

SPRAWOZDANIE MERYTORYCZNE

z realizacji zadania na rzecz postępu biologicznego w produkcji roślinnej w 2018 roku

A. INFORMACJE OGÓLNE

Tytuł zadania Piramidyzacja genów odporności na rdzę koronową w genomie owsa oraz identyfikacja i lokalizacja markerów DNA dla tych genów
Numer zadania (w załączniku nr 8 do rozporządzenia Ministra Rolnictwa i Rozwoju Wsi z dnia 29 lipca 2015 r. w sprawie stawek dotacji przedmiotowych dla różnych podmiotów wykonujących zadania na rzecz rolnictwa (Dz. U. z 14 sierpnia 2015 r. poz. 1170)) 31
Planowany okres realizacji zadania 12 miesięcy
Planowane nakłady w zł 72 000

B. DANE WNIOSKODAWCY

Imię i nazwisko osoby reprezentującej jednostkę badawczą, tytuł lub stopień naukowy, stanowisko, nazwa i adres jednostki badawczej, telefon, fax)

**Zbigniew Grądzki, Prof. dr hab., Prorektor ds. Nauki, Wdrożeń i Współpracy Międzynarodowej
Uniwersytet Przyrodniczy w Lublinie
ul. Akademicka 13, 20-950 Lublin
Telefon: 81-445-60-66; Fax: 81-533-35-49, e-mail: biuro.rektora@up.lublin.pl**

C. INFORMACJA O WYKONAWCACH

1. Zespół badawczy

kierownik zadania		
imię i nazwisko	stopień i tytuł naukowy	miejsce zatrudnienia
Edyta Paczos-Grzęda	dr	Uniwersytet Przyrodniczy w Lublinie Instytut Genetyki, Hodowli i Biotechnologii Roślin
wykonawcy zadania		
imię i nazwisko	stopień i tytuł naukowy	miejsce zatrudnienia
Sylwia Sowa	dr inż.	Uniwersytet Przyrodniczy w Lublinie Instytut Genetyki, Hodowli i Biotechnologii Roślin
Aneta Koroluk	mgr inż.	Uniwersytet Przyrodniczy w Lublinie Instytut Genetyki, Hodowli i Biotechnologii Roślin

D. OPIS ZADANIA

1. Cele zadania

Lp.	Cel (zgodnie ze szczegółowym opisem na dany rok)	Czy cel został zrealizowany (tak/nie /częściowo ¹)
1	Określenie patogeniczności izolatów <i>Puccinia coronata</i> zebranych w roku 2017.	TAK
2	Poszukiwanie markerów dla genu odporności <i>Pc51</i> metodą SRAP.	TAK
3	Próba konwersji markerów losowych SRAP dla genu <i>Pc60</i> na markery specyficzne.	TAK
4	Identyfikacja sekwencji DArTseq sprzężonych z obecnością genu <i>Pc60</i> .	TAK
5	Próba konwersji na markery specyficzne sekwencji DArTseq sprzężonych z obecnością genów <i>Pc52</i> oraz <i>Pc60</i> zidentyfikowanych na podstawie całogenomowych analiz polimorfizmu.	TAK

2. Harmonogram realizacji zadania

Lp.	Nazwa tematu badawczego	Termin rozpoczęcia – zakończenia realizacji tematu badawczego w miesiącach od rozpoczęcia realizacji zadania
1	Określenie spectrum patogeniczności izolatów <i>Puccinia coronata</i> . (obejmuje tematy badawcze 1 i 2 planu wieloletniego)	1-12
2	Ocena segregacji genów odporności. (temat badawczy 3 planu wieloletniego)	4-10
3	Piramidyzacja genów. (temat badawczy 4 planu wieloletniego)	4-9
4	Konwersja markerów losowych na specyficzne. (obejmuje tematy badawcze 5, 6 i 8 planu wieloletniego)	1-10
5	Konwersja na markery specyficzne sekwencji zidentyfikowanych na podstawie całogenomowych analiz polimorfizmu. (temat badawczy 7 planu wieloletniego)	7-12

3. Opis tematów badawczych (należy sporządzić opis dla tematów badawczych wymienionych w tabeli powyżej; kolejność zgodnie z tabelą powyżej)

3. 1. Określenie spectrum patogeniczności izolatów *Puccinia coronata*.

Cel tematu badawczego 1

- * Utrzymanie kolekcji 45 linii referencyjnych dla genów odporności na rdzę koronową owsa.
- * Określenie patogeniczności 40 izolatów *Puccinia coronata* wyprowadzonych z populacji skolekcjonowanych w roku 2017 w Czesławicach, Kopaszewie, Polanowicach i Strzelcach względem 45 linii referencyjnych
- * Ocena porażenia linii referencyjnych posiadających zdefiniowane geny odporności w warunkach naturalnej infekcji polowej.
- * Poszerzanie kolekcji izolatów *Puccinia coronata*.

Wyniki

W celu zobrazowania wirulencji populacji rdzy koronowej występującej w 2017 roku na terenie Polski materiał do badań pobierano z miejsc hodowli owsa, gdzie spodziewano się największej presji selekcyjnej na populację patogenu. Izolaty wyprowadzone z populacji grzyba zebranych w Strzelcach wykazały całkowitą awirulencję względem 21 linii z genami *Pc*, populacja *P. coronata* z Kopaszewa była awirulentna wobec 17 testowanych linii, natomiast populacja z Czesławic, wobec 16 linii z genami odporności na rdzę koronową. Populacja patogenu zebrana w Polanowicach wykazała się największą zjadliwością i tylko 14 genów *Pc* pozostawało w pełni efektywnych względem izolatów pochodzących z tej miejscowości.

Wśród testowanych 45 linii referencyjnych z genami odporności (*Pc*) w stadium siewki najsilniej porażona była linia *Pc35*, względem której wirulencję wykazało ponad 50% izolatów z Czesławic, Kopaszewa i Polanowic. Bardzo niskim poziomem odporności wykazały się również linie z genami *Pc38*, *Pc45*, *Pc56*, *Pc63* USA oraz *Pc103-1* Kan. Pełną odpornością w stadium siewki charakteryzowały się linie zawierające geny *Pc50* Kan, *Pc51* Kan, *Pc51* USA, *Pc52*, *Pc57*, *Pc59* USA, *Pc68*, *Pc71* oraz *Pc91*, które nie zostały przełamane przez żaden z testowanych izolatów (Wyk. 3). Odporność warunkowaną genami *Pc70*, *Pc59* Kan, *Pc46* Kan, *Pc50* USA oraz *Pc104* Kan przełamały w niewielkim stopniu jedynie pojedyncze izolaty, ponadto wysokim poziomem odporności wykazały się linie z genami *Pc101* Kan oraz *Pc98* Kan.

W celu oceny porażenia linii referencyjnych z genami *Pc* w warunkach naturalnej infekcji polowej założono doświadczenia polowe w czterech lokalizacjach: Czesławicach, Strzelcach, Kopaszewie i Polanowicach. Ocenę porażenia przez rdzę koronową w warunkach naturalnej infekcji polowej przeprowadzono dwukrotnie w trakcie wegetacji. Spośród wszystkich odczytów zanotowano najwyższy stopień porażenia badanych linii owsa zwyczajnego. Typ infekcji „0” oceniano jako odporność linii *Pc*.

Największe porażenie grzybem *P. coronata* na poziomie ok. 80% zaobserwowano w Strzelcach i Czesławicach. W Kopaszewie przełamanych zostało 20 testowanych linii, natomiast w Polanowicach, zaledwie 15. Przeprowadzona ocena pozwala uznać za najbardziej efektywne w warunkach naturalnej infekcji polowej, w stadium rośliny dorosłej geny *Pc51* USA, *Pc52*, *Pc58* USA, *Pc59* Kan, *Pc91* oraz *Pc94* USA. W żadnej z lokalizacji nie stwierdzono infekcji linii z tymi genami. Inne, wartościowe w stadium rośliny dorosłej geny to: *Pc51* Kan, *Pc53*, *Pc58* Kan oraz *Pc60*, a także *Pc50* Kan, *Pc70* oraz *Pc71*.

. W Czesławicach, Polanowicach, Kopaszewie i Strzelcach z 10 losowo wybranych poletek zebrano populacje *Puccinia coronata*. W trakcie czterokrotnych pasażów pojedynczych kolonii grzyba wyprowadzono po 10 izolatów *Puccinia coronata* z każdej lokalizacji. Izolaty zamrożono w temp. -70 °C do czasu oceny spectrum patogeniczności w kolejnym roku badań .

Wnioski

1. Izolaty wyprowadzone z populacji *P. coronata* zebranych w roku 2017 w Strzelcach wykazały całkowitą awirulencję względem 21 linii z genami *Pc*, populacja z Kopaszewa była awirulentna wobec 17 testowanych linii, natomiast z Czesławic, wobec 16 linii.
2. Największą zjadliwością wykazała się populacja patogenu skolekcjonowana w roku 2017 w Polanowicach. W pełni efektywnych względem izolatów pochodzących z tej miejscowości pozostało 14 genów *Pc*.
3. Geny, które nie powinny być wykorzystywane w hodowli odpornościowej w warunkach Polski, gdyż warunkują najniższy spośród badanych poziom odporności, to *Pc35*, *Pc38*, *Pc45*, *Pc56*, *Pc63* USA oraz *Pc103-1* Kan.
4. Pełną odporność w stadium siewki warunkowały geny *Pc50* Kan, *Pc51* Kan, *Pc51* USA, *Pc52*, *Pc57*, *Pc59* USA, *Pc68*, *Pc71* oraz *Pc91*, które nie zostały przełamane przez żaden z testowanych izolatów.
5. Odporność warunkowaną genami *Pc70*, *Pc59* Kan, *Pc46* Kan, *Pc50* USA oraz *Pc104* Kan przełamały w niewielkim stopniu jedynie pojedyncze izolaty.
6. W roku 2018 najsilniejsze porażenie grzybem *P. coronata* na poziomie ok. 80% zaobserwowano w Strzelcach i Czesławicach.
7. Przeprowadzona ocena pozwala uznać za najbardziej efektywne w warunkach naturalnej infekcji polowej, w stadium rośliny dorosłej geny *Pc51* USA, *Pc52*, *Pc58* USA, *Pc59* Kan, *Pc91* oraz *Pc94*.
8. Inne, wartościowe w stadium rośliny dorosłej geny to: *Pc51* Kan, *Pc53*, *Pc58* Kan oraz *Pc60*, a także *Pc50* Kan, *Pc70* oraz *Pc71*.

Mierniki dla tematu badawczego 1

Lp.	miernik	wartość miernika podana w opisie zadania	wartość miernika zrealizowana
1.	Liczba izolatów analizowanych pod kątem patogeniczności względem 45 linii referencyjnych.	40	40
2.	Liczba linii referencyjnych ocenianych w warunkach naturalnej infekcji polowej w czterech lokalizacjach.	45	45
3.	Liczba populacji, z których zostaną wyprowadzone izolaty.	4	4

3. 2. Ocena segregacji genów odporności

Cel tematu badawczego 2

- * Ocena segregacji genów odporności w 4 populacjach mieszańców F_2 .
- * Ocena segregacji genów odporności w populacji mapującej F_3 E635 (*Pc51U* × Kasztan) na podstawie testów żywiciel-patogen w warunkach laboratoryjnych.

Wyniki

Rośliny pokolenia F_2 czterech populacji mapujących: E983, E630/1, E990 oraz E656 poddano ocenie rozszczepteń odporności na rdzę koronową w warunkach laboratoryjnych wykonując test dla 50 siewek przy wykorzystaniu czterech izolatów nie przełamujących odporności warunkowanej odpowiednio przez geny *Pc50K*, *Pc50U*, *Pc59K* oraz *Pc59U*.

Aby stwierdzić, że odporność warunkowana jest obecnością genu głównego o charakterze dominującym, należy zaobserwować stosunek rozszczepteń fenotypów w pokoleniu F_2 zbliżony do 3:1. Rośliny porażone to homozygoty recesywne, zaś odporne to zarówno homozygoty dominujące, jak i heterozygoty. Ocena rozszczepteń roślin F_2 w warunkach laboratoryjnych, izolatami wywołującym

podobną reakcją do reakcji w stadium rośliny dorosłej w warunkach polowych umożliwiłaby identyfikację odpornych homozygot dominujących już na etapie siewki.

Na podstawie oceny porażenia 50 roślin reprezentujących populacje z genami odporności *Pc50K*, *Pc50U*, *Pc59K* i *Pc59U* (Tab.6) stwierdzono, że w trzech spośród badanych populacji oprócz genów głównych występują również allele warunkujące odporność o mniejszym znaczeniu, które modyfikują aktywność genu głównego. W przypadku populacji z genem *Pc50U* profile porażenia były jednakowe dla różnych izolatów, co wskazuje, że możliwe jest identyfikowanie za ich pomocą efektu działania genu głównego. Najbardziej skomplikowany obraz uzyskano dla populacji z genem *Pc50K*. Wydaje się, że w linii tej występują dodatkowe geny mające wpływ na ekspresję genu głównego, zarówno o charakterze dominującym, jak i recesywnym. Na podstawie przeprowadzonych analiz można wytypować izolaty do testowania populacji na poziomie F_3 w celu identyfikacji homo- i heterozygot.

Rozszczepienie pod względem odporności obserwowano również w stadium rośliny dorosłej w warunkach naturalnej infekcji polowej. Stosunek rozszczepień 3:1 stwierdzono w przypadku populacji z genami *Pc59K* i *Pc59U*. Obserwacja porażenia roślin reprezentujących populację z genami *Pc50U* i *Pc50K* nie wskazywała na obecność jednego genu głównego.

Ocenie porażenia w stadium siewki w warunkach laboratoryjnych poddano również 200 linii F_3 populacji E635 (*Pc51*) w celu określenia jednocześnie genotypu i fenotypu analizowanych roślin. Do tego celu wykorzystano izolaty *P coronata* CR230 oraz CR257.

Po weryfikacji otrzymanych wyników za pomocą testu χ^2 stwierdzono proporcję rozszczepień: 2 linie heterozygotyczne: 1 linia odporna: 1 linia wrażliwa. Zastosowane izolaty pozwalają na identyfikację genu głównego *Pc51* w analizowanych mieszańcach i wytypowanie roślin F_2 do analiz polimorfizmu DNA w celu poszukiwania markera molekularnego. Pomimo innego profilu wirulencji obu izolatów obserwowano identyczne fenotypy badanych linii F_3 .

Wnioski

1. W wyniku przeprowadzonych testów wytypowano izolaty, które w latach kolejnych mogą posłużyć do identyfikacji homozygot w pokoleniu F_3 dla populacji z genami *Pc50K*, *Pc50U*, *Pc59K* i *Pc59U*.
2. Obserwacje polowe umożliwiły identyfikację form odpornych i wrażliwych w warunkach naturalnej infekcji w stadium rośliny dorosłej, co umożliwi wytypowanie korespondującego izolatu do przeprowadzenia analiz w stadium siewki.
3. Zidentyfikowane homozygoty w populacji 635 posłużyły do poszukiwania markerów molekularnych dla genu odporności *Pc51U* w ramach zadania 3.4.

Mierniki dla tematu badawczego 2

Lp.	miernik	wartość miernika podana w opisie zadania	wartość miernika zrealizowana
1.	Liczba populacji mapujących F_2 poddanych rozmnożeniu i wstępnej ocenie rozszczepień.	4	4
2.	Liczba linii F_3 ocenianych pod względem odporności na rdzę w warunkach laboratoryjnych.	200	200

3. 3. Piramidyżacja genów.

Cel tematu badawczego 3

- * Przeprowadzenie krzyżowań mających na celu uzyskanie mieszańców dwugenowych i trójgenowych pomiędzy formami ze zdefiniowanymi genami odporności
- * Fenotypowanie mieszańców F₁ uzyskanych w roku poprzednim

Wyniki

Przeprowadzono krzyżowania mające na celu uzyskanie mieszańców dwugenowych pomiędzy formami ze zdefiniowanymi genami odporności, czyli pomiędzy odmianą Celer, a roślinami reprezentującymi odmiany lub linie referencyjne z wysoce efektywnymi genami odporności: *Pc50K*, *Pc50U*, *Pc59U*.

Tab.1. Efektywność krzyżowań mieszańców dwugenowych.

Forma mateczna	Forma ojcowska	Liczba wykastrowanych i zapylonych wiech	Liczba wykastrowanych kwiatków	Liczba zawiązanych ziarniaków	Efektywność krzyżowania (%)
Celer	<i>Pc 50K</i>	2	21	1	4,76
Celer	<i>Pc 50U</i>	5	47	4	8,51
Celer	<i>Pc 59U</i>	4	40	4	10
Suma		11	108	9	-
Średnia		-	36	3	7,76

W celu uzyskania mieszańców wykastrowano 108 kwiatków w 11 wiechach uzyskując 9 ziarniaków (Tab. 1). Średnia efektywność krzyżowania wyniosła 7,76% wahając się od 4,76% w przypadku kombinacji 'Celer' × *Pc50K* do 10% dla kombinacji 'Celer' × *Pc59U*. Otrzymano wszystkie zaplanowane kombinacje mieszańców dwugenowych.

Tab.2. Efektywność krzyżowań mieszańców trójgenowych.

Forma mateczna	Forma ojcowska	Liczba wykastrowanych i zapylonych wiech	Liczba wykastrowanych kwiatków	Liczba zawiązanych ziarniaków	Efektywność krzyżowania (%)	Wprowadzone geny
1001 (<i>Pc52</i> ×Celer <i>Pc39</i>)	1004 (<i>Pc60</i> ×Celer <i>Pc39</i>)	1	10	5	50,00	<i>Pc52</i> + <i>Pc39</i> + <i>Pc60</i>
1003 [<i>Pc52</i> ×968(<i>Pc52</i> × <i>Pc39</i>)]	1006 (<i>Pc70</i> ×Celer <i>Pc39</i>)	2	21	10	47,62	<i>Pc52</i> + <i>Pc39</i> + <i>Pc70</i>
1001 (<i>Pc52</i> ×Celer <i>Pc39</i>)	1002 (<i>Pc52</i> ×NAM2 <i>Pc91</i>)	2	16	4	25,00	<i>Pc52</i> + <i>Pc39</i> + <i>Pc91</i>
1014 [968(<i>Pc52</i> × <i>Pc39</i>)×969 (<i>Pc52</i> × <i>Pc39</i>)]	1049 (Celer <i>Pc39</i> × <i>Pc51</i>)	2	19	5	26,32	<i>Pc52</i> + <i>Pc39</i> + <i>Pc51</i>
Suma		7	66	24	-	
Średnia		-	17	6	37	

Komponentami były również kombinacje mieszańcowe F₁ wyprowadzone w roku poprzednim, krzyżowane w celu uzyskania mieszańców trójgenowych (Tab.2). Wykastrowano 66 kwiatków w 7 wiechach otrzymując 24 ziarniaki. Średnia efektywność krzyżowania wyniosła 37%. Najwyższą efektywność 50% osiągnięto dla kombinacji 1001×1004, zaś najniższą 25% dla kombinacji 1001×1002.

Mieszańce F₁ reprezentujące 5 kombinacji poddano ocenie fenotypowej (Tab.3.). Wartość poszczególnych cech, w zależności od kombinacji, charakteryzowała się dużą zmiennością. Wstępna ocena odporności mieszańców w warunkach naturalnej infekcji polowej wskazuje, że formy te charakteryzują odporność w stadium rośliny dorosłej.

Tab. 3. Ocena fenotypowa mieszańców kombinacje krzyżówkowych F₁.

Nr kombinacji	Forma mateczna	Forma ojcowska	Nr rośliny	Wysokość [cm]	Liczba pędów prod.	Liczba niedogonów	Długość wiechy [cm]	Liczba kłosków	Liczba ziarniaków	Masa ziarniaków [g]	Masa reszty ziarni [g]	Liczba resz ziarn
1	<i>Pc52</i>	968 (552 <i>Pc52</i> ×310 <i>Pc39</i>)	1003/1	103	2	2	18	56	88	3,96	0,82	26
1	<i>Pc52</i>	968 (552 <i>Pc52</i> ×310 <i>Pc39</i>)	1003/2	90	4	0	20	31	53	2,07	2,12	62
1	<i>Pc52</i>	968 (552 <i>Pc52</i> ×310 <i>Pc39</i>)	1003/3	76	4	0	18	56	75	4,28	5,00	123
1	<i>Pc52</i>	968 (552 <i>Pc52</i> ×310 <i>Pc39</i>)	1003/4	111	3	0	20	33	74	2,99	2,72	64
2	<i>Pc60</i>	<i>Celer Pc39</i>	1004/1	100	10	2	21	41	88	3,79	26,86	620
2	<i>Pc60</i>	<i>Celer Pc39</i>	1004/2	87	2	4	22	36	70	3,04	4,73	108
2	<i>Pc60</i>	<i>Celer Pc39</i>	1004/3	91	6	0	22	33	72	3,06	10,1	340
2	<i>Pc60</i>	<i>Celer Pc39</i>	1004/4	90	5	0	20	31	56	2,18	6,64	500
2	<i>Pc60</i>	<i>Celer Pc39</i>	1004/5	87	5	0	20	25	54	1,92	5,84	150
3	<i>Pc70</i>	<i>Celer Pc39</i>	1005/1	103	3	0	18	38	89	3,29	2,91	70
3	<i>Pc70</i>	<i>Celer Pc39</i>	1005/2	96	3	0	15	37	60	2,23	1,37	38
3	<i>Pc70</i>	<i>Celer Pc39</i>	1005/3	102	3	0	17	32	61	2,21	2,41	64
3	<i>Pc70</i>	<i>Celer Pc39</i>	1005/4	107	4	1	15	40	76	2,88	3,17	97
3	<i>Pc70</i>	<i>Celer Pc39</i>	1005/5	112	3	1	24	56	114	4,31	3,67	94
3	<i>Pc70</i>	<i>Celer Pc39</i>	1005/6	97	3	0	20	37	71	2,56	4,12	111
3	<i>Pc70</i>	<i>Celer Pc39</i>	1006/1	112	6	3	22	53	105	4,05	15,64	580
3	<i>Pc70</i>	<i>Celer Pc39</i>	1006/2	99	6	3	22	54	103	4,11	15,86	620
3	<i>Pc70</i>	<i>Celer Pc39</i>	1006/3	106	4	3	24	52	110	4,01	7,77	340
4	<i>Pc51U</i>	<i>Celer Pc39</i>	1026/1	91	5	0	18	32	67	2,64	3,96	105
4	<i>Pc51U</i>	<i>Celer Pc39</i>	1026/2	89	3	1	19	18	44	1,72	3,90	108
4	<i>Pc51U</i>	<i>Celer Pc39</i>	1026/3	82	3	0	17	27	54	1,79	2,33	72
4	<i>Pc51U</i>	<i>Celer Pc39</i>	1026/4	91	3	0	18	23	48	1,72	4,15	113
4	<i>Pc51U</i>	<i>Celer Pc39</i>	1026/5	88	3	1	15	22	44	1,63	2,71	79
5	<i>Celer Pc39</i>	<i>Pc71</i>	979/1	98	3	1	20	56	99	4,12	5,52	142

Wnioski

1. W efekcie prowadzonych krzyżowań uzyskano kombinacje genów *Pc39* i *Pc52* z czterema innymi genami: *Pc51U*, *Pc60*, *Pc70* i *Pc91*.
2. Cechy plonotwórcze uzyskanych mieszańców dwugenowych pokolenia F₁ wskazują na możliwość selekcji wśród nich form o korzystnym układzie alleli o znaczeniu agronomicznym.

Mierniki dla tematu badawczego 3

Lp.	miernik	wartość miernika podana w opisie zadania	wartość miernika zrealizowana
1.	Liczba nowych kombinacji dwugenowych	3	3
2.	Liczba nowych kombinacji trójgenowych	4	4
3.	Liczba fenotypowanych kombinacji F ₁	5	5

3. 4. Konwersja markerów losowych na specyficzne.

Cel tematu badawczego 4

- * Genotypowanie mieszańców F₂ homozygotycznych pod względem odporności na rdzę koronową w celu identyfikacji potencjalnych markerów dla genu odporności *Pc51* z wykorzystaniem metody SRAP.
- * Konwersja markerów losowych SRAP dla genu *Pc60* na markery specyficzne.

Wyniki

Spośród 500 testowanych par starterów na podstawie zdjęć rozdziałów elektroforetycznych wyselekcjonowano 27, z udziałem których reakcję powtórzono na losowo wybranym zestawie DNA 5 homozygot odpornych i 5 wrażliwych pokolenia F₂ populacji E635 (Tab. 4). Po przeprowadzeniu reakcji PCR produkty rozdzielono elektroforetycznie i po zweryfikowaniu powtarzalności pojawiających się wzorów prążkowych wybrano 2 pary starterów dających powtarzalny produkt i dla nich nastawiono reakcje na matrycach DNA 12 odpornych i 12 wrażliwych osobników populacji E635.

Tab. 4. Pary starterów SRAP potencjalnie amplifikujące produkt różnicujący genotypy odporne i wrażliwe na rdzę koronową w populacji E635.
Kolorem zielonym oznaczono pary starterów wytypowane do dalszych analiz

Kombinacja	Nr	Starter F	Starter R	Wielkość produktu (pz)	Fenotyp, u którego wystąpił prążek
2+45	1	Me10	Em15	420	odporny
5+44	2	Me15	Em14	320	odporny
6+46	3	Me16	Em16	500	odporny
6+47	4	Me16	Em17	250	odporny
6+56	5	Me16	Em25	250	odporny
6+61	6	Me16	Em3	350	odporny
9+52	7	Me19	Em21	210	odporny
10+59	8	Me2	Em28	50	odporny
12+49	9	Me21	Em19	150	porażony
13+55	10	Me22	Em24	880	odporny
13+70	11	Me22	em20_ep1	320	odporny
15+68	12	Me24	Em30	1400	odporny
16+41	13	Me25	Em11	490	porażony
17+43	14	Me26	Em13	270 i 480	odporny
17+46	15	Me26	Em16	340	odporny
17+47	16	Me26	Em17	820	odporny
17+61	17	Me26	Em3	480	odporny
17+63	18	Me26	Em5	350	porażony
17+70	19	Me26	em20_ep1	350 i 550	porażony
18+43	20	Me3	Em13	510	odporny

Kombinacja	Nr	Starter F	Starter R	Wielkość produktu (pz)	Fenotyp, u którego wystąpił prążek
18+60	21	Me3	Em29	490	odporny
19+40	22	Me4	Em1	180	odporny
19+63	23	Me4	Em5	700	odporny
19+64	24	Me4	Em6	1000	odporny
21+48	25	Me6	Em18	580	odporny
21+51	26	Me6	Em20	500 i 1000	odporny
24+51	27	Fsrp13	Em20	80	odporny

Analiza rozdziału elektroforetycznego produktów amplifikacji pozwoliła wytypować 1 parę starterów nr 2 (Me15+Em14), z udziałem której nastawiono reakcje na 20 homozygotycznych roślinach odpornych i 20 homozygotycznych roślinach wrażliwych pod względem odporności na rdzę koronową w obrębie populacji E635. Potencjalnie różnicujący produkt oznaczony strzałką na Fot. 3 okazał się być niestabilny i niepowtarzalny, dlatego zaniechano jego dalszych analiz.

W celu konwersji na markery specyficzne 12 produktów PCR dla genu *Pc60* uzyskanych z udziałem starterów SRAP w roku poprzednim, reakcję z tymi starterami przeprowadzono z DNA 2 homozygotycznych genotypów wrażliwych i odpornych populacji E660. Produkty amplifikacji zostały wyizolowane z żelu, a następnie poddane klonowaniu. Wyniki sekwencjonowania poddano analizie bioinformatycznej przy użyciu oprogramowania MEGA 6.0. W kolejnym etapie poszukiwano sekwencji homologicznych do sekwencji uzyskanych fragmentów DNA w bazie danych GenBank NCBI z wykorzystaniem narzędzia BLAST. Na podstawie sekwencji DNA uzyskanych produktów SRAP zaprojektowano specyficzne startery. W pierwszym etapie oceny starterów przeprowadzono reakcje PCR z DNA dwóch roślin odpornych i dwóch porażonych. W przypadku tych kombinacji, które identyfikowały polimorfizm odpowiadający fenotypom, reakcję powtórzono na 4 roślinach odpornych i porażonych. W przypadku dwóch sekwencji SRAP, oznaczonych jako 54 i 62 uzyskano bardzo obiecujące wyniki. Do oceny na całej populacji 660, zawierającej segregujący gen *Pc60* wybrano pary starterów: 54_F1 + 54_R1 oraz 62_F1 + 62_R3. Niestety żadna z par starterów nie inicjowała amplifikacji, która w jednoznaczny sposób odróżniałaby formy odporne od porażonych.

Wnioski

1. W celu identyfikacji markerów specyficznych dla genu odporności *Pc51* przetestowano 500 kombinacji starterów SRAP.
2. Spośród 500 analizowanych kombinacji starterów SRAP wstępnie wyselekcjonowano 27, które inicjowały na próbach zbiorczych o przeciwstawnych fenotypach (odpornych/porażonych) syntezę produktów różnicujących.
3. Amplifikacja z wytypowanymi starterami z wykorzystaniem jako matrycy DNA pojedynczych roślin nie potwierdziła specyficzności amplifikowanych z ich udziałem produktów względem określonego fenotypu warunkowanego allelem *Pc51* lub *pc51*.
4. Konwersji na markery specyficzne dla genu *Pc60* poddano 12 potencjalnych markerów SRAP zidentyfikowanych w roku poprzednim, spośród których tylko dwa identyfikowały rośliny odporne i porażone w populacji E660 segregującej pod względem odporności warunkowanej tym genem.

Mierniki dla tematu badawczego 4

Lp.	miernik	wartość miernika podana w opisie zadania	wartość miernika zrealizowana
1.	Liczba testowanych par starterów SRAP	500	500
2.	Liczba konwertowanych markerów SRAP	12	12

3. 5. Konwersja na markery specyficzne sekwencji zidentyfikowanych na podstawie całogenomowych analiz polimorfizmu

Cel tematu badawczego 5

- * Identyfikacja sekwencji DArTseq sprzężonych z obecnością genu odporności *Pc60*.
- * Próba konwersji na markery specyficzne sekwencji DArTseq sprzężonych z obecnością genów *Pc52* oraz *Pc60* zidentyfikowanych na podstawie całogenomowych analiz polimorfizmu.

Wyniki

Analizy DArTseq przeprowadzono dla form rodzicielskich oraz 44 homozygotycznych pod względem genu odporności *Pc60/pc60* roślin F_2 populacji E660 (*Pc60* × Kasztan) w roku 2017. Identyfikację sekwencji DArT sprzężonych z obecnością genu odporności *Pc60* przeprowadzono w oparciu o analizę zgodności segregacji markerów molekularnych w populacji pokolenia F_2 z fenotypem roślin pokolenia F_3 na matrycach uzyskanych w roku poprzednim po analizie DArTseq. Po zaprojektowaniu starterów specyficznych do wybranych sekwencji, przeprowadzono reakcję PCR wykorzystując jako matryce DNA dwóch roślin porażonych oraz dwóch roślin odpornych z populacji E660. Reakcje przeprowadzono dla 35 par starterów.

W kolejnym etapie dla wyselekcjonowanych par starterów przeprowadzono reakcję z 4 DNA roślin odpornych i 4 DNA roślin porażonych, następnie najlepiej segregujące markery poddano amplifikacji na DNA 12 homozygot odpornych z genem *Pc60* oraz 12 homozygot. Na podstawie uzyskanych wyników do amplifikacji na DNA reprezentującym całą populację E660 wybrano dwie kombinacje starterów *Pc60_21_F1+R1* oraz *Pc60_38_F2+R2*. Niestety nie uzyskano segregacji typu 0/1, co oznacza, że uzyskane markery mogą mieć zastosowanie w analizach naukowych, ale bardzo trudna będzie ich adaptacja w hodowli odpornościowej.

W oparciu o sekwencje DArTseq sprzężone z obecnością genu *Pc52* zidentyfikowane w roku poprzednim zaprojektowano startery specyficzne. Analizie poddano 5 sekwencji markerowych: 20588937, 13739674, 13739682, 13740104 oraz 20619220. Na podstawie sekwencji markerów zaprojektowano startery specyficzne i przeprowadzono reakcje z DNA 4 roślin odpornych populacji E552 (*Bingo* × *Pc52*) oraz 4 roślin porażonych. Na podstawie przeprowadzonego screeningu do dalszych etapów na 10 roślinach odpornych z genem *Pc52* i 10 roślinach porażonych wybrano 8 kombinacji starterów z których następnie do reakcji amplifikacji na DNA całej populacji E552 wybrano tylko dwa: *Pc52_82_F1+R1* oraz *Pc52_20_F1+R1* (Fot. 15).

Wnioski

1. Do analiz wytypowano 21 sekwencji DArT sprzężonych z obecnością genu odporności *Pc60*.
2. Konwersję przeprowadzono dla 5 sekwencji DArT specyficznych dla genu *Pc60* oraz dla 5 sekwencji wytypowanych w roku ubiegłym dla genu *Pc52*.
3. Żadna z konwertowanych sekwencji zarówno w przypadku genu *Pc52*, jak i *Pc60* nie segregowała zgodnie z fenotypem badanych roślin.

Mierniki dla tematu badawczego 5

Lp.	miernik	wartość miernika podana w opisie zadania	wartość miernika zrealizowana
1.	Liczba analizowanych matryc DArTseq	1	1
2.	Liczba sekwencji DArT konwertowanych do warunków specyficznego PCR	10	10