

(19)



URZĄD
PATENTOWY
RZECZYPOSPOLITEJ
POLSKIEJ

(10) **PL 245140 B1**

(12)

Opis patentowy

(21) Numer zgłoszenia: **440931**

(22) Data zgłoszenia: **2022.04.13**

(43) Data publikacji o zgłoszeniu: **2023.10.16 BUP 42/2023**

(45) Data publikacji o udzieleniu patentu: **2024.05.20 WUP 21/2024**

(51) MKP:

C12Q 1/6895 (2018.01)

(73) Uprawniony z patentu:

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

(72) Twórca(-y) wynalazku:

EDYTA PACZOS-GRZĘDA, Lublin, PL

SYLWIA SOWA, 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 *A. sterilis* PI 296244 x *A. sativa* TAM-O-312 w roślinach owsa zwyczajnego (*Avena sativa* L.)

PL 245140 B1

Opis wynalazku

Przedmiot wynalazku stanowi para oligonukleotydowych starterów do wykrywania allelu dominującego genu odporności na rdzę koronową z sublinii formy mieszańcowej *A. sterilis* PI 296244 x *A. sativa* TAM-O-312 w roślinach owsa o sekwencjach nr 1 i 2, przedstawionych na liście sekwencji.

W Polsce rdza koronowa owsa powodowana przez grzyb *Puccinia coronata* Cda. f. sp. *avenae* P. Syd. & Syd. pojawia się każdego roku, a jej nasilenie zależne jest od warunków pogodowych. Istnieją cztery główne metody ograniczania strat w produkcji spowodowanych porażeniem przez tę chorobę. Pierwsza z nich to wczesny siew lub stosowanie odmian wcześniej dojrzewających. Zaawansowane stadium rozwoju rośliny w kontakcie z urediniosporami *P. coronata* wpływa na zmniejszenie skutków infekcji. Pewnym rozwiązaniem może być również usuwanie krzewów szakłaku będących żywicielem pośrednim, których obecność jest niezbędna do zajścia pełnego cyklu rozwojowego patogenu i wytworzenia nowych ras o zrekombinowanym materiale genetycznym. Jest to jednak trudne i pracochłonne, a co więcej, nie sprzyja zachowaniu bioróżnorodności biocenozy. Inną z metod wykorzystywanych w walce z chorobą jest stosowanie chemicznych środków ochrony roślin, jednak stanowią one zagrożenie dla środowiska naturalnego. Ponadto wysokie koszty fungicydów w porównaniu z niską ceną ziarna owsa czynią ten zabieg nieopłacalnym (McCallum, B.D., Fetch, T., Chong, J., 2007. *Cereal rust control in Canada. Aust. J. Agric. Res.* 58(6), 639–647). Pożądaną alternatywą i najkorzystniejszym rozwiązaniem jest hodowla oparta na odporności genetycznej. Taka odporność podnosi wartość ekologiczną rośliny, a także sprzyja uzyskaniu wysokiego i stabilnego plonu, przez co jest obecnie jednym z ważniejszych celów hodowlanych owsa w Polsce i na świecie.

Gen odporności pochodzący z sublinii formy mieszańcowej *A. sterilis* PI 296244 x *A. sativa* TAM-O-312 ulega ekspresji zarówno w stadium siewki, jak i rośliny dorosłej i pozostaje efektywny w stosunku do większości ras rdzy koronowej występujących w Polsce. (Paczos-Grzęda, E., Róg, S., Koroluk, A., Okoń, S., Ostrowska, A., Ociepa, T., Erdzik, P., Chrzastek, M., Kowalczyk K., 2014. *Virulence structure of Puccinia coronata f. sp. avenae in Central and South Eastern Poland 2020*; Paczos-Grzęda, Sowa, S., 2019. *Virulence structure and diversity of Puccinia coronata f. sp. avenae P. Syd. & Syd. in Poland during 2013 to 2015. Plant Dis.* 103, 1559–1564; Sowa, S., Paczos-Grzęda, E., 2017. *Puccinia coronata f. sp. avenae virulence in south-eastern Poland in 2014. Folia Pomer. Univ. Technol. Stetin., Agric., Aliment. Pisc., Zootech.* 336:43, 157–166; Sowa, S., Paczos-Grzęda, E., 2021. *Virulence structure of Puccinia coronata f. sp. avenae and effectiveness of Pc resistance genes in Poland during 2017–2019. Phytopathology Vol. III, No. 7 s. 1158–1165*). Gen ten może stanowić cenny komponent piramid genowych w nowo powstających odmianach, jednak niezbędne do efektywnego procesu hodowlanego jest wykorzystanie markerów molekularnych umożliwiających poprawną selekcję pożądanych genotypów.

Celem wynalazku było znalezienie takiej pary oligonukleotydów, które umożliwiłyby identyfikację allelu dominującego genu odporności na rdzę koronową z sublinii formy mieszańcowej *A. sterilis* PI 296244 x *A. sativa* TAM-O-312 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 *A. sterilis* PI 296244 x *A. sativa* TAM-O-312 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 *A. sterilis* PI 296244 x *A. sativa* TAM-O-312 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 821, przedstawiony na Fig. 1–3, o długości 65 pz związany z obecnością allelu dominującego genu odporności na rdzę koronową z sublinii formy mieszańcowej *A. sterilis* PI 296244 x *A. sativa* TAM-O-312 w roślinach owsa (sekwencja nr 3).

Fig. 1 przedstawia produkty PCR uzyskane w wyniku amplifikacji DNA roślin pokolenia F₂ populacji 707 'Kasztan' x (*A. sterilis* PI 296244 x *A. sativa* TAM-O-312) po włączeniu do reakcji pary starterów nr 1 i 2, przedstawionych na liście sekwencji.

'Kasztan', Pc59K – *A. sterilis* PI 296244 x *A. sativa* TAM-O-312 – formy rodzicielskie badanej populacji;

1 – 90 – numery roślin populacji 'Kasztan' x (*A. sterilis* PI 296244 x *A. sativa* TAM-O-312) zaznaczone pod względem fenotypu: litera A – homozygoty odporne; litera B – homozygoty wrażliwe na porażenie; litera C – heterozygoty.

Fig. 2 przedstawia produkty PCR uzyskane w wyniku amplifikacji DNA roślin pokolenia F₂ populacji 990 'Kasztan' x (*A. sterilis* PI 296244 x *A. sativa* TAM-O-312) po włączeniu do reakcji pary starterów nr 1 i 2, przedstawionych na liście sekwencji.

'Kasztan', Pc59K – *A. sterilis* PI 296244 x *A. sativa* TAM-O-312 – formy rodzicielskie badanej populacji;

1 – 125 – numery roślin populacji 'Kasztan' x (*A. sterilis* PI 296244 x *A. sativa* TAM-O-312) zaznaczone pod względem fenotypu: litera A – homozygoty odporne; litera B – homozygoty wrażliwe na porażenie; litera C – heterozygoty.

Fig. 3 przedstawia produkty PCR uzyskane w wyniku amplifikacji DNA roślin pokolenia F₂ populacji 707.2 'Kasztan' x (*A. sterilis* PI 296244 x *A. sativa* TAM-O-312) po włączeniu do reakcji pary starterów nr 1 i 2, przedstawionych na liście sekwencji.

'Kasztan', Pc59K – *A. sterilis* PI 296244 x *A. sativa* TAM-O-312 – formy rodzicielskie badanej populacji;

2 – 154 – numery roślin populacji 'Kasztan' x (*A. sterilis* PI 296244 x *A. sativa* TAM-O-312) zaznaczone pod względem fenotypu: litera A – homozygoty odporne; litera B – homozygoty wrażliwe na porażenie; litera C – heterozygoty.

W pierwszym etapie wytworzono 3 populacje mieszańcowe 707, 707.2 oraz 990 ('Kasztan' x (*A. sterilis* PI 296244 x *A. sativa* TAM-O-312)), w których dawcą genu odporności na rdzę koronową owsa jest forma mieszańcowa *A. sterilis* PI 296244 x *A. sativa* TAM-O-312. Następnie za pomocą testu fizjologicznego zidentyfikowano rośliny homozygotyczne, dominujące – odporne; rośliny homozygotyczne, recesywne – wrażliwe na porażenie oraz rośliny heterozygotyczne – segregujące pod względem odporności na rdzę koronową. 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 821 (Fig. 1–3), który w prosty i szybki sposób identyfikuje rośliny owsa posiadające allel dominujący genu odporności na rdzę koronową z sublinii formy mieszańcowej *A. sterilis* PI 296244 x *A. sativa* TAM-O-312. Marker 821 został opracowany w oparciu o wyniki analizy segregacji produktu 821 o masie 65 pz, wykazywał sprzężenie genetyczne z locus genu odporności na rdzę koronową z sublinii formy mieszańcowej *A. sterilis* PI 296244 x *A. sativa* TAM-O-312, ma charakter specyficzny, bazuje na reakcji PCR oraz generuje łatwe w interpretacji i powtarzalne wyniki umożliwiając jego zastosowanie w selekcji wspomaganą markerami.

Przeprowadzone badania markera 821 wykazały, że jest on znacznikiem allelu dominującego genu odporności na rdzę koronową z sublinii formy mieszańcowej *A. sterilis* PI 296244 x *A. sativa* TAM-O-312 w owsie zwyczajnym. Zastosowanie markera 821 może być przydatne do identyfikacji genu odporności na rdzę koronową z sublinii formy mieszańcowej *A. sterilis* PI 296244 x *A. sativa* TAM-O-312 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 821

Materiał:

DNA izolowane z liści owsa przy wykorzystaniu komercyjnie dostępnych zestawów.

Skład mieszaniny reakcji PCR (Polymerase chain reellem):

DNA	10 - 50 ng
2x JumpStart™ Taq ReadyMix™	1x
Starter 821_F2 (sekwencja nr 1)	0,1 – 0,5 μM
Starter 821_R2b (sekwencja nr 2)	0,1 – 0,5 μM
H ₂ O	W zależności od objętości końcowej mieszaniny PCR

Sekwencje starterów:

Sekwencja nr 1: 821_F2 5' AGATTCATCTTTGGAGTCG 3'

Sekwencja nr 2: 821_R2b 5' TCGGCCAAGATGCCTTT 3'

Startery projektowano przy użyciu programu Primer 3.0.

Warunki amplifikacji DNA

Reakcję PCR przeprowadzono w termocyklerach: SimpliAmp (Applied Biosystems) lub ProFlex (Applied Biosystems)

Profil termiczny reakcji PCR: 94°C – 4 min., 37 cykli (94°C – 30 s., 54°C – 30 s., 72°C – 45 s.), 72°C – 7 min.

Identyfikacja markera 821:

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 821 na osobnikach populacji 707 ('Kasztan' x (*A. sterilis* PI 296244 x *A. sativa* TAM-O-312)) wykazało wysoką zgodność segregacji z allelem dominującym odporności na rdzę koronową owsa. Na 44 testowane rośliny 4 (9,1%) zostały niewłaściwie zakwalifikowane (Fig. 1). Spośród 94 osobników populacji 990 ('Kasztan' x (*A. sterilis* PI 296244 x *A. sativa* TAM-O-312)) liczba niedopasowań wyniosła 8, co daje 8,5% niewłaściwie zakwalifikowanych genotypów (Fig. 2). W populacji 707.2 ('Kasztan' x (*A. sterilis* PI 296244 x *A. sativa* TAM-O-312)) wśród 46 testowanych genotypów, 5 (10,9%) zostało zakwalifikowanych niewłaściwie (Fig. 3). Na elektroforegramach 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 *A. sterilis* PI 296244 x *A. sativa* TAM-O-312.

LISTA SEKWENCJI

Sekwencja nr 1 (Starter 821_F2)

5' AGATTCATCTTTGGAGTCG 3'

Sekwencja nr 2 (Starter 821_R2b)

5' TCGGCCAAGATGCCTTT 3'

Sekwencja nr 3

5' AGATTCATCTTTGGAGTCGAAAGGAAAAGCGGCGGAGGGTGAAATGA
GAAAGGCATCTTGGCCGA 3'

Zastrzeżenia patentowe

1. Para oligonukleotydowych starterów do wykrywania allelu dominującego genu odporności na rdzę koronową z sublinii formy mieszańcowej *A. sterilis* PI 296244 x *A. sativa* TAM-O-312 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 *A. sterilis* PI 296244 x *A. sativa* TAM-O-312 w roślinach owsa zwyczajnego, w którym to sposobie polimorficzny fragment DNA sprzężony z badanym genem amplifiko-

wany 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 821, przedstawiony na Fig. 1–3.

3. Sposób według zastrz. 2, **znamienny tym**, że w wyniku PCR amplifikowany jest fragment DNA o długości 65 par zasad o sekwencji nr 3, przedstawionej na liście sekwencji.

Rysunki

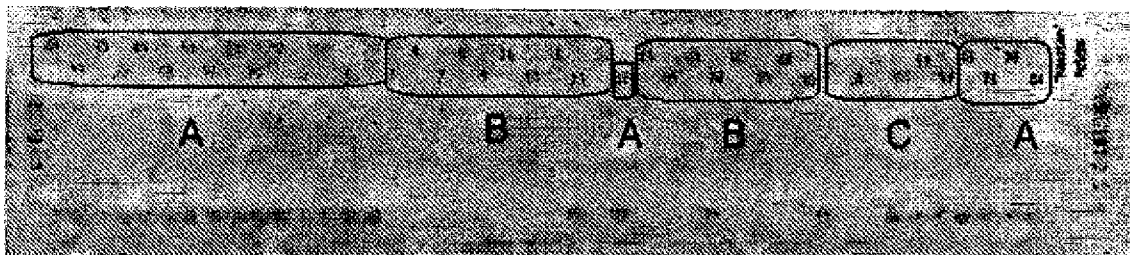


Fig.1

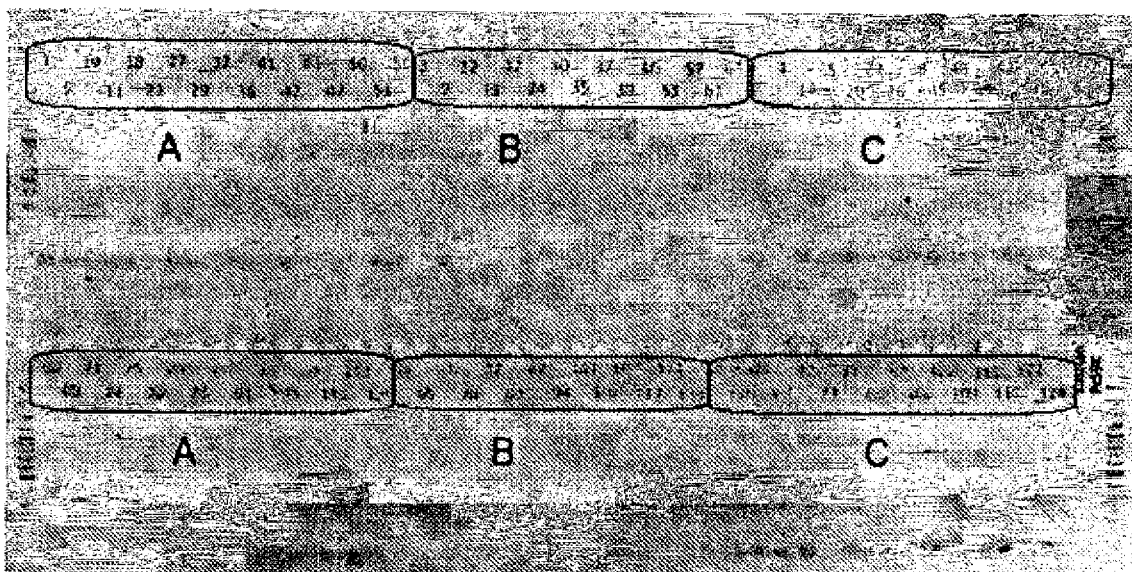


Fig.2

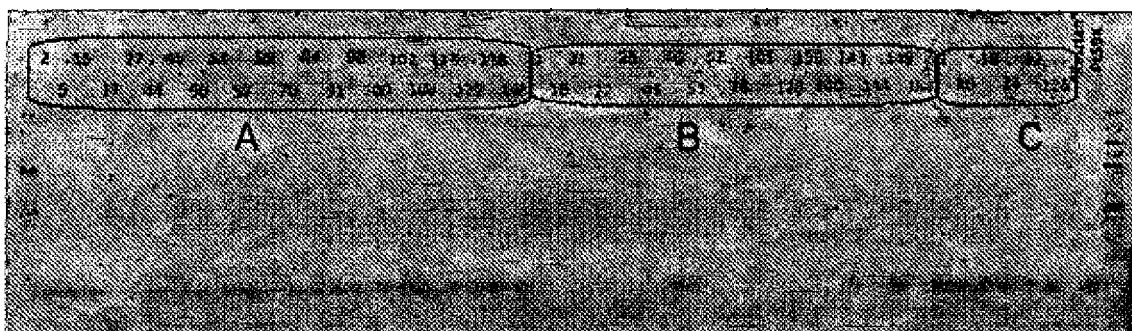


Fig.3