

(19)



URZĄD
PATENTOWY
RZECZYPOSPOLITEJ
POLSKIEJ

(10) **PL 245141 B1**

(12)

Opis patentowy

(21) Numer zgłoszenia: **440932**

(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 recesywnego 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 245141 B1

Opis wynalazku

Przedmiot wynalazku stanowi para oligonukleotydowych starterów do wykrywania allelu recesywnego 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 z uwagi na swoje właściwości reprezentuje całą gamę zastosowań, stanowi bardzo dobry surowiec do produkcji „zdrowej żywności” i nutraceutyków mając coraz większe znaczenie gospodarcze w życiu codziennym. Polska jest jednym z czołowych producentów owsa na świecie (www.fao.org), a na jakość i ilość plonu znaczący wpływ ma kondycja rośliny. Owies narażony jest na szereg chorób, wśród których najbardziej rozpowszechnione są zgorzel podstawy źdźbła, wirus żółtej karłowatości, głownia, mączniak prawdziwy, a przede wszystkim rdza koronowa powodowana 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.*). Nazwa „rdza” pochodzi od rdzawo zabarwionego, pudrowego nalotu pokrywającego porażone organy roślin. Są to urediniospory, zarodniki powstające w urediniach. Pojedyncze uredinium uwalnia dziesiątki tysięcy takich spor, które razem z wiatrem mogą pokonywać ogromne odległości i wywoływać infekcje, w skrajnych przypadkach prowadząc do epidemii. W Polsce rdza koronowa pojawia się każdego roku, a jej nasilenie zależne jest od warunków pogodowych. Zapobieganie porażeniu przez *P. coronata* opiera się głównie na stosowaniu fungicydów, jednak pożądaną alternatywę stanowi hodowla odpornościowa. Wieloletnie badania genu odporności na rdzę koronową zidentyfikowanego w sublinii formy mieszańcowej *A. sterilis* PI 296244 x *A. sativa* TAM-O-312 potwierdziły, że gen ten ulega ekspresji zarówno w stadium siewki, jak i rośliny dorosłej i pozostaje efektywny w stosunku do większości ras *P. coronata* 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, 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). Gen ten może być wykorzystany w hodowli odpornościowej owsa, a zidentyfikowanie markerów bazujących na reakcji PCR, silnie sprzężonych zarówno z allelem dominującym, jak i recesywnym genu przyspieszy i ułatwi procesy hodowlane.*

Celem wynalazku było znalezienie takiej pary oligonukleotydów, które umożliwiłyby identyfikację allelu recesywnego 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 recesywnego 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 recesywnego 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+853, przedstawiony na Fig. 1–3, o długości ok. 515 pz związany z obecnością allelu recesywnego 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 recesywny marker 127+853 (Fig. 1–3), który w prosty i szybki sposób identyfikuje rośliny owsa posiadające allel recesywny genu odporności na rdzę koronową z sublinii formy mieszańcowej *A. sterilis* PI 296244 x *A. sativa* TAM-O-312. Marker 127+853 został opracowany w oparciu o wyniki analizy segregacji produktu 127+853 o masie 515 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+853 wykazały, że jest on znacznikiem allelu recesywnego 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+853 może być przydatne do identyfikacji allelu recesywnego 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+853

Material:

DNA izolowane z liści owsa przy wykorzystaniu komercyjnie dostępnych zestawów.

Skład mieszaniny reakcji PCR (Polymerase chain rection):

DNA	10 - 50 ng
2x PCR Master Mix	1x
Starter 127_F1b (sekwencja nr 1)	0,1 – 0,5 μM
Starter 853_R2 (sekwencja nr 2)	0,1 – 0,5 μM
H ₂ O	W zależności od objętości końcowej mieszaniny PCR

Sekwencje starterów:

Sekwencja nr 1: 127_F1b 5' CCTGCAGGAGGGCTG 3'

Sekwencja nr 2: 853_R2 5' AAACAGGAGCAGCAAG 3'

Startery projektowano przy użyciu programu Primer 3.0.

Warunki amplifikacji DNA

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

Profil termiczny reakcji PCR: 94°C – 4 min., 37 cykli (94°C – 30 s., 60°C – 30 s., 72°C – 45 s.), 72°C – 7 min.

Identyfikacja markera 127+853:

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+853 na osobnikach populacji 707 ('Kasztan' x (*A. sterilis* PI 296244 x *A. sativa* TAM-O-312)) wykazało wysoką zgodność segregacji z allelem recesywnym 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 10, czyli 10,6% 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, 6 (13%) 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 recesywnego 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_F1b)

5' CCTGCAGGAGGGCTG 3'

Sekwencja nr 2 (Starter 853_R2)

5' AAACAGGAGCAGCAAG 3'

Sekwencja nr 3

5'

CCTGCAGGAGGGCTGTCCTGGCACTTATAAAAGTATGTTGACACTTGCAATTTT
 TCACTGTCTAAGTTGTTTCTGCCTCACACTTCCACGGTAACTCATATTGATGT
 GCCTGCTAGTCCTTGGGGGAGTACCGGTGCATTTGAAGCTGGATCAAAAATCC
 CATGGGTGCAGGCACAACCTCCCAAAGATGACCTCCCTCAGGAATCTTTGGATT
 ACGGGAGAGCCAAGCTTTATGTCAATGGCCCTGATCTCGAATCTTGCATCTCTC
 ACCTGTCTAGAAGTGTGGATTGCAAGAATTTAAAGGCAGATGGGTTCAATCC
 TCTCATCGCAGCTGTCAGCCTCAAGGAATTTTCTGTCTACAACCCGAAAGATGG
 TCCTCGCTCTGTAGCTGCGGATCTTCTCTTGGAAATGGCGTTGGCAAGTAGTGC
 CAAACTATTGTCGCCTTCTGCAGGCTGCTTCCAGCTGGAACATATTGAAGTGGA
 TAGCATCTCAGCGGTGCTTGCTGCTCCTGTTT 3'

Zastrzeżenia patentowe

1. Para oligonukleotydowych starterów do wykrywania allelu recesywnego 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 recesywnego 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+853, przedstawiony na Fig. 1–3.
3. Sposób według zastrz. 2, **znamienny tym**, że w wyniku PCR amplifikowany jest fragment DNA o długości 515 par zasad o sekwencji nr 3 przedstawionej na liście sekwencji.

Rysunki

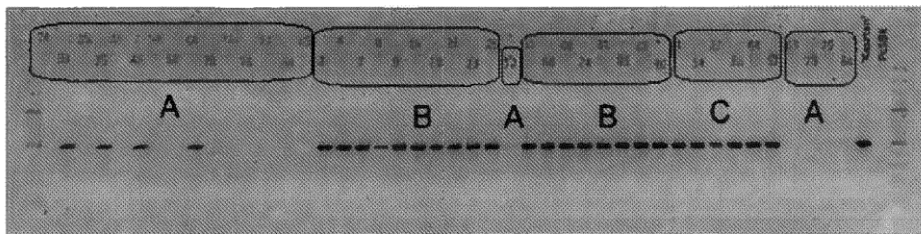


Fig.1

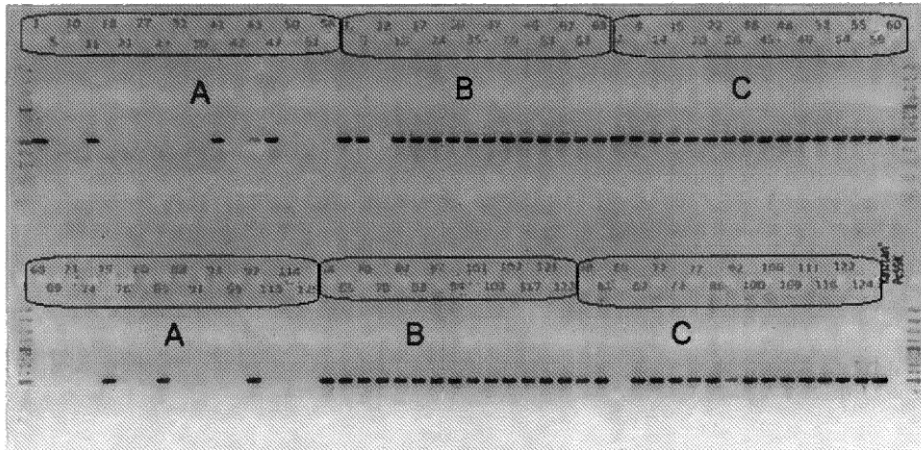


Fig.2

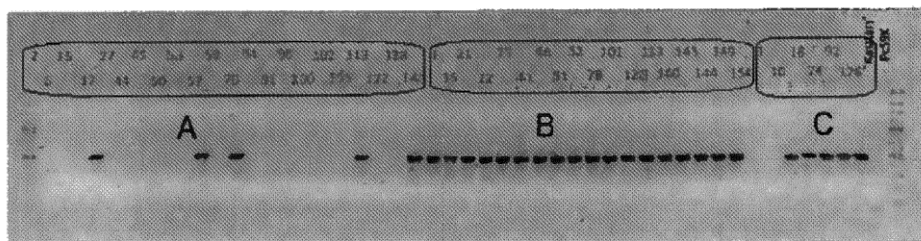


Fig.3