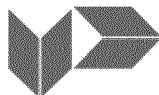


Fig.1



SPRAWOZDANIE O STANIE TECHNIKI ZGŁOSZENIA NR P.438754

Klasyfikacja zgłoszenia: C12Q1/6895 (2018.01)

Poszukiwania prowadzone w klasach: C12Q

Bazy komputerowe, w których prowadzono poszukiwania: UPRP, Epoquenet (Epodoc, Wpi, Npl), STN (Caplus, Biosis, Dgene, USGENE), Internet, Espacenet

Kategoria dokumentu	Dokumenty – z podaną identyfikacją	Odniesienie do zastrz.
A	P.422535, 2019-02-25, Uniwersytet Przyrodniczy w Lublinie, Lublin, PL	1-3
A	P.422536, 2019-02-25, Uniwersytet Przyrodniczy w Lublinie, Lublin, PL	1-3
A	P.422537, 2019-02-25, Uniwersytet Przyrodniczy w Lublinie, Lublin, PL	1-3
A	KLENOVA, H., et al. "Inheritance and efficiency of crown rust resistance in the line Pc 50-4 (Avena sterilis L.)" Czech J. Genet. Plant Breed, 42, 2006 (1): 9-14	1-3
A	PACZOS-GRZĘDA, E. et al. "Virulence structure and diversity of Puccinia coronata f. sp. Avenae P. Syd. & Syd. in Poland during 2013 to 2015" Plant Disease, 2019, 103:1559-1564	1-3

☐ Dalszy ciąg wykazu dokumentów na następnej stronie

A – dokument określający ogólny stan techniki, który nie jest uważany za posiadający szczególne znaczenie,
 E – dokument stanowiący wcześniejsze zgłoszenie lub patent, ale opublikowany w lub po dacie zgłoszenia,
 L – dokument, który może poddawać w wątpliwość zastrzegane pierwszeństwo(-wa), lub przytoczony w celu ustalenia daty publikacji innego cytowanego dokumentu lub z innego szczególnego powodu,
 O – dokument odnoszący się do ujawnienia ustnego przez zastosowanie, wystawienie lub ujawnienie w inny sposób,
 P – dokument opublikowany przed datą zgłoszenia, ale później niż zastrzegana data pierwszeństwa,
 T – dokument późniejszy, opublikowany po dacie zgłoszenia lub w dacie pierwszeństwa i niebędący w konflikcie ze zgłoszeniem, ale cytowany w celu zrozumienia zasad lub teorii leżących u podstaw wynalazku,
 X – dokument o szczególnym znaczeniu; zastrzegany wynalazek nie może być uważany za nowy lub nie może być uważany za posiadający poziom wynalazczy, jeżeli ten dokument brany jest pod uwagę samodzielnie,
 Y – dokument o szczególnym znaczeniu; zastrzegany wynalazek nie może być uważany za posiadający poziom wynalazczy, jeżeli ten dokument zostanie połączony z jednym lub kilkoma tego typu dokumentami, a takie połączenie będzie oczywiste dla znawcy,
 & – dokument należący do tej samej rodziny patentowej.

Sprawozdanie wykonał/-a: Luiza Godecka

data 22.11.2021r.

/-podpisano kwalifikowanym podpisem elektronicznym-/
Pismo wydane w formie dokumentu elektronicznego

Uwagi do zgłoszenia

Sprawozdanie zostało wykonane w oparciu o wersję zastrzeżeń patentowych z 2021-08-16 r.