

**SPRAWOZDANIE MERYTORYCZNE****z realizacji zadania na rzecz postępu biologicznego w produkcji roślinnej w 2018 roku****A. INFORMACJE OGÓLNE**

Tytuł zadania – <b>Identyfikacja i lokalizacja markerów DNA dla wybranych genów odporności na mączniaka prawdziwego w owsie zwyczajnym oraz piramidyzacja efektywnych genów odporności w genomie owsa.</b>
Numer zadania <i>(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 2015 r., poz. 1170))</i> - <b>91</b>
Planowany okres realizacji zadania <b>2018</b>
Planowane nakłady w zł <b>81 000</b>

**B. DANE WNIOSKODAWCY**

Imię i nazwisko osoby reprezentującej jednostkę badawczą, tytuł lub stopień naukowy, stanowisko, nazwa i adres jednostki badawczej, telefon, fax) <b>Prorektor ds. Nauki Wdrożeń i Współpracy Międzynarodowej</b> <b>prof. dr hab. Zbigniew Grądzki</b> <b>Uniwersytet Przyrodniczy w Lublinie</b> <b>ul. Akademicka 13</b> <b>20-950 Lublin</b> <b>tel. (+ 81) 445-68-68</b>
---

## C. INFORMACJA O WYKONAWCACH

### 1. Zespół badawczy

Kierownik zadania		
imię i nazwisko	stopień i tytuł naukowy	miejsce zatrudnienia
Sylwia Okoń	Dr hab.	UP w Lublinie
Wykonawcy zadania		
imię i nazwisko	stopień i tytuł naukowy	miejsce zatrudnienia
Krzysztof Kowalczyk	prof. dr hab.	UP w Lublinie
Edyta Paczos-Grzęda	Dr	UP w Lublinie
Justyna Leśniowska-Nowak	Dr	UP w Lublinie
Tomasz Ociepa	mgr inż.	UP w Lublinie
Aleksandra Nucia	mgr inż.	UP w Lublinie

## D. OPIS ZADANIA

### 1. Cele zadania

Lp.	Cel (zgodnie ze szczegółowym opisem na dany rok)	Czy cel został zrealizowany (tak/nie <sup>1</sup> /częściowo <sup>1</sup> )
1	Ocena efektywności genów odporności na mączniaka prawdziwego w warunkach polowych	TAK
2	Analiza zmienności wirulencji oraz zróżnicowania genetycznego populacji mączniaka prawdziwego występującej na terenie Polski	TAK
3	Identyfikacja losowych markerów DNA specyficznych dla pul roślin odpornych w populacjach Canyon× Fuchs i Canyon x Sam	TAK
4	Identyfikacja markerów DArT sprzężonych z nowym genem odporności zidentyfikowanym w odmianie Canyon	TAK
5	Konwersja losowych markerów RAPD i SRAP sprzężonych z genami <i>Pm4</i> , <i>Pm7</i> oraz genem zidentyfikowanym w odmianie Canyon	TAK
6	Konwersja markerów silicoDArT sprzężonych z genami odporności na mączniaka prawdziwego w system oparty na PCR	TAK

### 2. Harmonogram realizacji zadania

Harmonogram realizacji zadania należy sporządzić w tabeli, dla każdego z planowanych tematów badawczych z uwzględnieniem ilości planowanych testów/prób/linii na których prowadzone będą badania. Proszę podać koszty realizacji poszczególnych tematów badawczych.

Proszę wyróżnić etapy (tematy badawcze), określić czas ich trwania w miesiącach od rozpoczęcia projektu i przewidywane koszty. Terminy realizacji tematów badawczych mogą się zająć. Suma kosztów tematów badawczych musi być równa całkowitemu kosztowi zadania.

Lp.	Nazwa tematu badawczego	Termin rozpoczęcia – zakończenia realizacji tematu badawczego w miesiącach od rozpoczęcia realizacji zadania	Przewidywane koszty realizacji tematu badawczego
1	Analiza efektywności genów odporności na mączniaka prawdziwego w warunkach polowych oraz ocena poziomu wirulencji i zróżnicowania genetycznego populacji mączniaka prawdziwego występującego na terenie Polski.	1-7	12 000
3	Piramidyzacja i wprowadzanie do genomu owsa	6-9	10 000

<sup>1</sup> Jeśli dotyczy – proszę opisać pod tabelą, w jakim stopniu cel został osiągnięty i podać przyczyny

	efektywnych genów odporności przeciwko mączniakowi prawdziwemu na drodze krzyżowania roślin		
4	Genotypowanie form rodzicielskich i mieszańców F <sub>2</sub> homozygotycznych pod względem odporności na mączniaka prawdziwego z wykorzystaniem technik RAPD i SRAP.	1-6	10 000
5	Genotypowanie populacji z wykorzystaniem całogenomowych analiz typu DArTseq	1-12	19 000
6	Konwersja markerów losowych na markery specyficzne.	1-12	30 000
<b>RAZEM</b>			<b>81 000</b>

UWAGA: Nie są tematami badawczymi czynności techniczne służące wykonaniu zadania np. zakup materiałów, utrzymanie roślin w szklarni, opracowanie statystyczne wyników, opracowanie raportów i sprawozdań.

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

#### 3.1 Temat badawczy 1: Analiza efektywności genów odporności na mączniaka prawdziwego w warunkach polowych oraz ocena poziomu wirulencji i zróżnicowania populacji mączniaka prawdziwego występującego na terenie Polski

Celem zadania 1 była ocena poziomu efektywności opisanych do tej pory genów odporności na mączniaka prawdziwego w owsie w warunkach polowych. Celem zadania 1 była również analiza zmienności populacji mączniaka prawdziwego owsa na terenie kraju w 2017 r, której głównym założeniem była ocena zmian wirulencji patogenu w stosunku do najbardziej efektywnych genów odporności na mączniaka prawdziwego. Ponadto w ramach zadania 1 został oceniony poziom zróżnicowania genetycznego kolekcji izolatów mączniaka prawdziwego pochodzących z różnych części Polski.

#### ***Materiały i metody (opisać jak w publikacji)***

Przedmiotem badań w zakresie analizy efektywności genów odporności na mączniaka prawdziwego w warunkach polowych były odmiany i linie owsa posiadające określone geny odporności na mączniaka prawdziwego: Jumbo – *Pm1*, Mostyn – *Pm3*, Av1860- *Pm4*, Am25 – *Pm5*, Bruno- *Pm6*, APR122 – *Pm7*, Fuchs nieposiadająca genów odporności na mączniaka prawdziwego, Canyon - posiadająca efektywne, ale jeszcze niescharakteryzowane źródło odporności na mączniaka prawdziwego.

Ziarniaki form kontrolnych wysiano w czterech lokalizacjach: Kopaszewo - Hodowla Roślin DANKO, Strzelce - Hodowla Roślin Strzelce, Polanowice - Małopolskiej Hodowli Roślin, Czesławice koło Nałęczowa – Gospodarstwo Doświadczalne Uniwersytetu Przyrodniczego w Lublinie.

Formy kontrolne wysiano na poletkach 2-rzędowych o długości 1 m (powierzchnia 0,2m<sup>2</sup>), w siewie gęstym, rzutowym (ok. 200 ziarniaków na m<sup>2</sup>). Rozstawa rzędów wynosiła 20cm. W każdej lokalizacji doświadczenie założono w dwóch powtórzeniach.

Porażenie mączniakiem prawdziwym zestawu linii kontrolnych, w warunkach infekcji naturalnej, prowadzono w 9-cio stopniowej skali, gdzie 9 oznacza brak porażenia przez mączniaka prawdziwego, 1- porażenie, w którym objawy widoczne są na całej powierzchni liścia

Przedmiotem badań w zakresie analizy struktury populacji mączniaka prawdziwego owsa była kolekcja izolatów mączniaka prawdziwego owsa zebrana w 2017 roku w różnych lokalizacjach na terenie kraju. Głównym założeniem tych analiz było określenie zmienności występującej w populacji patogenu i ocena możliwości przełamania przez istniejące rasy patogenu odporności warunkowanej najbardziej efektywnymi w chwili obecnej genami odporności na mączniaka prawdziwego.

Jednozardnikowe izolaty mączniaka prawdziwego wyprowadzono z populacji patogenu zebranych w 2017 roku w różnych częściach kraju. Zostały one przetestowane na zestawie linii kontrolnych z wykorzystaniem testów żywiciel-patogen. Fragmenty liści 10-dniowych siewek genotypów kontrolnych (Jumbo – *Pm1*, Cc3678-*Pm2*, Mostyn – *Pm3*, Av1860- *Pm4*, Am27-*Pm5*, Bruno- *Pm6* i APR122 – *Pm7* oraz odmian wrażliwych Fuchs i Sam) wyłożono na szalki Petriego wypełnione do połowy pożywką agarową z dodatkiem beznymidazolu (6g agaru na 1l wody i 35 mg/l benzimidazolu). Szalki z fragmentami liści zostały poddane inokulacji zarodnikami poszczególnych izolatów mączniaka prawdziwego. Po inokulacji szalki umieszczono w fitotronie w następujących warunkach: temperatura 18°C, wilgotność 80% i fotoperiod 16/8. Po 10 dniach od inokulacji oceniono stopień porażenia analizowanych odmian przez izolaty mączniaka prawdziwego. Zastosowano skalę 5-stopniową, w której 0 oznacza brak infekcji, brak widocznych objawów porażenia mączniakiem prawdziwym, 1 – ograniczony rozwój patogenu, widoczne pojedyncze i niewielkie kolonie, 2 – widoczna grzybnia z niewielką ilością zarodników zajmująca mniej niż 20% powierzchni liścia, 3 - grzybnia rozległa zajmująca ponad 20% powierzchni liścia, 4 – obfita grzybnia zajmująca ponad 50% powierzchni liścia.

Uzyskane w testach żywiciel-patogen wyniki zostały przekonwertowane na matrycę 0-1 z uwzględnieniem warunku, że jeżeli symptomy choroby zostały ocenione jako 0,1 lub 2 to izolat klasyfikowano jako awirulentny dla danego genu odporności, natomiast jeśli symptomy choroby zostały ocenione jako 3 lub 4 izolat został sklasyfikowany jako wirulentny dla danego genu. Na podstawie uzyskanej matrycy oceniono frekwencję wirulencji poszczególnych izolatów, ich kompleksowość i zróżnicowanie. Izolaty zostały również zgrupowane w odpowiednie patotypy, określono również podobieństwo patotypów mączniaka prawdziwego występującego w Polsce. Analizy przeprowadzono w oparciu o program HaGiS Tool (Herrmann et al., 1999).

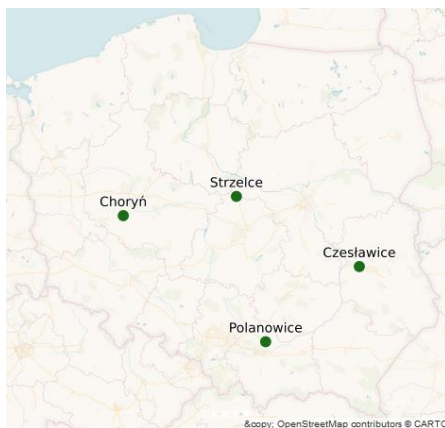
Ocena zróżnicowania genetycznego izolatów mączniaka prawdziwego pochodzących z różnych części Polski została przeprowadzona w oparciu o metodę SRAP. Przedmiotem badań była kolekcja izolatów mączniaka prawdziwego zebrana w różnych częściach kraju w latach 2010-2016. DNA z zarodników patogenu został wyizolowany za pomocą metody CTAB i poddany amplifikacji zgodnie z założeniami metody SRAP w oparciu o zestaw 50 kombinacji starterów.

## **Wyniki**

W 2018 roku objawy mączniaka prawdziwego obserwowano we wszystkich 4 lokalizacjach, w których prowadzono doświadczenia polowe. Jednakże nasilenie objawów było tak niewielkie, że uniemożliwiało wiarygodną ocenę analizowanych linii kontrolnych. Najbardziej porażona była odmiana Fuchs, która nie posiada żadnych genów odporności na mączniaka prawdziwego. Objawy w postaci pojedynczych kolonii obserwowano na liściach odmian Bruno z genem *Pm6*, Jumbo z genem *Pm1* i Mostyn z genem *Pm3*. Linie Av1860 z genem *Pm4* i APR122 z genem *Pm7* były całkowicie odporne na mączniaka prawdziwego w

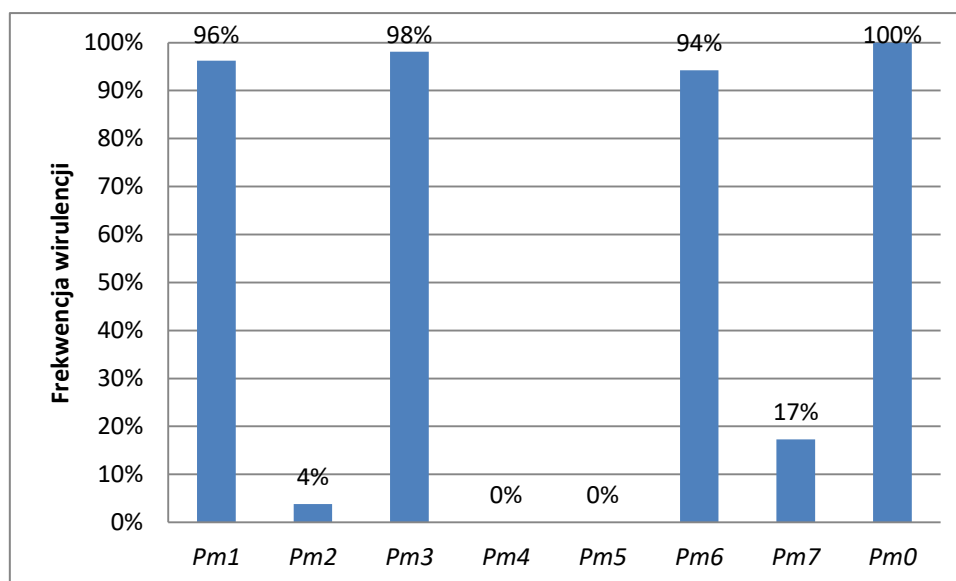
warunkach naturalnej infekcji polowej. Objawów mączniaka prawdziwego nie obserwowano również na liściach odmiany Canyon.

Populacje mączniaka prawdziwego wykorzystane do oceny wirulencji patogenu skolekcjonowano w 2017 roku w 4 różnych lokalizacjach na terenie Polski (Kopaszewo, Strzelce, Polanowice, Czesławice) (Rys.1.) Z każdej lokalizacji w warunkach laboratoryjnych uzyskano po 10 jednozarodnikowych izolatów zgodnie z metodyką opisaną przez Okoń i Kowalczyk (2012).



Rys.1. Lokalizacje kolekcjonowania mączniaka prawdziwego w 2017 roku

Na podstawie testów żywiciel-patogen przeprowadzonych na zestawie linii i odmian kontrolnych wyliczono frekwencje wirulencji analizowanych izolatów mączniaka prawdziwego. Testowane izolaty niemal całkowicie przełamały odporność warunkowaną genami *Pm1*, *Pm3* i *Pm6*. Frekwencja wirulencji wobec tych genów wynosiła odpowiednio 96%, 98% i 94%. Żaden z izolatów pozyskanych w 2017 roku nie przełamał odporności warunkowanej genami *Pm4* i *Pm5*. Gen *Pm7* utrzymał wysoki poziom efektywności. 17% testowanych izolatów przełamało odporność warunkowaną tym genem. 4% spośród testowanych izolatów przełamało odporność warunkowaną genem *Pm2*. Niski poziom wirulencji dla tych genów może wskazywać, że utrzymają one efektywność w kolejnych latach i mogą być z powodzeniem wykorzystywane do podnoszenia odporności odmian owsa zwyczajnego np. w strategii tworzenia piramid genowych.



Rys.2. graficzne przedstawienie wirulencji mączniaka prawdziwego w 2017 roku

Kolejnym parametrem pozwalającym na charakterystykę populacji patogena jest kompleksowość, określa on liczbę genotypów kontrolnych, które zostały porażone przez dany procent izolatów.

Skolekcjonowane w 2017 roku izolaty mączniaka prawdziwego najczęściej przełamywały odporność 3 spośród 7 analizowanych genów odporności. Żaden z testowanych izolatów nie był w stanie przełamać odporności jednocześnie zestawu 5,6 lub 7 analizowanych genów odporności.

Na podstawie modelu porażenia poszczególnych linii kontrolnych przez badane izolaty mączniaka prawdziwego określono patotypy izolatów (Tab.1.) Najliczniej występującym patotypem był patotyp oznaczony jako ph1, który reprezentowany był przez 75% analizowanych izolatów mączniaka prawdziwego. Izolaty te przełamywały odporność 3 genów (*Pm1*, *Pm3* i *Pm6*). Patotyp ph2 reprezentowany był przez 15% testowanych izolatów i przełamywał odporność 4 genów (*Pm1*, *Pm3*, *Pm6* i *Pm7*). Pozostałe patotypy: ph3, ph4, ph5, ph6 i ph7 reprezentowane były przez 2% testowanych izolatów każdy. Zróżnicowanie patotypów było bardzo niskie ze względu na niewielką ilość analizowanych form kontrolnych oraz ze względu na fakt, że niemal wszystkie analizowane izolaty były wirulentne wobec genów *Pm1*, *Pm3* i *Pm6*.

Tabela.1. Klasyfikacja patotypów *Blumeria graminis* f.sp. *avenae* w 2017 roku

patotyp	Wzór binarny patotypu	Frekwencja wirulencji
ph1	10100101	75%
ph2	10100111	15%
ph3	11100111	2%
ph4	00100001	2%
ph5	10100001	2%
ph6	11100101	2%
ph7	00000001	2%

Do oceny zróżnicowania genetycznego kolekcji izolatów mączniaka prawdziwego wybrano 18 izolatów skolekcjonowanych na terenie polski w latach 2010-2016 (Tab.2). Ocenę przeprowadzono w oparciu o zestaw 50 losowo wybranych starterów SRAP (Tab. 3)

Tabela 2. Izolaty mączniaka prawdziwego wybrane do analiz podobieństwa genetycznego.

Lp	Lokalizacja	Rok skolekcjonowania
1	Białka	2014
2	Sępólno Krajeńskie	2015
3	Żalno	2015
4	Prusice	2015
5	Nowosiółki	2015
6	Czerwin	2015
7	Choryń	2010
8	Choryń	2014
9	Choryń	2015
10	Choryń	2016
11	Czesławice	2015
12	Czesławice	2016
13	Strzelce	2013
14	Strzelce	2015

15	Strzelce	2016
16	Polanowice	2014
17	Polanowice	2015
18	Polanowice	2016

Tabela 3. Charakterystyka starterów SRAP wybranych do oceny zróżnicowania genetycznego izolatów mączniaka prawdziwego.

Lp	starter	Liczba produktów			Frekwencja prążków polimorficznych (%)
		całkowita	monomorficznych	polimorficznych	
1	1+2	10	1	9	90%
2	2+1	13	7	6	46%
3	2+2	14	5	9	64%
4	2+4	10	4	6	60%
5	3+1	14	2	12	86%
6	3+2	8	4	4	50%
7	4+1	6	1	5	83%
8	5+1	4	0	4	100%
9	5+2	13	2	11	85%
10	6+2	9	5	4	44%
11	6+5	14	6	8	57%
Suma		115	37	78	68%
Średnio/starter		10,45	3,36	7,09	
Średnio/genotyp		6,39	2,06	4,33	

W pierwszym kroku analiz przeprowadzono screening 50 kombinacji starterów SRAP, wybrano te, które inicjowały amplifikację powtarzalnych produktów na matrycy DNA *Blumeria graminis* f.sp. *avenae*. Do dalszych analiz wybrano 11, które inicjowały amplifikację produktów polimorficznych w obrębie analizowanych izolatów mączniaka prawdziwego. Łącznie w reakcji z 11 starterami SRAP uzyskano 115 produktów, z których jedynie 68% (78 produktów) było polimorficznych. Na pojedynczy starter przypadało średnio 7,09 polimorficznych produktów, zaś na izolat 4,33. Zastosowane pary starterów inicjowały amplifikację od 4 do 14 polimorficznych produktów.

Wyniki badań polimorfizmu markerów SRAP izolatów mączniaka prawdziwego stanowiły podstawę do utworzenia matrycy indeksów podobieństwa genetycznego Dice'a (Tab. 4). Analizowane izolaty mączniaka prawdziwego charakteryzowały się wysokim podobieństwem genetycznym. Wartość indeksów podobieństwa wahała się od 0.667 do 0.993, a średnio wynosiła 0,852. Największe podobieństwo do wszystkich pozostałych izolatów wykazały izolaty pozyskane z Polanowic w 2016 roku, najmniejsze zaś izolat pozyskany w lokalizacjach Choryń w 2014 roku i Czerwin w 2015 roku.

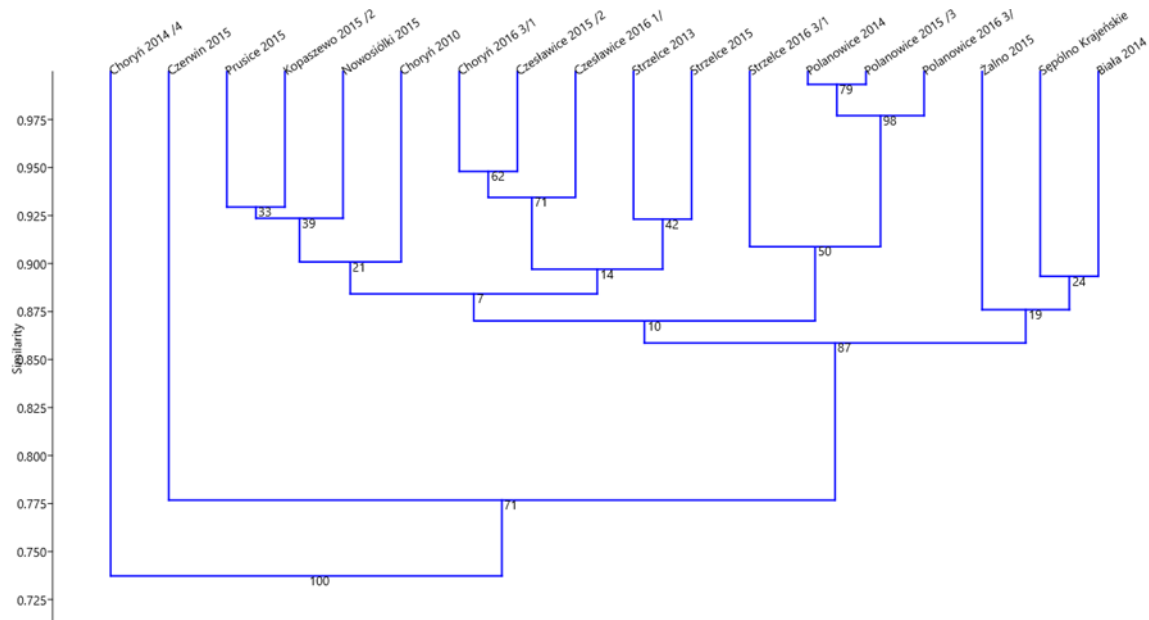
W oparciu o matrycę SI wykonano analizę skupień metodą UPGMA (Rys. 3). Na uzyskanym dendrogramie izolaty skolekcjonowane w lokalizacji Polanowice w latach 2014, 2015 i 2016 uległy wspólnej klasteryzacji, wskazuje to na duże podobieństwo izolatów pozyskanych z terenów Polski południowej. Wspólnej klasteryzacji uległy również izolaty skolekcjonowane w Polsce zachodniej z lokalizacji Prusice, Nowosiółki, Kpszewo i Choryń. Izolaty z lokalizacji Czesławice pozyskane w latach 2015 i 2016 również grupowały się

razem. Na obrzeżach dendrogramu ulokowały się dwa izolaty skolekcjonowane w lokalizacji Czerwiń i Choryń w 2014 roku w 2015 roku. Ich lokalizacja na dendrogramie potwierdza, że są one najbardziej odmienne od pozostałych izolatów.

Tabela 4. Matryca indeksów podobieństwa analizowanych izolatów mączniaka prawdziwego określonych na podstawie polimorfizmu markerów RAPD

	Biała 2014	Sępólno Krajeńskie	Żalno 2015	Prusice 2015	Nowosiółki 2015	Czerwiń 2015	Choryń 2010	Choryń 2014 /4	Kopaszewo 2015 /2	Choryń 2016 3/1	Czesławice 2015 /2	Czesławice 2016 1/2	Strzelce 2013	Strzelce 2015	Strzelce 2016 3/1	Polanowice 2014	Polanowice 2015 /3	Polanowice 2016 3/1
Biała 2014		0,893	0,865	0,896	0,901	0,810	0,875	0,705	0,894	0,877	0,861	0,855	0,879	0,863	0,814	0,874	0,882	0,890
Sępólno Krajeńskie	0,893		0,887	0,868	0,848	0,792	0,846	0,721	0,866	0,873	0,857	0,864	0,863	0,899	0,838	0,844	0,851	0,861
Żalno 2015	0,865	0,887		0,866	0,847	0,818	0,845	0,757	0,852	0,871	0,843	0,862	0,835	0,831	0,794	0,829	0,837	0,833
Prusice 2015	0,896	0,868	0,866		0,924	0,753	0,888	0,746	0,929	0,889	0,897	0,891	0,880	0,852	0,805	0,850	0,857	0,878
Nowosiółki 2015	0,901	0,848	0,847	0,924		0,770	0,905	0,739	0,923	0,871	0,902	0,908	0,873	0,857	0,811	0,868	0,875	0,896
Czerwiń 2015	0,810	0,792	0,818	0,753	0,770		0,818	0,754	0,788	0,783	0,732	0,764	0,769	0,776	0,748	0,760	0,768	0,779
Choryń 2010	0,875	0,846	0,845	0,888	0,905	0,818		0,747	0,910	0,881	0,865	0,884	0,883	0,855	0,822	0,866	0,873	0,882
Choryń 2014 /4	0,705	0,721	0,757	0,746	0,739	0,754	0,747		0,754	0,750	0,738	0,777	0,726	0,743	0,667	0,728	0,736	0,746
Kopaszewo 2015 /2	0,894	0,866	0,852	0,929	0,923	0,788	0,910	0,754		0,911	0,895	0,913	0,915	0,863	0,830	0,886	0,893	0,901
Choryń 2016 3/1	0,877	0,873	0,871	0,889	0,871	0,783	0,881	0,750	0,911		0,948	0,931	0,909	0,882	0,811	0,868	0,875	0,883
Czesławice 2015 /2	0,861	0,857	0,843	0,897	0,902	0,732	0,865	0,738	0,895	0,948		0,938	0,917	0,890	0,808	0,877	0,883	0,904
Czesławice 2016 1/2	0,855	0,864	0,862	0,891	0,908	0,764	0,884	0,777	0,913	0,931	0,938		0,899	0,885	0,829	0,871	0,878	0,898
Strzelce 2013	0,879	0,863	0,835	0,880	0,873	0,769	0,883	0,726	0,915	0,909	0,917	0,899		0,923	0,881	0,909	0,916	0,924
Strzelce 2015	0,863	0,899	0,831	0,852	0,857	0,776	0,855	0,743	0,863	0,882	0,890	0,885	0,923		0,892	0,867	0,874	0,883
Strzelce 2016 3/1	0,814	0,838	0,794	0,805	0,811	0,748	0,822	0,667	0,830	0,811	0,808	0,829	0,881	0,892		0,920	0,913	0,894
Polanowice 2014	0,874	0,844	0,829	0,850	0,868	0,760	0,866	0,728	0,886	0,868	0,877	0,871	0,909	0,867	0,920		0,993	0,974
Polanowice 2015 /3	0,882	0,851	0,837	0,857	0,875	0,768	0,873	0,736	0,893	0,875	0,883	0,878	0,916	0,874	0,913	0,993		0,980
Polanowice 2016 3/1	0,890	0,861	0,833	0,878	0,896	0,779	0,882	0,746	0,901	0,883	0,904	0,898	0,924	0,883	0,894	0,974	0,980	

Rys.3. Dendrogram izolatów mączniaka prawdziwego. uzyskany metodą UPGMA w oparciu o markery RAPD





### Mierniki dla tematu badawczego 1 (podać w tabeli)

Lp.	Miernik <sup>2</sup>	Wartość miernika podana w opisie zadania	Wartość miernika zrealizowana
1	Liczba lokalizacji, w których przeprowadzono obserwacje porażenia mączniakiem prawdziwym zestawu 7 linii i odmian kontrolnych	4	4
2	Liczba izolatów użytych do analizy zmienności populacji mączniaka prawdziwego	40	40
3	Liczba kombinacji starterów SRAP użyta do analizy zróżnicowania genetycznego mączniaka prawdziwego	50	50

### 3.2 Temat badawczy 3: Piramidyzacja i wprowadzanie do genomu owsa efektywnych genów odporności przeciwko mączniakowi prawdziwemu na drodze krzyżowania roślin

#### *Cel tematu badawczego 3*

Celem zadania 3 było uzyskanie na drodze krzyżowania roślin, mieszańców odmian owsa zwyczajnego z liniami zawierającymi efektywne geny odporności na mączniaka prawdziwego jak również piramidyzacja efektywnych genów odporności w genomie owsa.

#### *Materiały i metody (opisać jak w publikacji)*

Przedmiotem analiz w zadaniu 3 były odmiany owsa zwyczajnego wrażliwe na porażenie przez mączniaka prawdziwego oraz linie hodowlane pozyskane ze spółek hodowli roślin oraz linie owsa zawierające zdefiniowane geny odporności na mączniaka prawdziwego. W 2018 roku do krzyżowań została włączona również odmiana Canyon jako dawca efektywnego genu odporności na mączniaka prawdziwego. W celu piramidyzacji genów odporności na mączniaka prawdziwego przekrzyżowano ze sobą odmiany i linie owsa zawierające zdefiniowane geny odporności na ten patogen oraz przeprowadzono krzyżowania mieszańców F<sub>1</sub> uzyskanych w 2017 roku. Krzyżowania zostały przeprowadzone zgodnie ze schematem przedstawionym w tabeli 5:

Tabela 5. Schemat krzyżowań przeprowadzonych w 2018 roku

Forma mateczna	Forma ojcowska
10 odmian owsa wyselekcjonowane jako wrażliwe na mączniaka prawdziwego	Av1860 (Pm4) APR122 (Pm7) Canyon
Linie hodowlane pozyskane ze spółek hodowli roślin (15 – 30 rodów)	Av1860 (Pm4) APR122 (Pm7) Canyon
Mieszańce F <sub>1</sub> uzyskane w 2017 roku (10 mieszańców F <sub>1</sub> )	Mieszańce F <sub>1</sub> uzyskane w 2017 roku (10 mieszańców F <sub>1</sub> )

Genotypy przeznaczone do krzyżowań zostały wysiane na poletkach doświadczalnych Uniwersytetu Przyrodniczego w Lublinie zlokalizowanych w Czesławicach koło Nałęczowa.

<sup>2</sup> Podać miernik – np. ilość testów, prób, badanych genotypów etc.

Na kilka dni przed kwitnieniem w kłoskach wiech matecznych z pierwszego kwiatu usunięto pylniki, natomiast pozostałe kwiaty wycięto. Na wiechy założono izolatory z folii celulozowej, a po czterech dniach od kastrowania na znamiona słupka naniesiono pyłek z roślin ojcowskich.

We wszystkich krzyżowanych wiechach oceniono liczbę wykastrowanych kwiatów oraz zawiązanych ziarniaków. Na podstawie tych danych obliczono efektywność przeprowadzonych krzyżowań i zdolność kombinacyjną poszczególnych form wyrażoną w %.

### **Wyniki**

W ramach realizacji zadania wykonano krzyżowania roślin zgodnie z zaplanowanym schematem. W 2018 roku do krzyżowań przeznaczono 9 linii hodowlanych pochodzących z Hodowli Roślin DANKO oraz 7 linii z Małopolskiej Hodowli Roślin (Tab. 6) jak również 10 odmian owsa zwyczajnego (Tab. 7). Zgodnie z założonym schematem przekrzyżowano również mieszańce pokolenia F<sub>1</sub> uzyskane w latach poprzednich. (Tab. 8). Jako formy ojcowskie wykorzystano genotypy zawierające geny *Pm4* (Av1860, CC6490, Cc4761), *Pm7* oraz *Pm5* (Am25, Am27). Do krzyżowań nie została włączona odmiana Canyon ze względu na niewielką liczbę uzyskanych wiech na poletku. Łącznie wykastrowano 2681 kwiatków z form matecznych. Najwięcej wykastrowanych kwiatków przypadało dla odmiany Arab, najmniej dla linii Pol5. Średnio na jedną odmianę mateczną przypadało 103,11 wykastrowanych kwiatków, na genotyp ojcowski zaś 383.

W 2018 roku wykonano 100 kombinacji krzyżówkowych. Ziarniaki mieszańcowe uzyskano dla 51 kombinacji. Łącznie w wyniku krzyżowań przeprowadzonych w 2018 roku uzyskano 192 ziarniaki. Procent zawiązanych ziarniaków wahał się od 50% do 2%. Najwięcej ziarniaków uzyskano w wyniku zapylania pyłkiem pochodzącym z linii *Pm4* (50 ziarniaków). Średnio na jedną formę ojcowską przypadało 27,43 ziarniaka.

Rozpatrując formy mateczne, najwięcej ziarniaków uzyskano dla kombinacji z odmianą Komfort (18 ziarniaków), średnio na jedną odmianę mateczną wykorzystaną w krzyżowaniach przypadało 7,38 ziarniaka.

Tabela 6. Kombinacje krzyżówkowe wykonane pomiędzy liniami otrzymanymi z Hodowli Roślin DANKO i Małopolskiej Hodowli Roślin a liniami zawierającymi geny *Pm4*, *Pm7* i *Pm5*

Lp	forma mateczna	Forma ojcowska	liczba kwiatków	liczba uzyskanych ziarniaków		Lp	forma mateczna	Forma ojcowska	liczba kwiatków	liczba uzyskanych ziarniaków	
1	DC1	Am25	15	0	0%	1	Pol1	Am27	23	0	0%
2	DC1	Pm4	39	2	5%	2	Pol1	Av1860	31	1	3%
3	DC1	Pm7	48	0	0%	3	Pol1	Pm7	26	1	4%
4	Dc2	Am25	24	3	13%	4	Pol2	Am27	29	0	0%
5	Dc2	Am27	24	1	4%	5	Pol2	Cc6490	35	2	6%
6	Dc2	Pm4	48	4	8%	6	Pol2	Pm7	14	0	0%
7	Dc2	Pm7	28	2	7%	7	Pol3	Am27	22	0	0%
8	DC3	Am25	29	0	0%	8	Pol3	Cc6490	49	10	20%

9	DC3	Pm4	28	10	36%	9	Pol3	Pm7	44	0	0%
10	Dc3	Pm7	18	0	0%	10	Pol4	Am27	35	0	0%
11	Dc4	Am27	33	2	6%	11	Pol4	Cc6490	27	1	4%
12	Dc4	Pm4	42	1	2%	12	Pol4	Pm7	9	0	0%
13	DC4	Pm7	44	2	5%	13	Pol5	Am25	12	0	0%
14	DC5	Am27	39	5	13%	14	Pol5	Cc6490	35	3	9%
15	DC5	Pm4	57	9	16%	15	Pol5	Pm7	10	0	0%
16	Dc5	Pm7	35	3	9%	16	Pol6	Am27	21	0	0%
17	DC6	Am27	14	2	14%	17	Pol6	Cc4761	29	1	3%
18	DC6	Pm4	29	4	14%	18	Pol6	Pm7	9	0	0%
19	DC6	Pm7	46	0	0%	19	Pol7	Am27	17	0	0%
20	DC7	Am27	30	7	23%	20	Pol7	Av1860	16	0	0%
21	DC7	Pm4	44	2	5%	21	Pol7	Pm7	17	0	0%
22	DC7	Pm7	31	3	10%						
23	DC8	Am27	13	1	8%						
24	DC8	Pm4	60	12	20%						
25	DC8	Pm7	42	0	0%						
26	Dc9	Am27	22	1	5%						
27	Dc9	Pm4	33	0	0%						
28	Dc9	Pm7	47	5	11%						
	Suma		962	81	8%		Suma		510	19	4%

Tabela 7. Kombinacje krzyżówkowe wykonane pomiędzy odmianami owsa zwyczajnego a liniami a genami *Pm4*, *Pm7* i *Pm5*

Lp	forma mateczna	Forma ojcowska	liczba kwiatków	liczba uzyskanych ziarniaków	
1	Arab	Am25	35	3	9%
2	Arab	Am27	10	0	0%
3	Arab	Av1860	15	2	13%
4	Arab	Cc4761	11	0	0%
5	Arab	Cc6490	35	2	6%
6	Arab	Pm7	44	4	9%
7	Arden	Am27	26	0	0%
8	Arden	Cc4761	19	2	11%
9	Arden	Cc6490	10	1	10%
10	Arden	Pm7	42	2	5%
11	Bingo	Am27	13	0	0%
12	Bingo	Pm4	43	6	14%
13	Bingo	Pm5	32	0	0%
14	Bingo	Pm7	44	0	0%
15	Elegant	Am27	20	4	20%
16	Elegant	Cc4761	11	0	0%
17	Elegant	Cc6490	25	4	16%
18	Elegant	Pm7	43	5	12%
19	Haker	Am25	34	1	3%
20	Haker	Cc6490	44	7	16%

21	Haker	Pm4	16	0	0%
22	Haker	Pm7	32	1	3%
23	Harnaś	Am25	36	0	0%
24	Harnaś	Am27	15	0	0%
25	Harnaś	Cc4761	9	1	11%
26	Harnaś	Cc6490	38	4	11%
27	Komfort	Am25	10	0	0%
28	Komfort	Cc6490	36	18	50%
29	Komfort	Pm4	23	0	0%
30	Komfort	Pm5	25	0	0%
31	Komfort	Pm7	46	0	0%
32	Nawigator	Am25	35	0	0%
33	Nawigator	Am27	13	1	8%
34	Nawigator	Cc6490	35	8	23%
35	Nawigator	Pm7	44	1	2%
36	Paskal	Am25	35	0	0%
37	Paskal	Am27	9	0	0%
38	Paskal	Pm4	55	0	0%
39	Paskal	Pm7	41	0	0%
40	Romulus	Am27	26	4	15%
41	Romulus	Cc6490	31	7	23%
42	Romulus	Pm7	43	4	9%
Suma			1209	92	8%

Tabela 8. Kombinacje krzyżówkowe wykonane pomiędzy mieszańcami F<sub>1</sub> użytkowymi w 2017 roku

Forma mateczna	Forma ojcowska	Liczba kwiatków	Liczba ziarniaków	%związanych ziarniaków
Arden x Pm4	Elegant x Pm7	16	0	0%
Arden x Pm4	Arden x Pm7	12	1	8%
Breton x Pm4	Elegant x Pm7	15	0	0%
Elegant x Pm7	Arden x Pm4	11	0	0%
Romulus x Pm4	Romulus x Pm7	12	1	8%
Romulus x Pm7	Romulus x Pm4	16	2	13%
Suma		82	4	5%

### Mierniki dla tematu badawczego 3

Lp.	Miernik <sup>3</sup>	Wartość miernika podana w opisie zadania	Wartość miernika zrealizowana
1	Liczba wykonanych kombinacji krzyżówkowych	100	100

**3.3 Temat badawczy 4:** Genotypowanie form rodzicielskich i mieszańców F<sub>2</sub> homozygotycznych pod względem odporności na mączniaka prawdziwego z wykorzystaniem technik RAPD i SRAP

### Cel tematu badawczego 4

<sup>3</sup> Podać miernik – np. ilość planowanych testów, prób, badanych genotypów etc.

Celem prac prowadzonych w ramach tematu 4 było poszukiwanie losowych markerów DNA różnicujących pule roślin odpornych i podatnych w populacji F<sub>2</sub> Canyon × Fuchs

### **Materiały i metody (opisać jak w publikacji)**

Przedmiotem badań realizowanych w 2018 roku były homozygotyczne pod względem odporności na mączniaka prawdziwego osobniki populacji Canyon x Fuchs oraz formy rodzicielskie. Na podstawie testów żywiciel-patogen, z analizowanej populacji wybrano po 30 roślin homozygotycznych (odpornych i podatnych). Izolację DNA z badanych mieszańców oraz form rodzicielskich przeprowadzono z wykorzystaniem komercyjnego zestawu kolumnkowego. Do poszukiwania losowych markerów DNA dla genu zidentyfikowanego w odmianie Canyon wykorzystano metodę BSA (*Bulk Segregant Analysis*). DNA wyizolowane z roślin odpornych i podatnych na porażenie mączniakiem prawdziwym połączono w pule zgodnie z założeniami metody BSA i wykorzystano do analiz PCR. W 2018 roku przetestowano 400 starterów RAPD oraz zestaw 200 kombinacji starterów SRAP. Skład mieszaniny reakcyjnej dla obu systemów markerowych był następujący: 1 x bufor do PCR (10 mM Tris pH 8,8, 50 mM KCl, 0,08% Nonidet P40), 160 µM każdego dNTP, 5,3 pM startera, 1mM MgCl<sub>2</sub>, 60 ng genomowego DNA, 0,4 U *Taq* DNA Polymerase. Reakcje amplifikacji przeprowadzono na termocyklerze Thermalcycler T1 Biometra z zastosowaniem następującego profilu termicznego: wstępna denaturacja przez 3 min. w 94°C, 44 cykle: 94°C - 45 s, 37 -60°C (w zależności od użytych starterów) - 45 s, 72°C - 45 s, z końcową inkubacją 7 min. w 72°C. Produkty reakcji rozdzielano na 1,5% żelu agarozowym zawierającym bromek etydyny. Żele podświetlano na transiluminatorze i fotografowano z wykorzystaniem systemu dokumentacji żeli Poly Doc.

### **Wyniki**

Na podstawie wyników testów żywiciel-patogen do analiz molekularnych wybrano 60 osobników homozygotycznych pod względem odporności na mączniaka prawdziwego. 30 osobników stanowiły homozygoty odporne na mączniaka prawdziwego, kolejne 30 homozygoty wrażliwe. Ponadto materiałem w analizach molekularnych były również formy rodzicielskie : odmiana Canyon posiadająca efektywna źródło odporności i odmiana Fuchs.

Do poszukiwania potencjalnych markerów sprzężonych z nowym genem odporności w populacji Canyon x Fuchs wybrano zestaw 400 starterów RAPD oraz 200 kombinacji starterów SRAP (tab.9 i tab.10).

Tabela 9. Sekwencje starterów RAPD wybrane do poszukiwania markerów dla źródła odporności na mączniaka prawdziwego w owsie zwyczajnym zidentyfikowanego w odmianie Canyon

Lp	Symbol startera	Sekwencja startera	Lp	Symbol startera	Sekwencja startera	Lp	Symbol startera	Sekwencja Startera			
1	A-01	CAGGCCCTTC	101	E-20	AACGGTGACC	201	J-17	ACGCCAGTTC	301	O-17	GGCTTATGCC
2	A-02	TGCCGAGCTG	102	F-01	ACGGATCCTG	202	J-18	TGGTCGAGCA	302	O-18	CTCGCTATCC
3	A-03	AGTCAGCCAC	103	F-02	GAGGATCCCT	203	J-19	GGACACCACT	303	O-19	GGTGACGTT
4	A-04	AATCGGGCTG	104	F-03	CCTGATCACC	204	J-20	AAGCGGCCTC	304	O-20	ACACACGCTG
5	A-05	AGGGGTCTTG	105	F-04	GGTGATCAGG	205	K-01	CATTCGAGCC	305	OPJ-1	CCC GGC ATA A
6	A-06	GGTCCCTGAC	106	F-05	CCG AAT TCC C	206	K-02	GTCTCCGCAA	306	OPJ-11	ACT CCT GCG A
7	A-07	GAAACGGGTG	107	F-05	CCGAATCCC	207	K-03	CCAGCTTAGG	307	OPJ-12	GTC CCG TGG T
8	A-07B	GAA ACG GGT G	108	F-06	GGGAATTCGG	208	K-04	CCGCCAAAC	308	OPJ-14	CAC CCG GAT G

9	A-08	GTGACGTAGG	109	F-07	CCGATATCCC	209	K-05	TCTGTGAGG	309	OPJ-15	TGTAGCAGGG
10	A-09	GGGTAACGCC	110	F-08	GGGATATCGG	210	K-06	CACCTTCCC	310	OPJ-16	CTG CTT AGG G
11	A-10	GTGATCGCAG	111	F-09	CCAAGCTTCC	211	K-07	AGCGAGCAAG	311	OPJ-17	ACG CCA GTT C
12	A-11	CAATGCCCGT	112	F-10	GGAAGCTTGG	212	K-08	GAACACTGGG	312	OPJ-18	TGG TCG CAG A
13	A-12	TCGGCGATAG	113	F-11	TTGGTACCCC	213	K-09	CCCTACCGAC	313	OPJ-19	CAC AGG CGG A
14	A-13	CAGCACCCAC	114	F-12	ACGGTACCAG	214	K-10	GTGCAACGTG	314	OPJ-2	CCC GTT GGG A
15	A-14	TCTGTGCTGG	115	F-13	GGCTGCAGAA	215	K-11	AATGCCCCAG	315	OPJ-20	GTG TCG CGA G
16	A-15	TTCCGAACCC	116	F-14	TGCTGCAGGT	216	K-12	TGGCCCTCAC	316	OPJ-3	TCT CCG CTT G
17	A-16	AGCCAGCGAA	117	F-15	CCAGTACTCC	217	K-13	GGTTGTACCC	317	OPJ-4	CCG AAC ACG G
18	A-17	GACCGCTTGT	118	F-16	GGAGTACTGG	218	K-14	CCCGTACAC	318	OPJ-5	CTT CAT GGG G
19	A-18	AGGTGACCGT	119	F-17	AAC CCG GGA A	219	K-15	CTCCTGCCAA	319	OPJ-6	TCG TTC CGC A
20	A-19	CAAACGTCGG	120	F-17A	AACCCGGGAA	220	K-16	GAGCGTCGAA	320	OPJ-7	CCT CTC GAC A
21	A-20	GTTGCATCC	121	F-18	TTCCCGGGTT	221	K-17	CCCAGCTGTG	321	OPJ-8	CAT ACC GTG G
22	B-01	GTTTCGCTCC	122	F-19	CCTCTAGACC	222	K-18	CCTAGTCGAG	322	OPR-1	TGC GGG TCC T
23	B-02	TGATCCCTGG	123	F-20	GGTCTAGAGG	223	K-19	CACAGGCGGA	323	OPR-19	CCT CCT CAT C
24	B-03	CATCCCCTG	124	G-01	CTACGGAGGA	224	K-20	GTGTCGCGAG	324	P-01	GTAGCACTCC
25	B-04	GGACTGGAGT	125	G-02	GGCACTGAGG	225	L-01	GGCATGACCT	325	P-02	TCGGCACGCA
26	B-05	TGCGCCCTTC	126	G-03	GAGCCCTCCA	226	L-02	TGGGCGTCAA	326	P-03	CTGATACGCC
27	B-06	TGCTTGCC	127	G-04	AGCGTGCTG	227	L-03	CCAGCAGCTT	327	P-04	GTGTCTCAGG
28	B-07	GGTGACGCAG	128	G-05	CTGAGACGGA	228	L-04	GACTGCACAC	328	P-05	CCCCGGTAAC
29	B-08	GTCCACACGG	129	G-06	GTGCCTAAC	229	L-05	ACGCAGGCAC	329	P-06	GTG GGC TGA C
30	B-09	TGGGGGACTC	130	G-07	GAACCTGCGG	230	L-06	GAGGAAGAG	330	P-06	GTGGGCTGAC
31	B-10	CTGCTGGGAC	131	G-08	TCACGTCCAC	231	L-07	AGGCGGGAAC	331	P-07	GTCCATGCCA
32	B-11	GTAGACCCGT	132	G-09	CTGACGTCAC	232	L-08	AGCAGGTGGA	332	P-08	ACATCGCCCA
33	B-12	CCTTGACGCA	133	G-10	AGGGCCGTCT	233	L-09	TGCGAGAGTC	333	P-09	GTGGTCCGCA
34	B-13	TTCCCCCGCT	134	G-11	TGCCCCGCTG	234	L-10	TGGGAGATGG	334	P-10	TCCCGCTAC
35	B-14	TCCGCTCTGG	135	G-12	CAGCTCACGA	235	L-11	ACGATGAGCC	335	P-11	AACGCGTCGG
36	B-15	GGAGGTTGTT	136	G-13	CTCTCCGCCA	236	L-12	GGGCGTACT	336	P-12	AAGGGCGAGT
37	B-16	TTTGCCCGGA	137	G-14	GGATGAGACC	237	L-13	ACCGCTGTCT	337	P-13	GGAGTGCCTC
38	B-17	AGGGAACGAG	138	G-15	ACTGGGACTC	238	L-14	GTGACAGGCT	338	P-14	CCAGCCGAAC
39	B-18	CCACAGCAGT	139	G-16	AGCGTCTCC	239	L-15	AAGAGAGGGG	339	P-15	GGAAGCCAAC
40	B-19	ACCCCGAAG	140	G-17	ACGACGACA	240	L-16	AGGTTGCAGG	340	P-16	CCAAGCTGCC
41	B-20	GGACCCTTAC	141	G-18	GGTCATGTG	241	L-17	AGCCTGAGCC	341	P-17	TGACCCGCCT
42	C-01	TTCGACCAG	142	G-19	GTCAGGGCAA	242	L-18	ACCACCCACC	342	P-18	GGCTTGGCCT
43	C-02	GTGAGGCGTC	143	G-20	TCTCCCTCAG	243	L-19	GAGTGGTGAC	343	P-19	GGGAAGGACA
44	C-03	GGGGGTCTTT	144	H-01	GGTCGGAGAA	244	L-20	TGGTGGACCA	344	P-20	GACCTAGTC
45	C-04	CCGCATCTAC	145	H-02	TCGGACGTGA	245	M-01	GTTGGTGGCT	345	Q-01	GGGACGATGG
46	C-05	GATGACCGCC	146	H-03	AGACGTCCAC	246	M-02	ACAACGCCTC	346	Q-02	TCTGTCGGTC
47	C-06	GAACGGACTC	147	H-04	GGAAGTCGCC	247	M-03	GGGGGATGAG	347	Q-03	GGTCACTCA
48	C-07	GTCCGACGA	148	H-05	AGTCGTCCCC	248	M-04	GGCGGTGTGTC	348	Q-04	AGTGCCTGA
49	C-08	TGGACCGGTG	149	H-06	ACGCATCGCA	249	M-05	GGGAACGTGT	349	Q-05	CCGCGTCTTG
50	C-09	CTCACCGTCC	150	H-07	CTGCATCGTG	250	M-06	CTGGGCAACT	350	Q-06	GAGCGCCTTG
51	C-10	TGTCTGGGTG	151	H-08	GAAACACCCC	251	M-07	CCGTGACTCA	351	Q-07	CCCCGATGGT
52	C-11	AAAGCTGCGG	152	H-09	TGTAGCTGGG	252	M-08	TCTGTCCCC	352	Q-08	CTCCAGCGGA
53	C-12	TGTCATCCCC	153	H-10	CCTACGTCAG	253	M-09	GTCTTGCGGA	353	Q-09	GGCTAACCGA
54	C-13	AAGCCTCGTC	154	H-11	CTTCCGCACT	254	M-10	TCTGGCGCAC	354	Q-10	TGTGCCCGAA
55	C-14	TGCGTGCTTG	155	H-12	ACGCGCATGT	255	M-11	GTCCACTGTG	355	Q-11	TCTCCGCAAC
56	C-15	GACGGATCAG	156	H-13	GACGCCACAC	256	M-12	GGGACGTTGG	356	Q-12	AGTAGGGCAC
57	C-16	CACACTCCAG	157	H-14	ACCAGGTTGG	257	M-13	GGTGGTCAAG	357	Q-13	GGAGTGGACA
58	C-17	TTCCCCCAG	158	H-15	AATGGCGCAG	258	M-14	AGGGTCGTTT	358	Q-14	GGACGCTTCA

59	C-18	TGAGTGGGTG	159	H-16	TCTCAGCTGG	259	M-15	GACCTACCAC	359	Q-15	GGGTAACGTG
60	C-19	GTTGCCAGCC	160	H-17	CACTCTCCTC	260	M-16	GTAACCAGCC	360	Q-16	AGTGCAGCCA
61	C-20	ACTTCGCCAC	161	H-18	GAATCGGCCA	261	M-17	TCAGTCCGGG	361	Q-17	GAAGCCCTTG
62	D-01	ACCGGAAGG	162	H-19	CTGACCAGCC	262	M-18	CACCATCCGT	362	Q-18	AGGCTGGGTG
63	D-02	GGACCAACC	163	H-20	GGGAGACATC	263	M-19	CCTCAGGCA	363	Q-19	CCCCATCA
64	D-03	GTCGCGTCA	164	I-01	ACCTGGACAC	264	M-20	AGGTCTGGG	364	Q-20	TCGCCAGTC
65	D-04	TCTGGTGAGG	165	I-02	GGAGGAGAGG	265	N-01	CTCACGTTGG	365	R-01	TGCGGTCTCT
66	D-05	TGAGCGGACA	166	I-03	CAGAAGCCA	266	N-02	ACCAGGGCA	366	R-02	CACAGCTGCC
67	D-06	ACCTGAACGG	167	I-04	CCGCCTAGTC	267	N-03	GGTACTCCCC	367	R-03	ACACAGAGGG
68	D-07	TTGGCACGGG	168	I-05	TGTTCCACGG	268	N-04	GACCGACCCA	368	R-04	CCCGTAGCAC
69	D-08	GTGTGCCCA	169	I-06	AAGGCGCAG	269	N-05	ACTGAACGCC	369	R-05	GACCTAGTGG
70	D-09	CTCTGGAGAC	170	I-07	CAGCGACAAG	270	N-06	GAGACGCACA	370	R-06	GTCTACGGCA
71	D-10	GGTCTACACC	171	I-08	TTTGCCCGGT	271	N-07	CAGCCAGAG	371	R-07	ACTGGCCTGA
72	D-11	AGCGCATTG	172	I-09	TGGAGAGCAG	272	N-08	ACCTCAGCTC	372	R-08	CCCGTTGCTT
73	D-12	CACCGTATCC	173	I-10	ACAACGCGAG	273	N-09	TGCCGGCTTG	373	R-09	TGAGCACGAG
74	D-13	GGGGTGACGA	174	I-11	ACATGCCGTG	274	N-10	ACAACTGGGG	374	R-10	CCATTCCCA
75	D-14	CTTCCCAAG	175	I-12	AGAGGCACA	275	N-11	TCGCCGAAA	375	R-11	GTAGCCGTCT
76	D-15	CATCCGTGCT	176	I-13	CTGGGGCTGA	276	N-12	CACAGACACC	376	R-12	ACAGGTGCGT
77	D-16	AGGGCGTAAG	177	I-14	TGACGGCGGT	277	N-13	AGCGTCACTC	377	R-13	GGACGACAAG
78	D-17	TTTCCACGG	178	I-15	TCATCCGAGG	278	N-14	TCGTGCGGGT	378	R-14	CAGGATTCCC
79	D-18	GAGAGCCAAC	179	I-16	TCTCCGCCT	279	N-15	CAGCGACTGT	379	R-15	GGACAACGAG
80	D-19	CTGGGACTT	180	I-17	GGTGGTGATG	280	N-16	AAGCGACCTG	380	R-16	CTCTGCGCGT
81	D-20	ACCCGTCAC	181	I-18	TGCCAGCCT	281	N-17	CATTGGGGAG	381	R-17	CCGTACGTAG
82	E-01	CCCAAGGTCC	182	I-19	AATGCGGGAG	282	N-18	GGTGAGGTCA	382	R-18	GGCTTTGCCA
83	E-02	GGTGCGGAA	183	I-20	AAAGTGCGGG	283	N-19	GTCCGTACTG	383	R-19	CCTCTCATC
84	E-03	CCAGATGCAC	184	J-01	CCCGGCATAA	284	N-20	GGTGCTCCGT	384	R-20	ACGGCAAGGA
85	E-04	GTGACATGCC	185	J-02	CCCGTTGGGA	285	O-01	GGCACGTAAG	385	S-01	CTACTGCGCT
86	E-05	TCAGGGAGGT	186	J-03	TCTCCGCTTG	286	O-02	ACGTAGCGTC	386	S-02	CCTCTGACTG
87	E-06	AAGACCCTC	187	J-04	CCGAACACGG	287	O-03	CTGTTGCTAC	387	S-03	CAGAGGTCCC
88	E-07	AGATGCAGCC	188	J-05	CTC CAT GGG G	288	O-04	AAGTCCGCTC	388	S-04	CACCCCTTG
89	E-08	TCACCACGGT	189	J-05	CTCCATGGGG	289	O-05	CCCAGTCACT	389	S-05	TTTGGGGCCT
90	E-09	CTTACCCGA	190	J-06	TCGTTCCGCA	290	O-06	CCACGGGAAG	390	S-06	GATACCTCGG
91	E-10	CACCAGTGTA	191	J-07	CCTCTCGACA	291	O-07	CAGCACTGAC	391	S-07	TCCGATGCTG
92	E-11	GAGTCTCAGG	192	J-08	CATACCGTGG	292	O-08	CCTCCAGTGT	392	S-08	TTCAGGGTGG
93	E-12	TTATGCCCC	193	J-09	TGAGCCTCAC	293	O-09	TCCCACGCAA	393	S-09	TCCTGGTCCC
94	E-13	CCCGATTCCG	194	J-10	AAGCCGAGG	294	O-10	TCAGAGCGCC	394	S-10	ACCGTTCCAG
95	E-14	TGCGGCTGAG	195	J-11	ACTCCTGCGA	295	O-11	GACAGGAGGT	395	S-11	AGTCGGGTGG
96	E-15	ACGCACAACC	196	J-12	GTCCCGTGGT	296	O-12	CAGTGCTGTG	396	S-12	CTGGGTGAGT
97	E-16	GGTGACTGTG	197	J-13	CCACACTACC	297	O-13	GTCAGAGTCC	397	S-13	GTCGTTCTG
98	E-17	CTACTGCCGT	198	J-14	CACCCGATG	298	O-14	AGCATGGCTC	398	S-14	AAAGGGTCC
99	E-18	GGACTGCAGA	199	J-15	TGTAGCAGGG	299	O-15	TGGCGTCTT	399	S-15	CAGTTCACGG
100	E-19	ACGGCGTATG	200	J-16	CTGCTTAGGG	300	O-16	TCGGCGGTTT	400	S-16	AGGGGGTCC

Tabela 10. Sekwencje starterów SRAP wykorzystane do poszukiwania markerów źródła odporności na mączniaka prawdziwego w owsie zwyczajnym zidentyfikowanego w odmianie Canyon

Symbol startera	Sekwencja startera	Symbol startera	Sekwencja startera
em1	GACTGCGTACGAATTAAT	me1	TGAGTCCAAACCGGATA
em2	GACTGCGTACGAATTTGC	me2	TGAGTCCAAACCGGAGC
em3	GACTGCGTACGAATTGAC	me3	TGAGTCCAAACCGGAAT
em4	GACTGCGTACGAATTTGA	me4	TGAGTCCAAACCGGACC
em5	GACTGCGTACGAATTAAC	me5	TGAGTCCAAACCGGAAG

em6	GACTGCGTACGAATTGCA	me6	TGAGTCCAAACCGGACA
em7	GACTGCGTACGAATTATG	me7	TGAGTCCAAACCGGTTG
em8	GACTGCGTACGAATTAGC	me8	TGAGTCCAAACCGGTGT
em9	GACTGCGTACGAATTACG	me9	TGAGTCCAAACCGGTCA
em10	GACTGCGTACGAATTTAG	me10	TGAGTCCAAACCGGGAC
		me11	TGAGTCCAAACCGGGTA
		me12	TGAGTCCAAACCGGGGT
		me13	TGAGTCCAAACCGGCAG
		me14	TGAGTCCAAACCGGCTA
		me15	TGAGTCCAAACCGGACG
		me16	TGAGTCCAAACCGGACT
		me17	TGAGTCCAAACCGGAGG
		me18	TGAGTCCAAACCGGAAC
		me19	TGAGTCCAAACCGGAGA
		me20	TGAGTCCAAACCGGCAT

W wyniku przeprowadzonych reakcji amplifikacji z wykorzystaniem pul roślin odpornych i roślin wrażliwych uzyskano 7850 prążków RAPD, spośród nich jedynie 20% było polimorficznych. W wyniku reakcji ze starterami SRAP uzyskano 3260 produktów amplifikacji, spośród nich 860 było polimorficznych.

#### Mierniki dla tematu badawczego 4 (podać w tabeli)

Lp.	Miernik <sup>4</sup>	Wartość miernika podana w opisie zadania	Wartość miernika zrealizowana
1	Liczba osobników wybranych do analiz molekularnych z populacji Canyon x Fuchs	62	62
2	Liczba przetestowanych starterów RAPD	400	400
3	Liczba przetestowanych kombinacji starterów SRAP	200	200

### 3.4 Temat badawczy 5: Genotypowanie populacji z wykorzystaniem całogenomowych analiz typu DArTseq

#### *Cel tematu badawczego 5*

Celem prac prowadzonych w ramach tematu 5 w 2018 roku było poszukiwanie markerów DArTseq różnicujących pule roślin odpornych i podatnych w populacji F<sub>2</sub> Canyon x Fuchs.

#### *Materiały i metody (opisać jak w publikacji)*

Przedmiotem badań realizowanych w 2018 roku były osobniki populacji Canyon x Fuchs oraz formy rodzicielskie. Do analiz typu DArTseq przygotowano całą populację złożoną ze 160 osobników sfenotypowanych na podstawie testów żywiciel-patogen. Izolacja DNA z badanych mieszańców oraz form rodzicielskich przeprowadzona została z wykorzystaniem komercyjnego zestawu kolumnkowego. Po izolacji oceniono jakość i ilość

<sup>4</sup> Podać miernik – np. ilość planowanych testów, prób, badanych genotypów etc.



uzyskanego DNA oraz wykonano odpowiednie rozcieńczenia. Analizy DArTseq realizowano w Diversity Arrays Technology, University of Canberra w Australii wg. opracowanej i opatentowanej metodyki. Jest to jedyny ośrodek prowadzący takie analizy. Uzyskane matryce markerów silicoDArT i SNP przeanalizowano pod kątem wyboru markerów segregujących z genem odporności na mączniaka prawdziwego. Zostanie również przeprowadzona próba konwersji uzyskanych markerów na markery specyficzne.

### **Wyniki**

Analizom typu DArTseq poddano całą populację F<sub>2</sub> Canyon x Fuchs złożoną ze 160 osobników oraz formy rodzicielskie Canyon z efektywnym genem odporności na mączniaka prawdziwego oraz odmianę wrażliwą Fuchs. W wyniku genotypowania metodą DArTseq w analizowanej populacji zidentyfikowano 20 387 polimorficznych markerów silicoDArT, Wartość PIC uzyskanych markerów silicoDArT zawierała się w przedziale od 0.028 do 0.500, średnio wynosiła 0.344.

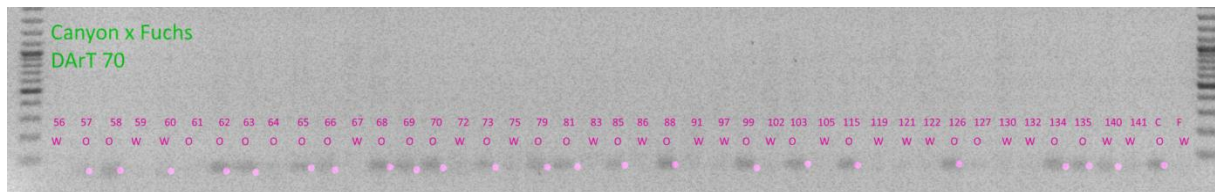
Dane uzyskane w wyniku genotypowania populacji Canyon x Fuchs połączono z danymi uzyskanymi w procesie fenotypowania analizowanej populacji. Do każdego genotypu przypisano odpowiadający mu fenotyp. Analiza porównawcza pozwoliła na wytypowanie markerów specyficznych dla roślin odpornych i wrażliwych w obrębie analizowanej populacji. Wśród uzyskanych markerów silicoDArT 88 było powiązanych z odpornością na mączniaka prawdziwego warunkowaną genem odporności zidentyfikowanym w odmianie Canyon. 37 markerów było specyficznych dla form wrażliwych, 51 dla form odpornych. Dokładna analiza pozwoliła na wytypowanie 48 markerów najsilniej skorelowanych z nowym genem. Wszystkie wytypowane markery silicoDArT segregowały w analizowanej populacji zgodnie z modelem 3:1.

Sekwencje wybranych markerów silicoDArT zostały przeanalizowane pod kątem możliwości konwersji w markery specyficzne oparte o PCR. Analizie poddano długość sekwencji oraz możliwość zaprojektowania do nich specyficznych starterów. Na podstawie analiz wybrano 32, których długość sekwencji była większa niż 50 pz. Analiza sekwencji nukleotydów pozwoliła na wytypowanie 17 sekwencji odpowiednich do zaprojektowania starterów. Do każdej sekwencji zaprojektowano po 2 pary specyficznych starterów. Poprawność konwersji zaprojektowanych par starterów sprawdzono w PCR, w którym matrycę stanowiło DNA roślin odpornych i wrażliwych połączone w pule. Amplifikację produktów oczekiwanej wielkości zaobserwowano dla 10 par starterów. W kolejnym kroku przeprowadzono reakcję, w której matrycę stanowiło DNA homozygotycznych roślin odpornych i wrażliwych na porażenie mączniakiem. W wyniku reakcji wyselekcjonowano 5 par starterów inicjujących amplifikację oczekiwanego produktu wyłącznie w próbkach homozygotycznych roślin odpornych (Tab.11). Startery te przetestowano na 94 osobnikach populacji Canyon x Fuchs. Wszystkie zaprojektowane pary starterów inicjowały amplifikację oczekiwanych produktów PCR w obrębie populacji Canyon x Fuchs (Fot.1). Dla markera oznaczonego jako DArT 44 zaobserwowano 9 niedopasowań oczekiwanego produktu do fenotypu rośliny, dla markera DArT 58 – 7 niedopasowań zaś dla markera DArT 70 -8. Produkty PCR uzyskane dla 2 pozostałych markerów nie pokrywały się z fenotypem ustalonym dla roślin populacji Canyon x Fuchs.

Tabela 11. Markery silicoDArT specyficzne dla genu odporności zidentyfikowanego w odmianie Canyon

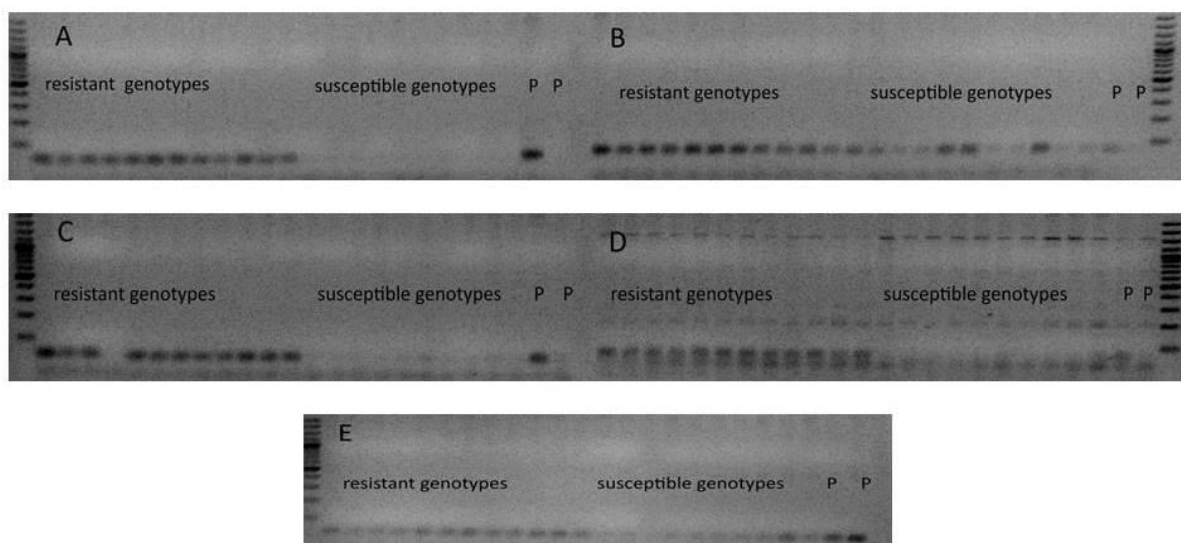
Marker silicoDArT	Specyficzne startery	Oczekiwany produkt	Liczba niedopasowań w
-------------------	----------------------	--------------------	-----------------------

		(pz)	populacji Canyon x Fuchs
22347068	M18_DArT44F ATCCAAGGCCGT M18_DArT44R AGCTCCAGATCGT	42	9
22347068	M18_DArT45F CCAAGGCCGTGGTGATTA M18_DArT45R CGGATCAACAAGCTCCAGAT	50	Brak dopasowania
20608956	M18_DArT58F TGTGAGCTGCAAGG M18_DArT58R CCCATTTACAGCTTC	62	7
20608963	M18_DArT70F CGAACTACCGAGTCTA M18_DArT70R GGTCGATTTACAGGTG	53	8
20608963	M18_DArT71F GAGGTGGCAATAGTCCATTCA M18_DArT71R GGACTGGTCGATTTACAGGTG	40	Brak dopasowania



Fot. 1. Produkty PCR uzyskane w wyniku włączenia do reakcji starterów M18\_DArT70 F i R w populacji Canyon x Fuchs

W 2018 roku podjęto próbę konwersji wybranych markerów silicoDArT sprzężonych z genami odporności na mączniaka prawdziwego w markery specyficzne oparte na PCR. Konwersji poddano 20 sekwencji specyficznych dla genu *Pm4*. W pierwszej kolejności przeprowadzono reakcję, w której matrycę stanowił DNA osobników odpornych i wrażliwych połączony w pule zgodnie z metodą BSA. W wyniku reakcji produkty amplifikacji specyficzne dla pul roślin odpornych uzyskano dla 5 spośród testowanych par starterów (Fot 2). W celu weryfikacji poprawności amplifikacji produktu PCR przeprowadzono reakcję, w której matrycę stanowiło DNA homozygotycznych roślin odpornych i wrażliwych. 3 pary starterów inicjowały amplifikację produktów wyłącznie u form odpornych. Wybrane pary starterów zweryfikowano w reakcji przeprowadzonej na całej populacji Av1860 x Fuchs. Analizy wykazały, że wszystkie 3 markery były wysoce skorelowane z analizowaną cechą (Tab. 12). Najlepszy współczynnik korelacji z cechą fenotypową uzyskano dla startera Pm4-9, który może być wykorzystany jako marker diagnostyczny dla genu *Pm4* w procesie selekcji wspieranej markerami.



Fot. 2. Profile prążków uzyskane dla odpornych i wrażliwych homozygotycznych osobników populacji Av1860 x Fuchs w wyniku włączenia do PCR starterów Pm4-2 (A), Pm4-3 (B), Pm4-6(C), Pm4-9 (D), Pm4-16 (E).

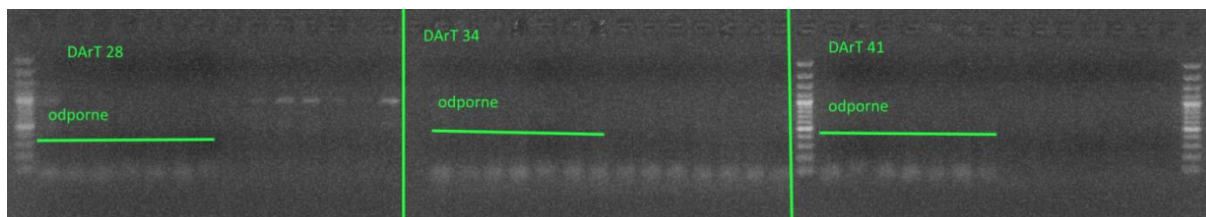
Tabela 12. Markery specyficzne dla genu *Pm4* uzyskane w wyniku konwersji markerów silicoDArT

silicoDArT marker	SCAR primers	Primers sequence	Primer TM	SCAR length	Segregation of converted markers	Correlation with phenotype observation
10575906	Pm4-2 F Pm4-2R	CAGCCGTGAGGGTGA GCTCTCCTTGTGAAGGTCCA	60 60	46	0,147 (p=0,50)	0,759
5420825	Pm4-6F Pm4-6R	GCCAAACCTGATAGTGACCAA TACGCCAAGCGTGCAGTTA	60 60	47	0,147(p=0,50)	0,705
22075478	Pm4-9F Pm4-9R	GCAGGTGTGTCTGAATGTCG GGGCATCAGGCATATCG	60 58	68	4,461(p=0,02)	0,744

Konwersji poddano 15 sekwencji silicoDArT specyficznych dla genu *Pm7*. W pierwszej kolejności przeprowadzono reakcję, w której matrycę stanowił DNA osobników odpornych i wrażliwych połączony w pulę zgodnie z metodą BSA. W wyniku reakcji produkty amplifikacji specyficzne dla pul roślin odpornych uzyskano dla 10 spośród testowanych par starterów. W celu weryfikacji poprawności amplifikacji produktu PCR przeprowadzono reakcję, w której matrycę stanowiło DNA homozygotycznych roślin odpornych i wrażliwych. 6 par starterów inicjowało amplifikację produktów wyłącznie u form odpornych (Tab.13., Fot 3). Startery te przetestowano na 94 osobnikach populacji APR122 x Fuchs. Wszystkie zaprojektowane pary starterów inicjowały amplifikację oczekiwanych produktów PCR w obrębie analizowanej populacji. Dla markerów DArT 25, DArT 53, DArT63 dane fenotypowe uzyskane w testach żywiciel-patogen nie pokrywały się z danymi uzyskanymi dla przekonwertowanych markerów silicoDArT. W przypadku markerów DArT 28, DArT 34 i DArT 41 dane fenotypowe pokrywały się z danymi uzyskanymi w PCR dla ok 70% analizowanych roślin w populacji. Zbyt duża liczba niedopasowań produktu PCR i fenotypu rośliny wskazuje na zbyt niskie sprzężenie markera z analizowaną cechą a tym samym ogranicza wykorzystanie takich markerów w procesie selekcji.

Tabela 13. Markery silicoDArT specyficzne dla genu *Pm7* odporności na mączniaka prawdziwego w owsie

Marker silicoDArT	Specyficzne startery	Oczekiwany produkt (pz)	Liczba niedopasowań w populacji Canyon x Fuchs
22346796	Pm7_DArT_25F CGCGGCGTACATATACT Pm7_DArT_25R GAGCACCTCCAATGGT	55	Brak dopasowania
20603738	Pm7_DArT_28F GCTCCATAACCTCCA Pm7_DArT_28R GTACGGGGCAACTA	49	25
22346751	Pm7_DArT_34F CAAGAATCGGTGAGCAA Pm7_DArT_34R GGCAGGCATGAGAA	55	23
22346772	Pm7_DArT_41F GTCGATCCAATGAAGAT Pm7_DArT_41R AGACTTTCCGCAGC	58	28
20603748	Pm7_DArT_53F AGCAGCTTGGAGAGT Pm7_DArT_53R GAGGATGCCGTGGAT	51	Brak dopasowania
20608975	Pm7_DArT_63F GGAGAGAGAGAAGAAGTGA Pm7_DArT_63R GGTAAACAATTGGTTTGTGG	58	Brak dopasowania



Fot. 3. Profile prążków uzyskane dla odpornych i wrażliwych homozygotycznych osobników populacji APR122 x Fuchs w wyniku włączenia do PCR starterów Pm7\_DArT28, Pm7\_DArT34, Pm7\_DArT41

#### Mierniki dla tematu badawczego 5 (podać w tabeli)

Lp.	Miernik <sup>5</sup>	Wartość miernika podana w opisie zadania	Wartość miernika zrealizowana
1	Liczba osobników poddanych analizie typu DArTseq z populacji Canyon x Fuchs	160	160

### 3.5 Temat badawczy 6: Konwersja markerów losowych na markery specyficzne

#### Cel tematu badawczego 6

Celem prac prowadzonych w ramach tematu 6 w 2018 roku było:

- poszukiwanie i weryfikacja losowych markerów RAPD i SRAP sprzężonych z genem *Pm4* odporności na mączniaka prawdziwego w owsie.
- poszukiwanie i weryfikacja losowych markerów RAPD i SRAP sprzężonych z genem *Pm7* odporności na mączniaka prawdziwego w owsie.
- poszukiwanie i weryfikacja losowych markerów RAPD i SRAP sprzężonych z genem odporności na mączniaka prawdziwego zidentyfikowanym w odmianie Canyon.

#### *Materiały i metody*

Przedmiotem analiz były wzory prążkowe uzyskane w wyniku reakcji RAPD-PCR i SARP-PCR dla homozygotycznych osobników populacji Av1860 x Fuchs x genem *Pm4*, populacji APR122 x Fuchs z genem *Pm7* oraz populacji Canyon x Fuchs z nowym genem odporności na mączniaka prawdziwego. Wszystkie wzory prążkowe uzyskane w wyniku elektroforezy agarozowej zarówno w 2016, 2017 jak i 2018 roku, zostały przeanalizowane pod kątem identyfikacji takich produktów, które będą występowały jedynie u form odpornych lub jedynie u form wrażliwych. Do analizy wykorzystano program komputerowy CLIQS 1D PRO (<http://totallab.com/>).

Zidentyfikowane potencjalne markery sprzężone z genami odporności na mączniaka prawdziwego w owsie zweryfikowano w PCR, w którym matrycę stanowił DNA

<sup>5</sup> Podać miernik – np. ilość planowanych testów, prób, badanych genotypów etc.

wyizolowany z pojedynczych homozygotycznych roślin populacji F<sub>2</sub>. Skład mieszaniny reakcyjnej był następujący: 1 x bufor do PCR (10 mM Tris pH 8.8, 50 mM KCl, 0.08% Nonidet P40), 160 M każdego dNTP, 5,3 pM startera, 1mM MgCl<sub>2</sub>, 60 ng genomowego DNA, 0.4 U Taq DNA Polymerase. Reakcje amplifikacji przeprowadzono na termocyklerze Thermalcycler T1 Biometra z zastosowaniem następującego profilu termicznego: wstępna denaturacja przez 3 min. w 94°C, 44 cykle: 94 °C - 45 s, 37 °C - 45 s, 72 °C - 45 s, z końcową inkubacją 7 min. w 72 °C. Produkty reakcji rozdzielano na 1,5% żelu agarozowym zawierającym bromek etydyny. Produkty specyficzne dla pul roślin odpornych lub wrażliwych poddano klonowaniu za pomocą zestawu TOPO™ TA Cloning™ Kit for Sequencing (Invitrogen). Do uzyskanych sekwencji zaprojektowano po 2 pary specyficznych starterów wykorzystując program CLC MYWorkbench 8.1. Poprawność procesu konwersji sprawdzano w PCR, w którym matrycę stanowił DNA wyizolowany z pojedynczych homozygotycznych roślin populacji F<sub>2</sub>.

## Wyniki

Dokładna analiza wzorów prążkowych uzyskanych dla populacji Av1860 x Fuchs w wyniku reakcji RAPD-PCR (400 wzorów) i SRAP-PCR (200 wzorów) pozwoliła na wytypowanie markerów potencjalnie sprzężonych z genem *Pm4* odporności na mączniaka prawdziwego w owsie. Zidentyfikowano 6 markerów RAPD, z których 3 były specyficzne dla pul roślin odpornych i linii Av1860 z genem *Pm4*, pozostałe były specyficzne dla pul roślin wrażliwych. Spośród markerów SRAP zidentyfikowano 3 specyficzne dla pul roślin odpornych i linii Av1860 z genem *Pm4* (Tabela 14).

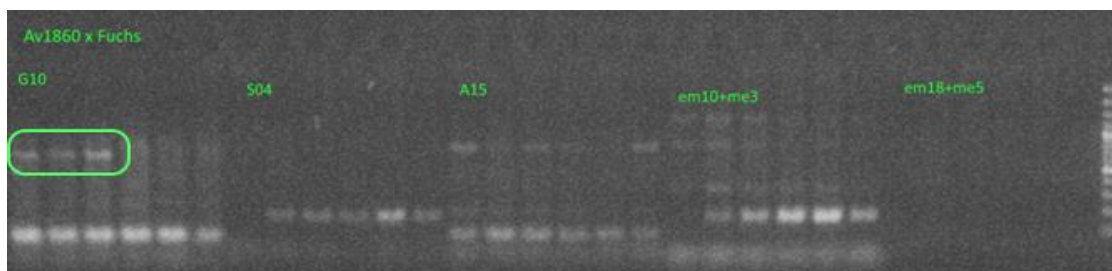
Tabela 14. Markery RAPD i SRAP potencjalnie sprzężone z genem *Pm4* odporności na mączniaka prawdziwego w owsie

Marker RAPD	Amplifikowany produkt	Pula roślin	Marker SRAP	Amplifikowany produkt	Pula roślin
G10	800 pz	odporne	Em1+me15	250 pz	odporne
L02	700 pz	odporne	Em 10+me 3	500 pz	odporne
Q04	450 pz	odporne	Em18+me5	520 pz	odporne
A15	600 pz	wrażliwe			
S04	350	wrażliwe			
E03	600	wrażliwe			

W celu weryfikacji powtarzalności uzyskanych wzorów prążkowych powtórzono reakcje, w których wykorzystano DNA pochodzące z pul roślin odpornych i wrażliwych na porażenie mączniakiem prawdziwym.

Kolejnym krokiem analiz była weryfikacja wybranych produktów w reakcji, w której matrycę stanowił DNA wyizolowany z pojedynczych roślin odpornych i wrażliwych na porażenie mączniakiem prawdziwym. Reakcje amplifikacji przeprowadzono dla 5 losowo wybranych homozygot odpornych i wrażliwych oraz dla form rodzicielskich. Przeprowadzone reakcje wykazały obecność oczekiwanego produktu dla osobników odpornych w przypadku starterów G10, em1+me15 i em10+me13 oraz dla osobników wrażliwych dla startera E03. W przypadku pozostałych starterów obserwowano brak powtarzalności w amplifikacji oczekiwanego produktu lub obecność oczekiwanych produktów dla wszystkich osobników zarówno odpornych jak i wrażliwych. Cztery wyselekcjonowane produkty poddano

sekwencjonowaniu. Do uzyskanych sekwencji zaprojektowano po 2 pary specyficznych starterów. Poprawność amplifikacji zaprojektowanych starterów sprawdzono w reakcji, w której matrycę stanowił DNA homozygotycznych osobników odpornych i wrażliwych połączonych w pule. W wyniku PCR oczekiwane produkt amplifikacji specyficzny dla homozygotycznych roślin odpornych uzyskano jedynie dla jednej pary starterów zaprojektowanych dla sekwencji G10. W przypadku pozostałych par starterów oczekiwane produkty amplifikacji obserwowano zarówno dla roślin odpornych jak i wrażliwych, niektóre startery inicjowały amplifikację szeregu produktów niespecyficznych lub obserwowano brak produktów amplifikacji (Fot.4).



Fot. 4. Profile prążków uzyskane dla pul roślin odpornych i wrażliwych populacji Av1860 x Fuchs

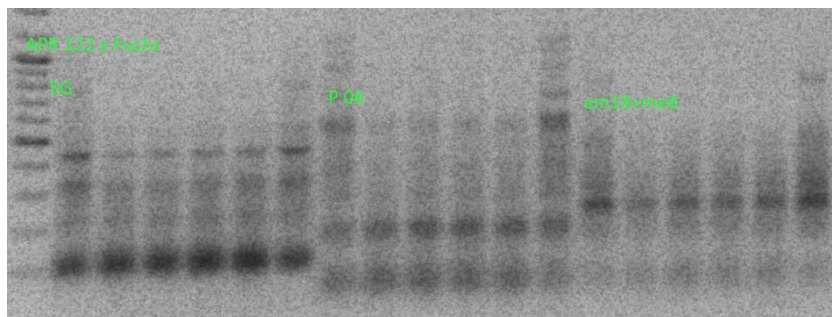
Dokładna analiza wzorów prążkowych uzyskanych dla populacji APR122 x Fuchs w wyniku reakcji RAPD-PCR (600 wzorów) i SRAP-PCR (200 wzorów) pozwoliła na wytypowanie markerów potencjalnie sprzężonych z genem *Pm7* odporności na mączniaka prawdziwego w owsie. Zidentyfikowano 3 markery RAPD, z których 2 były specyficzne dla pul roślin odpornych i linii APR122 z genem *Pm7*, 1 był specyficzny dla pul roślin wrażliwych i wrażliwej odmiany Fuchs. W przypadku metody SRAP zidentyfikowano 2 markery potencjalnie sprzężone z odpornością na mączniaka prawdziwego w owsie (Tabela 15).

Tabela 15. Markery RAPD i SRAP potencjalnie sprzężone z genem *Pm7* odporności na mączniaka prawdziwego w owsie

Marker RAPD	Amplifikowany produkt	Pula roślin	Marker SRAP	Amplifikowany produkt	Pula roślin
P04	700 pz	odporne	Em5+me20	400 pz	Odporne
O09	900 pz	Odporne	Em 8+18	450 pz	odporne
5G	600 pz	wrażliwe			

W celu weryfikacji powtarzalności uzyskanych wzorów prążkowych powtórzono reakcje, w których wykorzystano DNA pochodzące z pul roślin odpornych i wrażliwych na porażenie mączniakiem prawdziwym. W wyniku przeprowadzonych reakcji obecność produktów specyficznych dla pul roślin odpornych potwierdzono dla starterów RAPD: P04 i O09 oraz dla pary starterów SRAP; em5 +me20, starter RAPD 5G inicjował amplifikację produktu specyficznego dla pul roślin wrażliwych. Wyselekcjonowane produkty poddano sekwencjonowaniu. Do uzyskanych sekwencji zaprojektowano po 2 pary specyficznych starterów. Poprawność konwersji sprawdzono w reakcji, w której matrycę stanowił DNA wyizolowany z homozygot odpornych i wrażliwych. Po włączeniu do PCR starterów zaprojektowanych na podstawie fragmentów RAPD P04, O09 i 5G produkt amplifikacji obserwowano u wszystkich homozygot odpornych i wrażliwych (Fot. 5.) Również w przypadku konwersji markera uzyskanego na podstawie fragmentu em5+me20 nie przyniósł

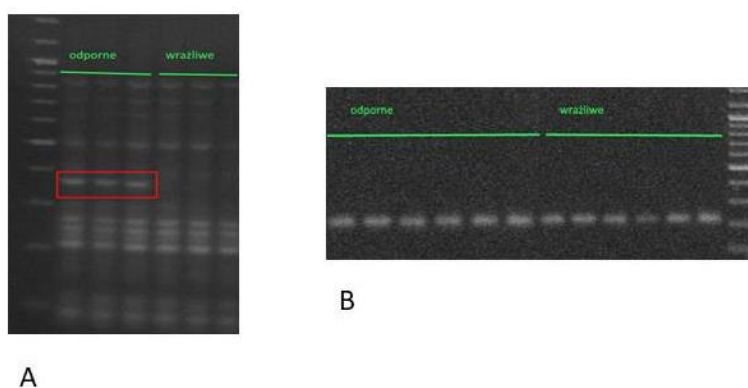
oczekiwanego rezultatu. Oczekiwany produkt amplifikacji obecny był u wszystkich homozygot odpornych i u 3 homozygot wrażliwych.



Fot. 5. Profile prążków uzyskane dla pul roślin odpornych i wrażliwych populacji APR122 x Fuchs

Dokładna analiza wzorów prążkowych uzyskanych dla populacji Canyon x Fuchs w wyniku reakcji RAPD-PCR (600 wzorów) i SRAP-PCR (200 wzorów) pozwoliła na wytypowanie markerów potencjalnie sprzężonych z efektywnym genem odporności na mączniaka prawdziwego zidentyfikowanym w odmianie Canyon. W rezultacie zidentyfikowano 1 marker SRAP specyficzny dla pul roślin odpornych i odmiany Canyon. Para starterów em10+me13 inicjowała amplifikację produktu wielkości ok. 380 pz specyficznego dla pul roślin odpornych (Fot 2A). Wśród analizowanych wzorów prążkowych uzyskanych w wyniku włączenia do PCR starterów RAPD nie zidentyfikowano produktów specyficznych dla pul roślin odpornych.

W celu weryfikacji uzyskanego wzoru prążkowego powtórzono reakcje, w której wykorzystano DNA pochodzące z homozygotycznych roślin odpornych i wrażliwych na porażenie mączniakiem prawdziwym. W wyniku reakcji obecność produktu specyficznego dla roślin odpornych stwierdzono u wszystkich homozygot odpornych. Wyselekcjonowany produkt poddano sekwencjonowaniu. Do uzyskanej sekwencji zaprojektowano 2 pary specyficznych starterów. Przekonwertowane markery inicjowały amplifikację oczekiwanego produktu u wszystkich homozygot odpornych i wrażliwych (Fot.2B)



Fot. 2. Produktu PCR uzyskane po włączeniu do reakcji pary starterów 1A: SRAP em10+me13 oraz 1B przekonwertowanych starterów dla produktu specyficznego dla pul roślin odpornych.

**Mierniki dla tematu badawczego 6 (podać w tabeli)**

Lp.	miernik <sup>6</sup>	Wartość miernika podana w opisie zadania	Wartość miernika zrealizowana
1	Liczba przeanalizowanych wzorów prążkowych RAPD dla populacji Av1860 x Fuchs	400	400
2	Liczba przeanalizowanych wzorów prążkowych SRAP dla populacji Av1860 x Fuchs	200	200
3	Liczba przeanalizowanych wzorów prążkowych RAPD dla populacji APR122 x Fuchs	600	600
4	Liczba przeanalizowanych wzorów prążkowych SRAP dla populacji APR122 x Fuchs	200	200
5	Liczba przeanalizowanych wzorów prążkowych RAPD dla populacji Canyon x Fuchs	400	400
6	Liczba przeanalizowanych wzorów prążkowych SRAP dla populacji Canyon x Fuchs	200	200

**4. Planowana prezentacja wyników badań** (podać w tabeli - należy wymienić konferencje, na których zaprezentowano wyniki i/lub wymienić publikacje, przygotowane i przyjęte do druku w trakcie realizacji zadania w danym roku).

Prezentacja wyników na konferencjach				
Lp.	Konferencja	prezentacja <sup>7</sup>	Liczba prezentacji podana w opisie zadania	Liczba prezentacji zrealizowana
1	17th EWAC – The European Cereals Genetics Co-operative EUCARPIA Cereals Section International Conference 03 - 08 czerwca 2018, Bukareszt, Rumunia.	poster	1	1
2	17th EWAC – The European Cereals Genetics Co-operative EUCARPIA Cereals Section International Conference 03 - 08 czerwca 2018, Bukareszt, Rumunia.	referat	0	1
3	Ogólnopolska Konferencja Naukowa „Genetyka, hodowla i biotechnologia roślin – osiągnięcia, wyzwania, perspektywy” Lublin, 25-27 czerwca 2018 r.	referat	0	1
4	15 <sup>TH</sup> International Cereal Rusts And Powdery Mildews Conference 2018, 23 –26 September 2018 Skukuza, Republika Południowej Afryki	Poster/referat (poster i referat dotyczyły tego samego tematu)	0	1
Publikacje w monografiach/czasopismach recenzowanych				
Lp.	Monografia/Czasopismo	publikacja <sup>8</sup>	Liczba publikacji podana w opisie zadania	Liczba publikacji zrealizowana
1	Molecular identification of <i>Pm4</i> powdery mildew resistant gene in oat. Notulae Botanicae Horti Agrobotanici Cluj-Napoca 2018, 46(2):350-355.	Publikacja oryginalna	1	1

Jeśli któryś z mierników nie został zrealizowany należy podać przyczyny.

<sup>6</sup> Podać miernik – np. ilość planowanych testów, prób, badanych genotypów etc.

<sup>7</sup> Podać, czy chodzi o wykład plenarny, doniesienie konferencyjne czy poster.

<sup>8</sup> Podać, czy chodzi o publikację oryginalną, czy np. polemika, list do edytora, rozdział w monografii etc.



## 6. Miernik zadania – stopień realizacji

L.p.	Miernik	Wartość miernika podana w opisie zadania	Wartość miernika zrealizowana	Stopień realizacji zadania
1	2	3	4	5
<b>Temat badawczy 1</b>				
1.1	Liczba lokalizacji, w których przeprowadzono obserwacje porażenia mączniakiem prawdziwym zestawu 7 linii i odmian kontrolnych	4	4	1,00
1.2	Liczba izolatów użytych do analizy zmienności populacji mączniaka prawdziwego	40	40	1,00
1.3	Liczba kombinacji starterów SRAP użyta do analizy zróżnicowania genetycznego mączniaka prawdziwego	50	50	1,00
<b>Temat badawczy 3</b>				
3.1	Liczba wykonanych kombinacji krzyżówkowych	100	100	1,00
<b>Temat badawczy 4</b>				
4.1	Liczba osobników wybranych do analiz molekularnych z populacji Canyon x Fuchs	62	62	1,00
4.2	Liczba przetestowanych starterów RAPD dla populacji Canyon x Fuchs	400	400	1,00
4.3	Liczba przetestowanych kombinacji starterów SRAP dla populacji Canyon x Fuchs	200	200	1,00
<b>Temat badawczy 5</b>				
5.1	Liczba osobników poddanych analizie typu DArTseq z populacji Canyon x Fuchs	160	160	1,00
<b>Temat badawczy 6</b>				
6.1	Liczba przeanalizowanych wzorów prążkowych RAPD dla populacji Av1860 x Fuchs	400	400	1,00
6.2	Liczba przeanalizowanych wzorów prążkowych SRAP dla populacji Av1860 x Fuchs	200	200	1,00
6.3	Liczba przeanalizowanych wzorów prążkowych RAPD dla populacji APR122 x Fuchs	600	600	1,00
6.4	Liczba przeanalizowanych wzorów prążkowych SRAP dla populacji APR122 x Fuchs	200	200	1,00
6.5	Liczba przeanalizowanych wzorów prążkowych RAPD dla populacji Canyon x Fuchs	400	400	1,00
6.6	Liczba przeanalizowanych wzorów prążkowych SRAP dla populacji Canyon x Fuchs	200	200	1,00
			średnia	1,00
			% realizacji zadania	100%

Sporządzono:

Pieczęć jednostki

Osoba reprezentująca jednostkę

Kierownik zadania

data

podpis i pieczęć

podpis