

## RAPORT Z REALIZACJI PROJEKTU

"Metoda identyfikacji indukowanej zmienności w kulturach *in vitro*"

(„A method of identifying variability in *in vitro* cultures”)

Projekt realizowany w ramach Programu Operacyjnego Innowacyjna Gospodarka w latach 2010-2014. Priorytet 1. „Badania i rozwój nowoczesnych technologii”. Działanie 1.3 „Wsparcie projektów B+R na rzecz przedsiębiorców realizowanych przez jednostki Naukowe”. Poddziałanie 1.3.2 „Wsparcie ochrony własności przemysłowej tworzonej w jednostkach naukowych w wyniku Prac B+R”. Numer umowy o dofinansowanie UDA-POIG.01.03.02-14-019/10-00.

Podstawowym celem Projektu było przeprowadzenie na terenie Unii Europejskiej, Australii oraz USA procedur patentowych dotyczących sposobu jakościowej i ilościowej oceny zmienności indukowanej w kulturach *in vitro*.

Podstawowe założenia Patentu zostały opisane we wcześniejszym sprawozdaniu, we wnioskach patentowych oraz opublikowane w BMC Plant Biology (Bednarek et al. 2007). Opatentowany system bazuje na ściśle zdefiniowanym materiale biologicznym jakim są wyrównane pod względem (epi)genetycznym materiały roślinne służące jako źródła eksplantatów do wyprowadzania regenerantów na drodze andro- i embriogenezy. Materiały te są poddawane profilowaniu DNA metodą metAFLP, a uzyskane wyniki molekularne służą do oceny ilościowej zmienności indukowanej w kulturach *in vitro*. Taka ocena jest możliwa dzięki zastosowaniu dwóch endonukleaz restrykcji Acc65I i KpnI, które będąc izoschizomerami rozpoznają to samo miejsce restrykcji ale wykazują różnice względem metylacji tego miejsca. Analiza możliwych wzorów prążkowych jakie powstają w wyniku cięcia tych samych preparatów DNA niezależnie Acc65I i KpnI pozwala na wnioskowanie czy zaszła metylacja *de novo*, demetylacja DNA czy też miejsce restrykcji uległo mutacji. Taka analiza danych jest interesująca dla firm zajmujących się wytwarzaniem materiałów roślinnych metodami kultur *in vitro* gdyż może być wykorzystana do wyprowadzania materiałów roślinnych o pożądanym poziomie zmienności (epi)genetycznej. Może również znaleźć zastosowanie w badaniach podstawowych dotyczących wpływu stresów (a)biotycznych na funkcjonowanie genomów roślin.

W ramach niniejszego Projektu została podjęta współpraca z hodowlą roślin DANKO Sp. z o.o. Dzięki początkowo nieoficjalnej współpracy (została sformalizowana w 2013 r) firma DANKO udostępniła materiały roślinne będące liniami DH pszenżyta oraz wyprowadzone przez nią na drodze androgenyzy regeneranty. Materiały te spełniały założenia analizy zmienności indukowanej w kulturach *in vitro* i stanowiły interesujący obiekt badawczy, który umożliwił sprawdzenie metody na wcześniej niebadanym gatunku. Uzyskane wstępne wyniki wykazały, że pszenżyto w trakcie regeneracji *in vitro* ulega demetylacji oraz indukowane są liczne mutacje w

obrębie miejsc restrykcyj. Ciekawym wnioskiem z przeprowadzonych badań był fakt, że analizowane rośliny nie wykazywały żadnych różnic morfologicznych jednocześnie pod względem (epi)genetycznym nie były tożsame z formą donorową. Uzyskane wyniki sprawiły, że wzrosło zainteresowanie firm hodowlanych oceną poziomu zmienności (epi)genetycznej wyprawdzanych metodami kultur *in vitro* materiałów roślinnych.

Zdając sobie sprawę ze znaczenia jakie metoda metAFLP może mieć dla Firm Hodowlanych, jeszcze przed rozpoczęciem projektu, w dniu 22.12.2005 dokonano międzynarodowego zgłoszenia patentowego o numerze PCT/PL2005/000083 pt. „A method of identifying induced variability in *in vitro* cultures”. Ze wspomnianego zgłoszenia wyodrębnione zostały trzy oddzielne postępowania: zgłoszenie europejskie w EPO (PCT/PL2005/000083), zgłoszenie w USA (US numer 12/097,955) oraz zgłoszenie w Australii (AU 2005339395i). Działania te zakończyły się uzyskaniem praw patentowych w Australii, (Patent nr 2005339395; Patent Office, Commonwealth of Australia. 29 of November 2012). Patent EP 1999271 przyznany został 03.07.2013 w Unii Europejskiej. Z powodzeniem przeprowadzono procedury uzyskania praw patentowych w Niemczech, Wielkiej Brytanii, Francji, Hiszpanii i Finlandii. Natomiast działania dotyczące patentowania w USA, ze względu na problemy proceduralne oraz ograniczenia finansowe nie są kontynuowane.

Podejmowane były również starania, których celem było propagowanie objętego procedurą patentową wynalazku. Zostały przeprowadzone rozmowy w USA (Kansas State University, USDA-ARS, Wheat Genetics and Germplasm Improvement) i Polsce.

Niezależnie od powyższego, badania realizowane z wykorzystaniem przedmiotu patentu były prezentowane na konferencjach krajowych i zagranicznych:

1. Konferencja Naukowa - Nauka Dla Hodowli i Nasiennictwa Roślin Uprawnych - 7-11 lutego 2011 w Zakopanem.
2. Kongres Biotechnologii EUROBIOTECH w dniach 12-14 października 2011 roku w Krakowie.
3. Kongres Biotechnologii EUROBIOTECH w dniach 9-14 października 2013 roku w Krakowie.
4. 19<sup>th</sup> General Congress of EUCARPIA „Plant Breeding for Future Generations” (Węgry, Budapeszt), 21-24.05.2012
5. Plant Biotechnology: Green for Good II June 17 – 21, 2013, Olomouc - Czech Republic.

Zgodnie z wymogami projektu podjęto działania których celem było zaprojektowania LOGO. Było ono wykorzystywane we wszystkich oficjalnych prezentacjach powiązanych z Projektem oraz zostało umieszczone na stronie www Instytutu Hodowli i Aklimatyzacji Roślin PIB w Radzikowie.

## **PODSUMOWUJĄC**

Przeprowadzono trzy oddzielne postępowania patentowe. Uzyskano patenty w Australii i Unii Europejskiej (w Niemczech, Wielkiej Brytanii, Francji, Hiszpanii i Finlandii). Został również

spełniony wymóg popularyzacji Patentu zarówno w kraju jak i poza jego granicami. Podejmowane były również działania na rzecz komercjalizacji wynalazku poprzez zainteresowanie możliwościami jego wykorzystania przez Spółki Hodowli Roślin stosujące kultury *in vitro* do wyrównywania materiałów roślinnych oraz nawiązano współpracę z Firmą Hodowlaną, która umożliwiła zweryfikowanie części założeń patentowych na materiałach pszenżytnich.