

(19)



URZĄD
PATENTOWY
RZECZYPOSPOLITEJ
POLSKIEJ

(10)

PL 243633 B1

(12)

Opis patentowy

(21) Numer zgłoszenia: **438756**

(22) Data zgłoszenia: **2021.08.16**

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

(45) Data publikacji o udzieleniu patentu: **2023.09.18 WUP 38/2023**

(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:

Magdalena Tarała, Lublin, PL

(54) Tytuł:

**Para oligonukleotydowych starterów do wykrywania oraz sposób wykrywania allelu
recesywnego 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 243633 B1

Opis wynalazku

Przedmiotem wynalazku jest para oligonukleotydowych starterów inicjujących amplifikację markera molekularnego pozwalającego na wykrycie obecności allelu recesywnego 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).

Rdza koronowa jest jedną z najpowszechniej występujących chorób grzybowych owsa. Straty plonu wywołane porażeniem mogą sięgać nawet 50% (Martinelli, J. A., Federizzi, L. C., & Bennedetti, A. C., 1994. *Yield reductions of oat grains due leaf rust severity. Summa Phytopathologica*, 20, 116–118). Czynnikiem infekcyjnym jest grzyb *Puccinia coronata* Cda. f. sp. *avenae* P. Syd. & Syd., który poraża głównie liście. Forma specjalna *avenae* atakuje wiele gatunków traw, ale nie poraża innych, poza owsem, gatunków zbóż. Gospodarzem pośrednim są krzewy różnych gatunków szakłaku (*Rhamnus spp.*) oraz kruszyny pospolitej (*Frangula alnus*). Rozwojowi choroby sprzyja wysoka temperatura, zwiększona wilgotność powietrza oraz nadmierne nawożenie azotowe. Szczególnie silne porażenie dotyczy odmian późnych i częściej ma miejsce przy opóźnionych siewach. Choroba wywołana *P. coronata* występuje z największym nasileniem na obszarze centralnej i południowo-wschodniej Europy (Chong, J., 2003. *Disease of Oat*. W: Bailey, K., Gossen, B., Gugel, R., Morrall, R. (Rea), *Diseases of Field Crops. The Canadian Phytopathological Society*, ss. 74–88), w Polsce pojawia się niemal każdego roku.

Owies z uwagi na swoje właściwości stanowi bardzo dobry surowiec do produkcji „zdrowej żywności” i nutraceutyków, dlatego stosowanie fungicydów nie jest wskazane w procesie produkcyjnym. Skuteczną, ekonomiczną i przyjazną dla środowiska alternatywą dla chemicznych środków ochrony roślin w walce z rdzą koronową jest uprawa odmian posiadających odporność na porażenie warunkowaną genetycznie. Całkowita odporność na określoną rasę rdzy koronowej jest zazwyczaj cechą dominującą warunkowaną monogenicznie, rzadziej przez dwa lub więcej genów. W niektórych *loci* zidentyfikowano allele wielokrotne. Żadna z polskich odmian owsa nie jest odporna na wszystkie rasy patogenu. Ponadto szybka specjacja powoduje pojawianie się nowych ras przełamujących odporność warunkowaną przez dotychczas efektywne w Polsce geny *Pc* np.: *Pc39* czy *Pc68*, dlatego celowe jest poszukiwanie nowych źródeł odporności i kontrolowane wprowadzanie ich do materiałów hodowlanych (Paczos-Grzęda, E., Sowa, S., 2019. *Virulence structure and diversity of Puccinia coronata f. sp. avenae P. Syd. & Syd. in Poland during 2013 to 2015*; Sowa, S., Paczos-Grzęda, E., Paczos-Grzęda, E., 2021. *Virulence structure of Puccinia coronata f. sp. avenae and effectiveness of Pc resistance genes in Poland during 2017–2019. Phytopathology Online ahe.* <https://doi.org/10.1094/PHYTO-10-0-0457-R>). Wprowadzenie do uprawy odmian odpornych wymaga kumulacji pożądanych alleli genów, co znacząco ułatwia selekcja przy udziale markerów DNA.

Wieloletnie badania genu odporności na rdzę koronową zidentyfikowanego w sublinii formy mieszańcowej *Avena sativa* 'Pendek' × *Avena sterilis* CW-486 potwierdziły, że 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. Identyfikacja markerów bazujących na reakcji PCR, silnie sprzężonych zarówno z allelem dominującym, jak i recesywnym badanego genu, stanowić będzie użyteczne narzędzie w hodowli odpornościowej. Takie markery z powodzeniem mogą być wykorzystywane do selekcji pożądanych genotypów i znacząco skrócić proces hodowlany owsa.

Celem wynalazku było znalezienie takiej pary oligonukleotydów, które umożliwiłyby identyfikację allelu recesywnego genu odporności na rdzę koronową z sublinii formy mieszańcowej *Avena sativa* 'Pendek' × *Avena sterilis* CW-486. Allel dominujący tego genu warunkuje odporność roślin owsa na rdzę koronową zarówno w stadium siewki, jak i rośliny dorosłej. Marker do identyfikacji allelu recesywnego jest niezbędny do wykluczenia z procesu hodowlanego heterozygot, które zawierają zarówno allel dominujący, jak i recesywny. Z uwagi na pełną dominację tego genu identyfikacja fenotypowa allelu recesywnego nie jest możliwa w obecności allelu dominującego w heterozygotcie. Stąd fenotypowo heterozygota oraz homozygota dominująca są identyczne. W pracach hodowlanych pożądany genotyp stanowi homozygota dominująca, która gwarantuje odporność potomstwa, w przeciwieństwie do heterozygoty, która segreguje na formy odporne i wrażliwe na porażenie.

Przedmiot wynalazku stanowi para oligonukleotydowych starterów do wykrywania allelu recesywnego 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 recesywnego 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 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 775, przedstawiony na Fig. 1, o długości 60 pz związany z obecnością allelu recesywnego 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 F1 populacji 'Kasztan' × (*Avena sativa* 'Pendek' × *Avena sterilis* CW-486) po włączeniu do reakcji pary starterów 775_F1+775_R1. 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 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 projektowania 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 775 (Fig. 1), który w prosty i szybki sposób identyfikuje rośliny owsa posiadające allel recesywny genu odporności na rdzę koronową z sublinii formy mieszańcowej *Avena sativa* 'Pendek' × *Avena sterilis* CW-486. Marker 775 będący przedmiotem niniejszego zgłoszenia patentowego został opracowany w oparciu o wyniki analizy segregacji produktu 775 o masie 60 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 775 wykazały, że jest on znacznikiem allelu recesywnego genu odporności na rdzę koronową z sublinii formy mieszańcowej *Avena sativa* 'Pendek' × *Avena sterilis* CW-486 w owsie zwyczajnym.

Zastosowanie markera 775 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, a także fazy wzrostu i rozwoju rośliny.

Sposób identyfikacji markera 775

Material:

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 775_F1 (sekwencja nr 1)	0,1 – 0,5 µM
Starter 775_R1 (sekwencja nr 2)	0,1 – 0,5 µM
H ₂ O	W zależności od objętości końcowej mieszaniny PCR

Sekwencje starterów:

Sekwencja nr 1: 775_F1 5' TGCAGTAGTCAACCATTT 3'

Sekwencja nr 2: 775_R15' ACTAGCATCATCTAGAATGGC 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 – 2 min., 38 cykli (94°C – 30s., 52°C – 30s., 72°C – 1 min.), 72°C – 7 min.

Identyfikacja markera 775:

Rozdział elektroforetyczny 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 775 na osobnikach populacji 'Kasztan' × (*Avena sativa* 'Pendek' × *Avena sterilis* CW-486) wykazało wysoką zgodność segregacji markera z odpornością na rdzę koronową owsa (Fig. 1). Na 140 testowanych roślin ilość niedopasowań wyniosła 3, czyli 2,14% niewłaściwie zakwalifikowanych genotypów na podstawie detekcji markera 775. 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 recesywnego genu odporności na rdzę koronową z sublinii formy mieszańcowej *Avena sativa* 'Pendek' × *Avena sterilis* CW-486.

LISTA SEKWENCJI

Sekwencja nr 1 (starter 775_F1)

5' TGCAGTAGTCAACCATTT 3'

Sekwencja nr 2 (starter 775_R1)

5' ACTAGCATCATCTAGAATGGC 3'

Sekwencja nr 3

5'TGCAGTAGTCAACCATTTAGGGAGCCTGTGGAGGACCAGGCCATTC
TAGATGATGCTAGT 3'

Zastrzeżenia patentowe

1. Para oligonukleotydowych starterów do wykrywania allelu recesywnego genu odporności na rdzę koronową z sublinii formy mieszańcowej *Avena saliva* 'Pendek' × *Avena sterilis* CW-486 w roślinach owsa zwyczajnego o sekwencjach nr 1 i 2, przedstawionych na liście sekwencji.
2. Sposób identyfikacji allelu recesywnego genu odporności na rdzę koronową z sublinii formy mieszańcowej *Avena saliva* '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 775, 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

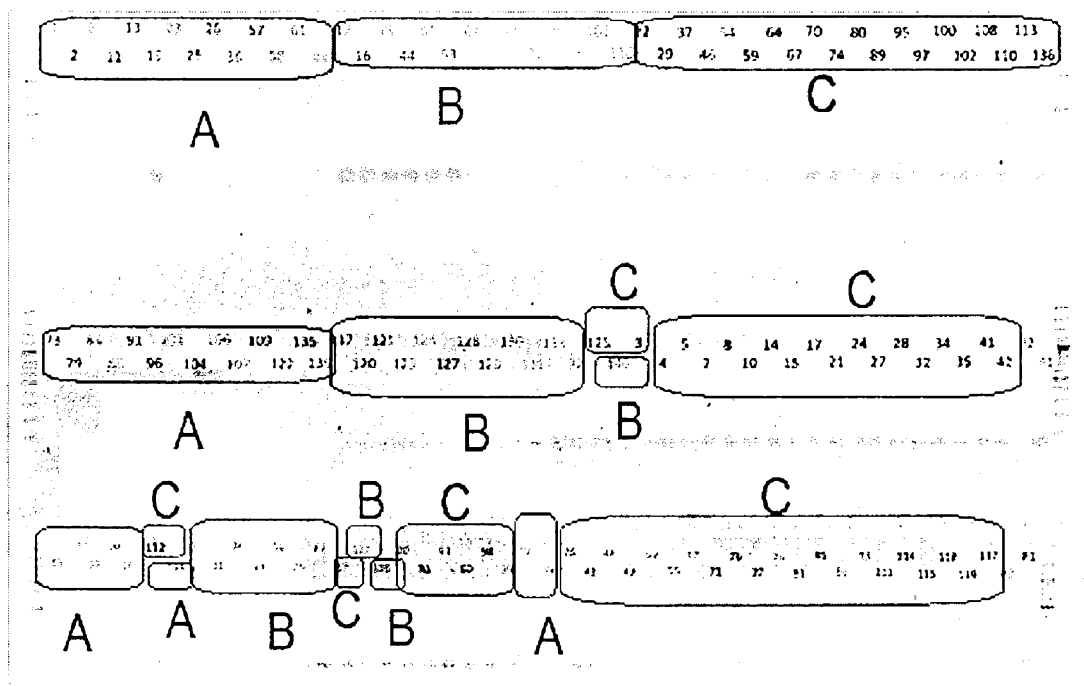


Fig.1