

(19)



URZĄD
PATENTOWY
RZECZYPOSPOLITEJ
POLSKIEJ

(10) **PL 243743 B1**

(12)

Opis patentowy

(21) Numer zgłoszenia: **438758**

(22) Data zgłoszenia: **2021.08.16**

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

(45) Data publikacji o udzieleniu patentu: **2023.10.09 WUP 41/2023**

(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 243743 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).

Owies reprezentuje całą gamę zastosowań i ma coraz większe znaczenie gospodarcze w życiu codziennym. Szereg czynników stresowych oddziałuje negatywnie na wysokość i jakość plonowania, wśród nich istotną rolę odgrywają chorobotwórcze patogeny i szkodniki. W przypadku owsa, najgroźniejszą, pojawiającą się rokrocznie chorobą grzybową powodującą znaczące straty w plonach jest rdza koronowa 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 sprzyjających warunkach, na obszarach, gdzie w okresie wegetacji owsa temperatura sięga 20 do 25°C, rdza koronowa może doprowadzić do niemal całkowitego zniszczenia upraw (Carson, M.L., 2009. *Crown rust development and selection for virulence in Puccinia coronata f. sp. avenae in an oat multiline cultivar*. *Plant Dis.* 93, 347–353). Straty wynikają z uszkodzenia wszystkich nadziemnych, zielonych części rośliny (liści, pochew liściowych, wiech i struktur kwiatowych), a zwłaszcza liści flagowych, na których rozwijają się pomarańczowo-żółte uredinia wypełnione urediniosporami. Infekcja osłabia rozwój słomy, co nasila wylęganie, wpływa też na fotosyntezę, prowadząc do znacznego zmniejszenia transportu węglowodanów do rozwijającego się ziarna i obniżenia jego jakości. Chore rośliny są również mniej odporne na suszę ze względu na zredukowany system korzeniowy (Nazareno, E.S., Li, F., Smith, M., Park, R.F., Kianian, S.F., Figueroa, M., 2018. *Puccinia coronata f. sp. avenae: a threat to global oat production*. *Mol. Plant Pathol.* 19, 1047–1060).

Wieloletnie badania potwierdzają, że wprowadzenie do uprawy odmian owsa odpornych na rdzę koronową jest korzystne zarówno ze względów ekonomicznych, jakościowych, jak i fitosanitarnych. Wyhodowanie takich odmian jest jednak pracochłonne i wymaga długotrwałego procesu selekcji. Selekcja roślin odpornych w oparciu o obserwację fenotypu odbywa się za pomocą żmudnych testów fizjologicznych, jednak rozwój metod biologii molekularnej umożliwił opracowanie markerów sprzężonych z genami odporności na rdzę koronową, które stanowią pożądaną alternatywę. Zidentyfikowanie i opracowanie silnie sprzężonych markerów molekularnych dla efektywnych w warunkach Polski genów odporności umożliwi monitorowanie przepływu genów i kumulację poświadczonych alleli w mieszańcach. Gen odporności na rdzę koronową zidentyfikowany w sublinii formy mieszańcowej *Avena sativa* 'Pendek' × *Avena sterilis* CW-486 ulega ekspresji zarówno w stadium siewki, jak i rośliny dorosłej i dzięki temu może stanowić obiecujący pod względem efektywności i trwałości komponent piramid genowych.

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 heterozygotie. Stąd fenotypowo heterozygota oraz homozygota dominująca są identyczne. W pracach hodowlanych poświadczony 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 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 671, przedstawiony na Fig. 1, o długości 62 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 671 (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 671 będący przedmiotem niniejszego zgłoszenia patentowego został opracowany w oparciu o wyniki analizy segregacji produktu 671 o masie 62 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 wspomaganą markerami.

Przeprowadzone badania markera 671 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 671 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, fazy wzrostu i rozwoju rośliny.

Sposób identyfikacji markera 671

Materiał:

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 671_F2 (sekwencja nr 1)	0,1 – 0,5 μM
Starter 671_R1b (sekwencja nr 2)	0,1 – 0,5 μM
H ₂ O	W zależności od objętości końcowej mieszaniny PCR

Sekwencje starterów:

Sekwencja nr 1: 671_F2 5' TTGCCAAGAACACTGTCAGC 3'

Sekwencja nr 2: 671_R1b 5' GAACGACTCTCGCGAAAATCGCG 3'

Startery projektowano przy użyciu programu Primer 3.0.

Warunki amplifikacji DNA

Reakcję PCR przeprowadzono w termocyklerach: Biometra T1 (Biometra) lub Biometra Professional (Biometra).

Profil termiczny reakcji PCR: 94°C – 2 min., 38 cykli (94°C – 30 s., 58°C – 30 s., 72°C – 1 min.), 72°C – 7 min.

Identyfikacja markera 671:

Rozdział elektroforetyczny w 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 671 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 671. 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

5' TTGCCAAGAACACTGTCAGC 3'

Sekwencja nr 2

5' GAACGACTCTCGCGAAAATCGCG 3'

Sekwencja nr 3

5'TTGCCAAGAACACTGTCAGCTGGACGCTGACCTGGAACGCGTGATT
TTCGCGAGAGTCGTTTC 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 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 671, przedstawiony na Fig. 1.
3. Sposób według zastrz. 2, **znamienny tym**, że w wyniku PCR amplifikowany jest fragment DNA o długości 62 par zasad o sekwencji nr 3 przedstawionej na liście sekwencji.

Rysunek

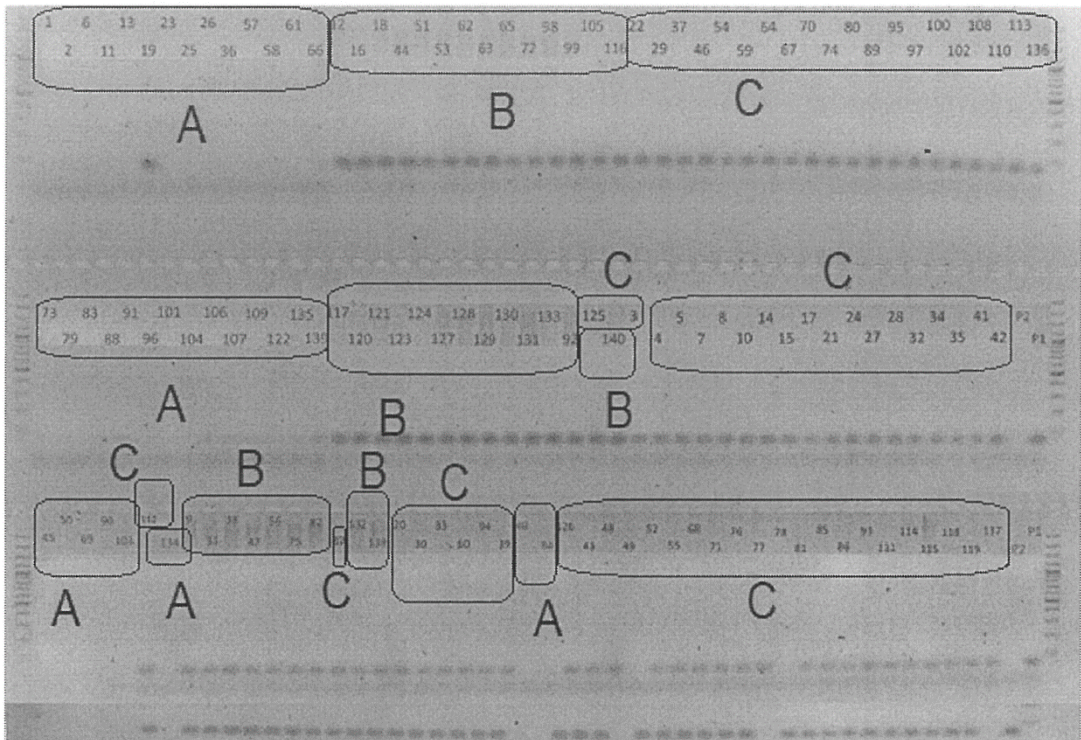


Fig.1