

(19)



URZĄD
PATENTOWY
RZECZYPOSPOLITEJ
POLSKIEJ

(10) **PL 243634 B1**

(12)

Opis patentowy

(21) Numer zgłoszenia: **438757**

(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 243634 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 to jedna z najgroźniejszych chorób grzybowych owsa zwyczajnego będąca skutkiem porażenia roślin przez *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). W Polsce występuje każdego roku, powodując istotne straty w wysokości i jakości plonów. Proces chorobowy obejmuje głównie liście, przez co zaburza transport produktów fotosyntezy do rosnącego ziarna, negatywnie oddziałując na jego jakość. Choroba obniża również jakość słomy i sprzyja wylęganiu roślin. (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).

Zapobieganie porażeniu przez *P. coronata* opiera się głównie na stosowaniu fungicydów, jednak pożądaną alternatywę stanowi hodowla odpornościowa. Z przeprowadzonych badań wynika, iż odporność na rdzę koronową polskich odmian owsa kształtuje się na bardzo niskim poziomie (Sowa, S., Paczos-Grzęda, E., 2020. *A study of crown rust resistance in historical and modern oat cultivars representing 120 years of Polish oat breeding*. *Euphytica* 216, 1–10), dlatego celowe są prace nad wprowadzaniem efektywnych źródeł odporności do polskich materiałów hodowlanych. Gen odporności na rdzę koronową z sublinii formy mieszańcowej *Avena sativa* 'Pendek' × *Avena sterilis* CW-486 charakteryzuje się dużą efektywnością warunkując odporność zarówno w stadium siewki, jak i rośliny dorosłej. Gen ten może być z powodzeniem wykorzystywany w hodowli odpornościowej owsa, stanowiąc obiecujący pod względem efektywności i trwałości komponent piramid genowych. Wyhodowanie takich odmian jest jednak trudne i czasochłonne. Dotychczas selekcja roślin odpornych odbywała się w oparciu o obserwację fenotypu z użyciem izolatów o zdefiniowanych profilach porażenia. Znaczący wpływ na skrócenie czasu hodowli odpornościowej ma wykorzystanie markerów molekularnych. Silnie sprzężone markery molekularne zapewniają obiektywną, niezależną od czynników środowiskowych, ocenę fenotypu i dają możliwość eliminacji niepożądanych genotypów już na etapie siewki (Niedziela, A., Jarska, W., Bednarek, P.T., 2015. *Wybrane elementy nowoczesnych rozwiązań wpływające na skuteczność programów hodowlanych*. *Biul. Inst. Hod. i Aklim. Roślin* 275, 3–16).

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 pożądanym genotypem 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 370, przedstawiony na Fig. 1, o długości 55 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 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 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 370 (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 370 będący przedmiotem niniejszego zgłoszenia patentowego został opracowany w oparciu o wyniki analizy segregacji produktu 370 o masie 55 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 370 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 370 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 370

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 370_F1 (sekwencja nr 1)	0,1 – 0,5 µM
Starter 370_R1b (sekwencja nr 2)	0,1 – 0,5 µM
H ₂ O	W zależności od objętości końcowej mieszaniny PCR

Sekwencje starterów:

Sekwencja nr 1: 370_F1 5' TGCAGGAGAGGAATGCACG 3'

Sekwencja nr 2: 370_R1b 5' GCCCAACAACCCCGCAAATG 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., 62°C – 30s., 72°C – 1 min.), 72°C – 7 min.

Identyfikacja markera 370:

Rozdział elektroforetyczny w 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 370 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 370. 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 370_F1)

5' TGCAGGAGAGGAATGCACG 3'

Sekwencja nr 2 (starter 370_R1b)

5' GCCCAACAACCCCGCAAATG 3'

Sekwencja nr 3

5'TGCAGGAGAGGAATGCACGAACCAGATGGGAACCACATTTGCGGG
GTTGTTGGGC 3'

Zastrzeżenia patentowe

1. 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 zwyczajnego o sekwencjach nr 1 i 2 przedstawionych na liście sekwencji.
2. Sposób identyfikacji allelu recesywnego genu odporności na rdzę koronową 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 370, przedstawiony na Fig. 1.
3. Sposób według zastrz. 2, **znamienny tym**, że w wyniku PCR amplifikowany jest fragment DNA o długości 55 par zasad o sekwencji nr 3 przedstawionej na liście sekwencji.

Rysunek

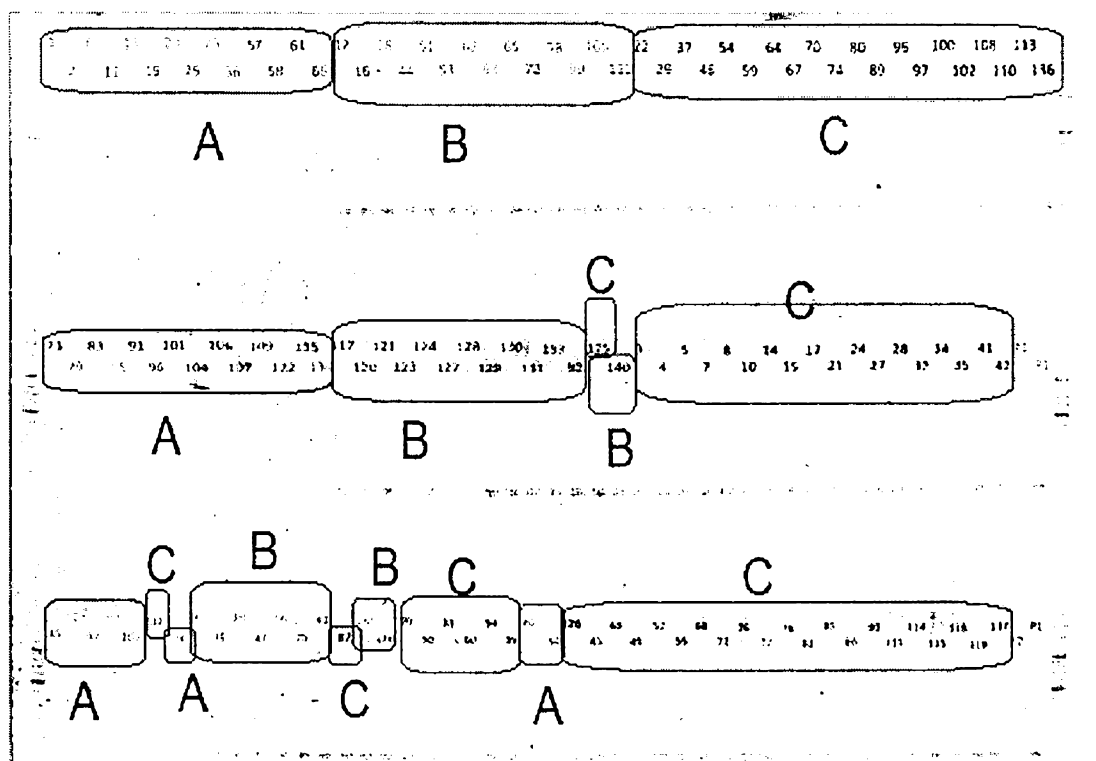


Fig.1