

(19)



URZĄD
PATENTOWY
RZECZYPOSPOLITEJ
POLSKIEJ

(10)

PL 244887 B1

(12)

Opis patentowy

(21) Numer zgłoszenia: **440928**

(22) Data zgłoszenia: **2022.04.13**

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

(45) Data publikacji o udzieleniu patentu: **2024.03.18 WUP 12/2024**

(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 244887 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.

Owies (*Avena sativa* L.) reprezentuje całą gamę zastosowań i ma coraz większe znaczenie gospodarcze w życiu codziennym. Podwyższając efektywność uprawy owsa Polska, jako jeden z głównych producentów tego zboża na świecie może stać się czołowym eksporterem ziarna oraz wysoko przetworzonych produktów owsianych. Szereg czynników stresowych oddziałuje negatywnie na wysokość i jakość plonowania. Wśród nich istotną rolę odgrywają chorobotwórcze patogeny, pasożyty i szkodniki. W przypadku owsa, najgroźniejszą, pojawiającą się rokrocznie chorobą grzybową powodującą znaczące straty w plonach jest rdza koronowa powodowana przez grzyb *Puccinia coronata* Cda. f. sp. *avenae* P. Syd. & Syd. Polskie odmiany owsa, pomimo że wysoko plonujące, charakteryzują się niską odpornością na rdzę koronową (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). Gen odporności z sublinii formy mieszańcowej *A. sterilis* PI 296244 x *A. sativa* TAM-O-312 może być z powodzeniem wykorzystywany w hodowli odpornościowej owsa, stanowiąc obiecujący pod względem efektywności i trwałości komponent piramid genowych (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, E., 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. 111, No. 7 s. 1158–1165*). Proces wprowadzenia odporności warunkowanej genetycznie do materiałów hodowlanych można znacząco przyspieszyć wykorzystując markery molekularne bazujące na reakcji PCR. Markery DNA są kluczowym elementem współczesnej genomiki. Stanowią również użyteczne narzędzie w hodowli odpornościowej umożliwiając pewną i szybką identyfikację form zawierających określone geny na wczesnym etapie rozwoju rośliny.

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 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 127, przedstawiony na Fig. 1–3, o długości 61 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 127 (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 127 został opracowany w oparciu o wyniki analizy segregacji produktu 127 o masie 61 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 127 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 127 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 127

Materiał:

DNA izolowane z liści owsa przy wykorzystaniu komercyjnie dostępnych zestawów.

Skład mieszaniny reakcji PCR (Polymerase chain reaction):

DNA	10 - 50 ng
2x PCR Master Mix	1x
Starter 127_F1a (sekwencja nr 1)	0,1 – 0,5 µM
Starter 127_R1 (sekwencja nr 2)	0,1 – 0,5 µM
H ₂ O	W zależności od objętości końcowej mieszaniny PCR

Sekwencje starterów:

Sekwencja nr 1: 127_F1a 5' CCTGCAGGAGGGCCG 3'

Sekwencja nr 2: 127_R1 5' ACAGTGAGAAATTCAAGTGTCAAC 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, 64°C – 30 s, 72°C – 45 s), 72°C – 7 min.

Identyfikacja markera 127:

Elektroforeza na 1,5% żelu agarozowym zawierającym 0,5 µg/ml bromku etydyny 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 127 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 100% zostało właściwie zakwalifikowanych (Fig. 1). Spośród 94 osobników populacji 990 ('Kasztan' x (*A. sterilis* PI 296244 x *A. sativa* TAM-O-312)) liczba niedopasowań wyniosła 1, co daje 1% 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, 2 (4,3%) zostały zakwalifikowane 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 127_F1a)

5' CCTGCAGGAGGGCCG 3'

Sekwencja nr 2 (Starter 127_R1)

5' ACAGTGAGAAATTTCAAGTGTCAAC 3'

Sekwencja nr 3

5' CCTGCAGGAGGGCCGTCCTGGCACTTATAGAAGTATGTTGACACTTGAAATTTCTCACTGT 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 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 127, przedstawiony na Fig. 1–3.
3. Sposób według zastrz. 2, **znamienny tym**, że w wyniku PCR amplifikowany jest fragment DNA o długości 61 par zasad o sekwencji nr 3, przedstawionej na liście sekwencji.

Rysunki

