

SPRAWOZDANIE MERYTORYCZNE
z realizacji zadania na rzecz postępu biologicznego w produkcji roślinnej w 2019 roku

A. INFORMACJE OGÓLNE

Tytuł zadania - Wytwarzanie nowych źródeł genetycznych pszenżyta w oparciu o krzyżowanie oddalone
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. Nr 91, poz. 595, z późn. zm.)) - 17
Planowany okres realizacji zadania: 2019
Planowane nakłady w zł: 48 240

B. DANE WNIOSKODAWCY

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

C. INFORMACJA O WYKONAWCACH

1. Zespół badawczy

Kierownik zadania		
imię i nazwisko	stopień i tytuł naukowy	miejsce zatrudnienia
Justyna Leśniowska-Nowak	dr	UP w Lublinie
Wykonawcy zadania		
imię i nazwisko	stopień i tytuł naukowy	miejsce zatrudnienia
Michał Nowak	dr	UP w Lublinie
Sylwia Okoń	dr	UP w Lublinie
Magdalena Sozoniuk	dr	UP w Lublinie
Aleksandra Nucia	dr	UP w Lublinie
Aneta Koroluk	mgr inż	UP w Lublinie
Magdalena Kawęcka	mgr inż.	UP w Lublinie
Karolina Różaniecka	inż.	UP w Lublinie

2. Kierownik zadania (imię, nazwisko, tytuł lub stopień naukowy, adres do korespondencji, telefon bezpośredni i do sekretariatu jednostki organizacyjnej zatrudniającej kierownika zadania, e-mail kierownika; telefon do oraz dane osoby, z którą można się kontaktować w razie nieobecności kierownika zadania)

dr Justyna Leśniowska-Nowak
ul. Akademicka 15
20-950 Lublin
tel. 81 445 66 25, 602 621 709
Sekretariat Uczelni – tel. 81 445 66 22
e-mail: justyna.lesniowska@up.lublin.pl
dr Michał Nowak – tel. 81 445 69 01, 784 099 589

D. OPIS ZADANIA

1. Cele zadania

Lp.	Cel (zgodnie ze szczegółowym opisem na dany rok)	Czy cel został zrealizowany (tak/nie ¹ /częściowo ¹)
1	Uzyskanie mieszańców wstecznych (BC ₂) w wyniku krzyżowania roślin pokolenia BC ₁ uzyskanych z krzyżowania wstecznego mieszańców F ₁ otrzymanych z krzyżowania kociońców z pszenicą oraz pszenżytem	TAK
2	Analiza wysokości oraz podstawowych komponentów plonu roślin populacji F ₂ pochodzącej z krzyżowania wysokiej linii żyta 541 z karłową linią 84A/1	TAK
3	Zwiększenie wydajności uzyskiwania mieszańców oddalonych poprzez zastosowanie opracowanej metodyki embryo rescue.	TAK
4	Konwersja markerów DArT uzyskanych dla populacji CZR876/01×CZR891/01	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 zazębiać. Suma kosztów tematów badawczych musi być równa całkowitemu kosztowi zadania.

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

Lp.	Nazwa tematu badawczego	Termin rozpoczęcia – zakończenia realizacji tematu badawczego w miesiącach od rozpoczęcia realizacji zadania	Przewidywane koszty realizacji tematu badawczego
1	Uzyskiwanie mieszańców poprzez krzyżowanie (kastrowanie i zapylenie) roślin	5-12	28 240
2	Ocena zmienności cech w mieszańcach	1-12	12 000
3	Izolacja uzyskanych zarodków i prowadzenie kultur <i>in vitro</i>	6-12	2 000
4	Analizy molekularne uzyskanych mieszańców	1-12	6 000
Razem			48 240

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: Uzyskiwanie mieszańców poprzez krzyżowanie (kastrowanie i zapylenie) roślin.

Cel tematu badawczego 1

Celem zadania 1 było uzyskanie mieszańców wstecznych (BC₂) w wyniku krzyżowania roślin pokolenia BC₁ otrzymanych z krzyżowania kociołców z pszenicą i pszenżytem oraz jednokrotnego krzyżowania z odmianą uprawną.

Materiały i metody *(opisać jak w publikacji)*

W bieżącym sezonie wegetacyjnym do wykonania potencjalnych krzyżowań wysadzonych zostało 11 kombinacji mieszańców BC₁, a także wysiano 13 odmian pszenżyta. Ponadto wysiane zostały linie i odmiany pszenicy w liczbie 22.

Wybrane formy wysiewane były na poletkach 2-rzędowych, w siewie gęstym, rzutowym (około 300 ziarniaków na m²). Rozstawa rzędów wynosiła 20 cm.

Tuż przed kwitnieniem na poletkach doświadczalnych kastrowane były kwiaty w kłosach roślin przeznaczonych na formy mateczne. Kastracja wykonana była metodą manualną. Z każdego kłoska usunięte zostały środkowe kwiaty, a z pozostałych, bocznych kwiatów usunięto po trzy niedojrzałe pylniki. Na wykastrowany kłos założono izolator. Następnie na dojrzałe znamię słupka nanoszono pyłek z roślin przeznaczonych na formę ojcowską.

Schemat krzyżowań planowanych na rok 2019	Liczba kombinacji
Mieszańce BC ₁ × odmiana	50

Wyniki

Wszystkie krzyżowane kłosy poddane były ocenie pod kątem liczby zawiązanych ziarniaków oraz wykastrowanych kwiatów. Na podstawie tych danych obliczona została zdolność kombinacyjna poszczególnych form wyrażona w %.

Dla każdego mieszańca oddalonego obliczono zdolność kombinacyjną w krzyżowaniach wstecznych z pszenżytem wg wzoru: liczba zawiązanych ziarniaków/liczba wykastrowanych kwiatów*100. Zdolność kombinacyjna wahała się od 0% do 64% dla mieszańców oddalonych.

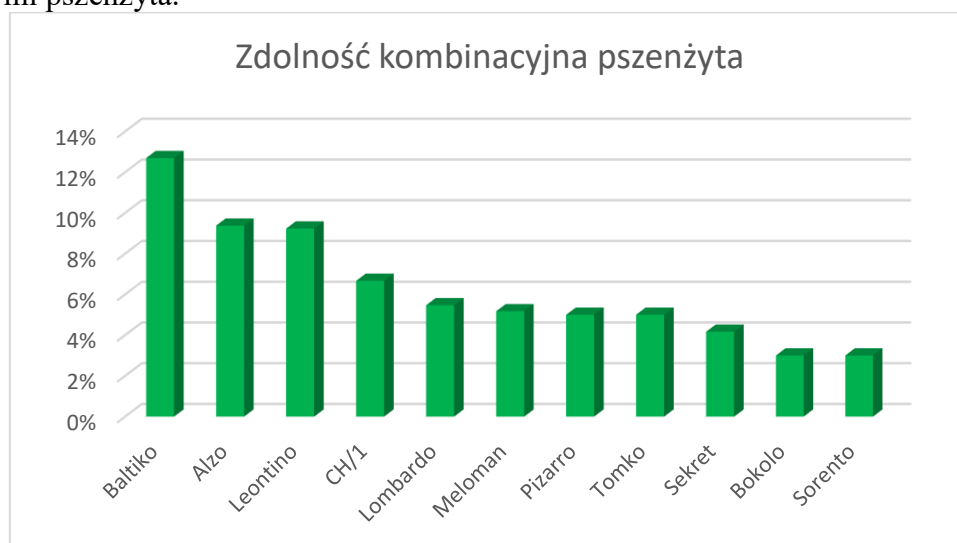
Tab. 1 Kombinacje krzyżówkowe wykonane w ramach zadania

Lp.	Kombinacja krzyżówkowa	Liczba kwiatów	Liczba ziarniaków	Zdolność kombinacyjna
1	[(54×Bokolo)/1 × Bokolo] × Bokolo	32	2	6%
2	[(54×Bokolo)/2 × Bokolo] × Bokolo	34	1	3%
3	[(54×Bokolo)/3 × Bokolo] × Bokolo	34	3	9%
4	[(54×Bokolo)/4 × Bokolo] × Bokolo	34	0	0%
5	[(54×Bokolo)/5 × Bokolo] × Bokolo	32	0	0%
6	[(54×Bokolo)/6 × Bokolo] × Bokolo	34	0	0%
7	[(Ae52×Baltiko)/1 × Baltiko] × Baltiko	28	9	32%
8	[(Ae52×Baltiko)/2 × Baltiko] × Baltiko	20	2	10%
9	[(Ae52×Baltiko)/3 × Baltiko] × Baltiko	24	1	4%
10	[(Ae52×Baltiko)/4 × Baltiko] × Baltiko	20	7	35%
11	[(Ae52×Baltiko)/5 × Baltiko] × Baltiko	20	0	0%
12	[(Ae52×Baltiko)/6 × Baltiko] × Baltiko	24	0	0%
13	[(Ae52×Baltiko)/7 × Baltiko] × Baltiko	20	0	0%
14	[(Leontino×Ae78) × Baltiko] × Baltiko	40	35	88%
15	[(Leontino×Ae78) × Baltiko] × Baltiko	28	18	64%
16	[(Leontino×Ae78) × Baltiko] × Baltiko	36	14	39%
17	[(Lombardo×Ae45) × Lombardo] × Baltiko	20	1	5%
18	[(Meloman×Ae89)/1 × Meloman] × Meloman	28	1	4%
19	[(Meloman×Ae89)/2 × Meloman] × Meloman	28	1	4%
20	[(Meloman×Ae89)/3 × Meloman] × Meloman	20	2	10%
21	[(Tomko×Ae87)/1 × Bokolo] × Meloman	24	1	4%
22	[(Tomko×Ae87)/2 × Bokolo] × Bokolo	34	1	3%
23	[(Tomko×Ae87) × CH/1] × Bokolo	30	2	7%
24	[(Tomko×Ae87) /1 × Tomko] × Tomko	28	2	7%
25	[(Tomko×Ae87)/2 × Tomko] × Meloman	24	1	4%
26	[(Tomko×Ae87)/3 × Tomko] × Meloman	24	4	17%
27	[(Ae156 × Tomko) × Pizarro] × Tomko	28	3	11%
28	[(Ae156 × Tomko) × Tomko] × Tomko	34	0	0%
29	[(Ae87 × Tomko) × Pizarro] × Meloman	32	0	0%
30	[(Ae125×Lombardo)/1 × Lombardo] × Lombardo	36	3	8%
31	[(Ae125×Lombardo)/2 × Lombardo] × Lombardo	36	3	8%
32	[(Ae125×Lombardo)/3 × Lombardo] × Lombardo	36	0	0%
33	[(Ae128×Lombardo)/1 × Alzo] × Lombardo	32	7	22%
34	[(Ae128×Lombardo)/2 × Alzo] × Lombardo	32	5	16%
35	[(Ae128×Lombardo)/3 × Alzo] × Alzo	32	0	0%
36	[(Ae128×Lombardo)/4 × Alzo] × Alzo	32	0	0%
37	[(Sekret×Ae87) × Sekret/1] × Sekret	24	1	4%
38	[(Tomko×Ae87) × Tomko] × Bokolo	24	1	4%

39	[(Algoso×Ae102) × Algoso]/1 × Leontino	24	5	21%
40	[(Algoso×Ae102) × Algoso]/1 × Leontino	28	6	21%
41	[(Algoso×Ae102) × Algoso]/2 × Leontino	30	0	0%
42	[(Algoso×Ae102) × Algoso]/3 × Leontino	24	0	0%
43	[(Meloman × Ae89) × Meloman] × Leontino	24	1	4%
44	[(Meloman×Ae83) × Sekret]/1 × Sorento	20	1	5%
45	[(Meloman×Ae83) × Sekret]/2 × Sorento	20	0	0%
46	[(Meloman×Ae89) × Meloman]/1 × Meloman	20	1	5%
47	[(Meloman×Ae89) × Meloman]/2 × Meloman	20	1	5%
48	[(Tomko×Ae89) × Meloman]/1 × Bokolo	20	1	5%
49	[(Tomko×Ae89) × Meloman]/2 × Bokolo	20	1	5%
50	[(Tomko×Ae89) × Meloman]/3 × Bokolo	36	1	3%

Obliczono również zdolność kombinacyjną dla wszystkich odmian i rodów pszenżyta, które były wykorzystywane w krzyżowaniu mieszańców. Wahala się ona od 13% dla odmiany Baltiko do 3% dla Bokolo i Sorento (Rys. 1).

Rys. 1 Zdolność kombinacyjne odmian i rodów pszenżyta w krzyżowaniu z mieszańcami oddalonymi pszenżyta.



W ramach zadania obliczono również zdolność kombinacyjną dla mieszańców pokolenia BC₁. Wahala się ona od 64% dla mieszańca (Leontino x Ae78) × Baltiko do 0% dla mieszańców (Ae156 × Tomko) × Tomko i (Tomko × Ae89) × Meloman (Rys. 2).

Rys.2 Zdolność kombinacyjna dla mieszańców oddalonych pszenżyta w krzyżowaniu wstecznym.



Wnioski

1. Zdolność kombinacyjna mieszańców wstecznych różniła się w zależności od kombinacji.
2. Gatunki z rodzaju *Aegilops*, ze względu na możliwość krzyżowania zarówno z pszenicą, jak i z pszenżytem, stanowią cenne źródło genetyczne możliwe do wykorzystania w pracach mających na celu poszerzenie zmienności genetycznej tych zbóż na drodze krzyżowań oddalonych.

Ocena szans na osiągnięcie założonego celu, ocena istniejącego ryzyka

Liczba zaplanowanych krzyżowań zależna jest od warunków atmosferycznych, w związku z czym może ona podlegać zmianie (zakładana fluktuacja $\pm 5\%$).

Mierniki dla tematu badawczego 1 (podać w tabeli)

Lp.	miernik ²	Wartość miernika podana w opisie	Wartość miernika zrealizowana
1	Liczba wykonanych kombinacji krzyżówkowych.	50	50

4.2 Temat badawczy 2: Ocena zmienności cech w mieszańcach

Celem zadania 2 jest analiza wysokości oraz podstawowych elementów plonu mieszańców oddalonych z kuziencami

Materiały i metody (opisać jak w publikacji)

Przedmiot badań stanowić będą pojedyncze rośliny mieszańcowe populacji F₂ uzyskane w wyniku krzyżowania wysokiej linii wsobnej żyta 541 z karłowym mutantem 84A/1 oraz formy rodzicielskie (Tab. 2).

Tab. 2. Formy przeznaczone do oceny laboratoryjnej

² Podać miernik – np. ilość testów, prób, badanych genotypów etc.

Kombinacja krzyżówkowa	Liczba analizowanych roślin mieszańcowych	Formy rodzicielskie	Liczba analizowanych roślin rodzicielskich
541×84A/1	25	541	25
		84A/1	25

Ocenię fenotypowej poddano pędy główne wszystkich roślin w fazie dojrzałości pełnej.

Ocenię laboratoryjnej poddano następujące elementy:

- długość pędu głównego [cm],
- długość osadki kłosowej [cm],
- liczba kłosek w kłosie głównym,
- zbitość kłosa głównego,
- liczba ziarniaków w kłosie głównym,
- masa ziarniaków z kłosa głównego [g],
- płodność kłoska (liczba ziarniaków przypadających na kłosek kłosa głównego),
- masa 1000 ziarniaków [g].

Zbitość kłosa głównego, płodność kłoska oraz masę 1000 ziarniaków obliczono za pomocą wzorów:

$$\text{Zbitość kłosa głównego} = \frac{\text{liczba kłosek w kłosie głównym} - 1}{\text{długość osadki kłosowej kłosa głównego [dm]}}$$

$$\text{Płodność kłoska} = \frac{\text{liczba ziarniaków w kłosie głównym}}{\text{liczba kłosek w kłosie głównym}}$$

$$\text{Masa 1000 ziarniaków} = \frac{\text{masa ziarniaków z kłosa głównego} \times 1000}{\text{liczba ziarniaków w kłosie głównym}}$$

Analizy statystyczne wykonane były z wykorzystaniem programu Statistica 13.1. Do określenia istotności różnic pomiędzy średnimi grupowymi w układzie analizy wariancji zastosowany został test post-hoc HSD Tukey'a przy poziomie istotności $\alpha = 0,05$.

Analiza statystyczna wysokości roślin mieszańcowych i form rodzicielskich wykazała, że forma karłowa 84A/1 była istotnie niższa zarówno od mieszańców jak i wysokiego komponentu rodzicielskiego. Mieszańce miały pośrednią wysokość istotnie niższą od rodu 541 i istotnie wyższą od rodu 84A/1. Analiza długości kłosa głównego wykazała, że kłos karłowej formy był istotnie krótszy aniżeli kłos form mieszańcowych i rodu wysokiego. Pod względem długości kłosa mieszańców i roślin formy 541 nie stwierdzono statystycznie istotnych różnic. Wykazano natomiast, że liczba kłosek w kłosie głównym jest istotnie wyższa jedynie u form wysokich w porównaniu z mieszańcami i rodem karłowym. Najwyższą liczbę ziarniaków w kłosie miały rośliny mieszańcowe. Liczba ta była istotnie wyższa od liczby ziarniaków u matecznej formy 541. Nie różniła się natomiast od formy ojcowskiej. Mieszańce F₂ charakteryzowały się ponadto masą ziarniaków z kłosa, która była istotnie wyższa od obu form rodzicielskich. Pod względem zbitości kłosa oraz MTZ nie stwierdzono istotnych różnic pomiędzy mieszańcami a formami rodzicielskimi. Wykazano natomiast, że płodność kłoska w mieszańcach była istotnie wyższa w porównaniu z rodem 541 (Tab. 3).

Kombinacja krzyżówkowa	Wysokość [cm]	Dł. Kłosa [cm]	L. kłosków w kłosie	L. ziarniaków w kłosie	Masa ziarniaków w kłosie [g]	Zbitość kłosa	Płodność kłoska	MTZ
541x84A/1	100,13 ^a	12,24 ^a	27,55 ^a	51,05 ^a	1,58 ^a	2,36 ^a	2,09 ^a	29,43 ^a
541	131,60 ^b	12,53 ^a	34,20 ^b	38,93 ^{ab}	1,08 ^b	2,68 ^a	1,17 ^b	29,23 ^a
84A/1	52,53 ^c	9,1 ^b	23,93 ^a	37,07 ^b	0,92 ^b	2,73 ^a	1,53 ^{ab}	23,03 ^a

Tab. 3. Istotność różnic dla podstawowych komponentów plonu uzyskanych dla mieszańców

Wnioski

1. Formy mieszańcowe wykazywały istotnie wyższą masę ziarniaków z kłosa w porównaniu do form rodzicielskich
2. Krzyżowanie nie powodowało redukcji ani wzrostu MTZ w pokoleniu F₂
3. Mieszańce charakteryzowały się istotnie wyższą liczbą ziarniaków z kłosa głównego

Mierniki dla tematu badawczego 2 (podać w tabeli)

Lp.	miernik ³	Wartość miernika podana w opisie	Wartość miernika zrealizowana
1	Liczba fenotypowanych roślin	75	75

4.3 Temat badawczy 3: Izolacja uzyskanych zarodków i prowadzenie kultur *in vitro*.

Cel tematu badawczego

Celem zadania 3 było zwiększenie wydajności uzyskiwania mieszańców międzyrodzajowych pszenicy i pszenżyta z kozieńcami poprzez zastosowanie techniki ratowania zarodków.

Materiały i metody (opisać jak w publikacji)

Mieszańce pokolenia BC₁ zostały wykastrowane, a następnie zapyłone pyłkiem pobranym z roślin odmian uprawnych. Spośród wszystkich wykonanych kombinacji krzyżówkowych, z 20 pobrano zarodki i przekazano do kultur *in vitro*. Zarodki były pobierane w okresie pomiędzy 18 a 21 dniem po zapyleniu. Pobrane zarodki były sterylizowane przez 2 minuty za pomocą 70% etanolu. W kolejnym kroku wszystkie ziarniaki zostały przepłukane trzykrotnie w wodzie destylowanej.

Tak przygotowane zarodki mieszańcowe poddawano procedurze ratowania zarodków (embryo rescue) w warunkach kultury *in vitro*. W tym celu przenoszono je na pożywkę MS z dodatkiem hydrolizatu kazeiny. W pierwszym etapie (5 dni) przetrzymywano je w ciemności w temperaturze 25°C. Po tym czasie skiełkowane zarodki umieszczono w laboratorium kultur *in vitro* przy fotoperiodzie 16/8. Uzyskane roślinki przesadzono do doniczek w celu ich adaptacji do środowiska, a następnie do warunków polowych.

Wyniki

Do rozwoju w kulturach *in vitro* przekazano 10 zarodków (Tab. 4). Pozostałe ziarniaki zostały wysiane bezpośrednio do ziemi. Spośród wyłożonych 10 zarodków uzyskano 5 roślin. Daje to wydajność na poziomie 50%.

Lp.	Kombinacja z pszenżytem	L. zarodków	L. roślin
1	(54×Bokolo)/1 × Bokolo × Bokolo	1	0
2	(54×Bokolo)/2 × Bokolo × Bokolo	1	0
3	(Ae125×Lombardo)/1 × Lombardo × Lombardo	1	0
4	(Ae128×Lombardo)/1 × Alzo × Lombardo	1	1
5	(Ae52×Baltiko)/1 × Baltiko × Baltiko	1	1
6	(Ae52×Baltiko)/4 × Baltiko × Baltiko	1	0
7	(Leontino×Ae78) × Baltiko × Baltiko	1	1

³ Podać miernik – np. ilość testów, prób, badanych genotypów etc.

8	(Tomko×Ae87)/3 × Tomko × Meloman	1	1
9	[(Algoso×Ae102) × Algoso]/1 × Leontino	1	0
10	[(Meloman×Ae83) × Sekret]/1 × Sorento	1	1
		10	5

Tab. 4. Kombinacje krzyżówkowe przekazane do Embryo Rescue.

Wnioski

1. Zastosowanie techniki ratowania zarodków umożliwiło zwiększenie wydajności uzyskiwania mieszańców międzyrodzajowych

Mierniki dla tematu badawczego 3 (podać w tabeli)

Lp.	miernik ⁴	Wartość miernika podana w opisie	Wartość miernika zrealizowana
1	Liczba kombinacji krzyżówkowych z których zarodki będą przeznaczone do kultur <i>in vitro</i>	10	10

4.4 Temat badawczy 4: Analizy molekularne uzyskanych mieszańców.

Cel tematu badawczego

Celem tematu była konwersja markerów sprzężonych z genem karłowatości zmapowanym na chromosomie 5R pszenżyta w populacji CZR876/01×CZR891/01

Spośród uzyskanych uprzednio markerów DArT wybrano 3 wykazujące największe sprzężenie z cechą (Tab. 5). Sekwencje wybranych markerów zblastowano względem sekwencji zgromadzonych w bazie NCBI dla rodziny *Poaceae* - zastosowano algorytmy blastn i megablast.

Tab. 5. Markery DArT poddane analizie przy pomocy narzędzia BLAST.

marker	sekwencja
3045942	TGCAGAGGGATAGAGCCATTGAACATGTTGCTGCCGAGGTCGAGCGAGCGCAGCCGCGAGAAGCTTGCC
4344398	TGCAGAATAACTCGTTTTCTGGAAGGATCCCACCG
4348428	TGCAGTTCGGCGACCTCTCCGAGATCGGAAGAGCGGTTTCAGCAGGAATGCCGAGACCGATCTCGTATGC
3604723	TGCAGTTGGAATGATATGAGCTCTGGCCAGCTCGTGAATAAAGCCG
3619640	TGCAGCAGCCTGAAAACAGAGCTCCCATCAGATACAGAACTGGCAATTCTAACACGAAGATGTTCCGA
3610345	TGCAGGGATAGAGCCGACAAGGTTGTTGCGGAAGAGATTCAGGATTTTCAGCTTGGTTGCCCTTGCCGAG
3615774	TGCAGTTCAGCCCGTCCCCGACCCACCACGGCCGTTGTTCTTGTCCACCGACGCTGGTAGAGTCCGAG
4354040	TGCAGCGTGTGGTGCTGCTGAGATCGCCACCGAGATCGGAAGAGCGGTTTCAGCAGGAATGCCGAGACC
8511729	TGCAGCTTGTGGCGTCGGCGTACGCGAAGTCGAACGCGCCGAGATCGGAAGAGCGGTTTCAGCAGGAAT

Do sekwencji obejmującej markery różnicujące zaprojektowano po 3 pary starterów (Tab. 7). Mieszanka reakcyjna o objętości 15 µl zawierała: 1 × bufor do PCR (10 mM Tris pH 8.8, 50 mM KCl, 0.08% Nonidet P40) (Thermo Scientific), 60 ng genomowego DNA, 160 µM każdego z dNTP-ów, 5,3 pM startera, 1,2 mM MgCl₂ oraz 0,5 U *Taq* DNA Polymerase (Thermo Scientific). Reakcje były przeprowadzone na termocyklerze T1 Biometra zgodnie z cyklem zawartym w Tab. 6.

⁴ Podać miernik – np. ilość testów, prób, badanych genotypów etc.

Tab 6. Cykl PCR do amplifikacji markera skonwertowanego w STS.

Etap	Temperatura (°C)	Czas	Liczba cykli
Wstępna denaturacja	95	2 min	x 1
Denaturacja	94	30 sek	x 30
Annealing	56	30 sek	
Elongacja	72	30 sek	
Końcowa elongacja	72	7 min	x 1

Otrzymane produkty amplifikacji rozdzielono elektroforetycznie na 2% żelu agarozowym zawierającym 0.01% bromku etydyny w buforze 1×TBE (89 mM Tris-borate, 2.5 mM EDTA). Rozdział będzie prowadzony przy napięciu 120 V przez 4h.

Wyniki

Spośród rekordów uzyskanych dla testowanych markerów wybrano sekwencję XM_020326708.1 pochodzącą z *Aegilops tauschii* subsp. *tauschii*, w obrębie której algorytm megablast oraz blastn zidentyfikowały cztery markery DArT (ryc. 1.). W obrębie początkowej części sekwencji zlokalizowano marker 3045942, w obrębie środkowej części sekwencji zlokalizowano trzy markery (3604723, 4344398 oraz 3610345), które były skupione obok siebie (Rys. 3).

Rys. 3. Markery DArT zlokalizowane przez program BLAST w obrębie sekwencji XM_020326708.1. Kolorem wyróżniono poszczególne markery: 3045942; 4344398; 3604723; 3610345.

```

CTACCAGCCCTCGCCGTGCTCGACCTCAACGATAACAACATCGGCGGCACCATCCCCACGAGCCTCTCGC
GGCTGCGCTCCCTCGCCGCGCTCGACCTCGGCAGCAACTCGTTGAGTGGCTCCATCCC GCCACAGCTCGG
CGACCTCTCCGGCCTCGTTCGACCTCCGCCTCTACAACAACAACCTCACCGGCAGATCCCGCATCAGCTC
AGCAGGCTCCCCAGGATCGCGCACCTCGACCTCGGCTCCAACCTACCTACCAACCAGCAGGACTACCGCA
GGTTCACGCCCATGCCACCGTCACCTTCCTCTCGCTGTACCTGAACTACCTCAACGGCAGTTTCCCGGA
GTTTACCTCAAAAGCGGCAACATCACCTACCTCGACCTGTTCGCAGAACACTCTCTTGACCAATACCG
GACTCGCTGCCGAGAACCTCCCCAACCTCATGTACCTCAACCTGTCCATCAATGCCTTCTCCGGGCGGA
TACCAACGTCGCTGTGCAAGCTGTGCAAGCTCCAGGACCTGCGGGTTAGCAACAACAATCTGACGGGTGG
AATCCCCGAGTTCCTTGGTTCCATGTCCAGCTGAGGGTCTTGAACCTCGGCAGCAACCCGCTCGGCGGA
TCGATCCCGCCAGTTCTCGGCCGGCTCGAAATGCTACAGCGCCTTGACATCATGAACGCCGGGTTGGTTT
CCACTATTCCACCCGAGTTGGGCAATCTTGGAATGTCAATTCCATGGAACCTAGACATGAACCAGCTCAC
CGGTGTCTGCCCGGAGTTGTCCGGGATGCGCCAGATGCGTGAATTTGGCATAACCATCGAACAAACTC
ACCGGTCATATTCCACCGGCTTTATTTACGAGCTGGCCAGAGCTCATATCATTCCAAGTGCA GAACAAC
CGTTTTAGGGAGGATCCACCGGAGCTCGGCAAGGCAGCCAAGCTGAAAATCCTGTATCTCTTCAGCAA
CAATCTTGTCGGCTCTATCCCTGCA GAGCTGGGCAAGCTAGTGAGACTGGAACAGTTGGATTTGTTCGGTC
AACTCTCTCACGGGACCGATCCCCAGCTTGCTCGGGAATCTCAAGCATCTCATGAGGTTGGCGCTCTTCT
TCAACCGGCTCACTGGCATGATCCCCTGAGATCGGCAACATGACGGCATTGCAAGTCTTGACCTCAA

```

CACCAACAGTTTGGGAAGGTGAGCTGCCCCGCCACCATCACATCGCTCAGGAATCTCCAATACCTTGCCCTG
TTTGACAACAACCTTCAATGGTACCATAACCGCCGGACCTCGGGAAGGGGCTGATCTTAACCGATGTGAGTT

Do dalszej analizy wybrano markery 4344398, 3604723 oraz 3610345. W celu przedłużenia ich sekwencji zaprojektowano 3 pary starterów amplifikujące fragmenty sekwencji, w obrębie których zidentyfikowano w/w markery DArT. Zaprojektowane pary starterów podano w tabeli 7.

Tab. 7. Pary starterów użyte do wydłużenia sekwencji markerów DArT (4344398, 3604723, 3610345) zidentyfikowanych w obrębie sekwencji XM_020326708.1.

Lp.	Nazwa	Sekwencja 5'-3'	Wielkość produktu
1.	Dw1aF Dw1aR	AGACATGAACCAGCTCACCG TTGAAGAAGAGCGCCAACCT	372 pz
2.	Dw1bF Dw1bR	TGGGCAATCTTGGCAATGTC CGCCAACCTCATGAGATGCT	395 pz
3.	Dw1cF Dw1cR	TAGACATGAACCAGCTCACCG GTTGAAGAAGAGCGCCAACC	374 pz

Ponieważ przeprowadzone reakcje początkowo nie dały satysfakcjonujących wyników przeprowadzono optymalizację warunków PCR. Do optymalizowanych czynników należały stężenie starterów, stężenie matrycy oraz temperatura annealingu. Po wybraniu optymalnych warunków, przeprowadzono reakcje PCR na DNA wyizolowanym z form rodzicielskich CZR876/01 (niski) oraz CZR891/01 (wysoki). Na żelu agarozowym nie stwierdzono różnic w długości produktów, dlatego amplikony poddano sekwencjonowaniu w celu identyfikacji potencjalnych SNP.

Przeanalizowano w następnej kolejności zestawienia wielosekwencyjne wygenerowane przez program ClustalOmega pochodzące z porównania sekwencji uzyskanych dla form rodzicielskich (niski x wysoki) przy pomocy zaprojektowanych par starterów. Przeprowadzono analizę każdego z otrzymanych zestawień w celu identyfikacji potencjalnych miejsc pozwalających odróżnić formę wysoką od niskiej. Ze szczególnym uwzględnieniem przeanalizowano nukleotydy zdegenerowane (kod IUPAC). Nie znaleziono miejsc jednoznacznie różniących formę niską od wysokiej. Wykryte różnice na początkach analizowanych zestawień uznano za błędy powstałe podczas sekwencjonowania.

W celu ujawnienia potencjalnych błędów sekwencjonowania, które mogłyby maskować SNP odróżniające formę niską od wysokiej zestawiono razem trzy sekwencje wygenerowane dla formy niskiej (rys. 4), trzy sekwencje wygenerowane dla formy wysokiej (rys. 5) oraz wszystkie sześć sekwencji (rys. 6). Pozwoliło to na zidentyfikowanie dwóch potencjalnych SNP w obrębie analizowanych sekwencji.

```

niski_Dw1b      GMS CAGGAWRGKMTGAACAGCTACCGGTGTCTGCCCGGAGTTGTCGGGATGCGC 60
niski_Dw1a      -----GGGCGGCGGGGRGTTGTCGGAATGCGC 28
niski_Dw1c      -----TGGCGGCGGGGRGTTGTCGGAATGCGC 29
                *** * *** *****

niski_Dw1b      CAGATGCGTGAATTTGGCACATCATCGAACAACTACCGGTCAGATCCACCGGCTTTA 120
niski_Dw1a      CAGATGCGTGAATTTGGCAYATCATCGAACAACTACCGGTCAGATYCCACCGGCTTTA 88
niski_Dw1c      CAGATGCGTGAATTTGGCAYATCATCGAACAACTACCGGTCAGATYCCACCGGCTTTA 89
                *****

niski_Dw1b      TTTACGAGCTGGCCAGAGCTCGTATCATTCCAAGTGCAGAACAACCTGTTTTTCAGGGAGG 180
niski_Dw1a      TTTACGAGCTGGCCAGAGCTCRTATCATTCCAAGTGCARAACAACCTGTTTTTCAGGGAGG 148
niski_Dw1c      TTTACGAGCTGGCCAGAGCTCRTATCATTCCAAGTGCARAACAACCTGTTTTTCAGGGAGG 149
                *****

niski_Dw1b      ATCCACCGGAGCTCGGCAAGGCAGCAAGTGAAAACTCTGTATCTTTCAGCAACAAT 240
niski_Dw1a      ATCCACCGGAGCTCGGCAAGGCAGCAAGTGAAAACTCTGTATCTTTCAGCAACAAT 208
niski_Dw1c      ATCCACCGGAGCTCGGCAAGGCAGCAAGTGAAAACTCTGTATCTTTCAGCAACAAT 209
                *****

niski_Dw1b      CTTGTCGGCTCTATCCCTGCAGAGCTGGGCGACCTAGTGAGCCTGAATCACTTGGATTTG 300
niski_Dw1a      CTTGTCGGCTCTATCCCTGCAGAGCTGGGCGACCTRTGTAGCCTGAATCACTTGGATTTG 268
niski_Dw1c      CTTGTCGGCTCTATCCCTGCAGAGCTGGGCGACCTRTGTAGCCTGAATCACTTGGATTTG 269
                *****

niski_Dw1b      TCGGTGAACCTCTCACGGGACCGATCCCAGCTCGTTCCGGAACTCAAGCATCTCATG 360
niski_Dw1a      TCGGTGAACCTCTCACGGGACCGATCCCAGCTCGTTCCGGAACTCAAGCAGCTCCTG 328
niski_Dw1c      TCGGTGAACCTCTCACGGGACCGATCCCAGCTCGTTCCGGAACTCAAGCAGCTCCTG 329
                *****

niski_Dw1b      AGGTTGGCGA----- 370
niski_Dw1a      AGGTTGGCGCTCTTCTTCAAA 349
niski_Dw1c      AGGTTGGCGCTCTTCTTCAAC 350
                *****
                * *

```

Rys. 4 . Zestawienia wielosekwencyjne amplikonów z form niskich wygenerowane w programie Clustal Omega. Gwiazdkami oznaczono dwa potencjalnie zamaskowane SNP.

```

wysoki_Dw1b     GGGCCGMCTGGMTGAGCAGCTACCGGTGTCTGCCCGGAGTTGTCGGGATGCGCC 60
wysoki_Dw1a     -----GGGCTCWCWCGYGCTGTCGGGATGCGCCA 30
wysoki_Dw1c     -----TGGGCTCWCWCGYGCTGTCGGGATGCGCCA 31
                * * * * *

wysoki_Dw1b     AGATGCGTGAATTTGGCACATCATCGAACAACTACCGGTCAGATCCACCGGCTTTAT 120
wysoki_Dw1a     GATGCGTGAGATTTGGCAYATCRTCSAACAACTACCGGTCAGATCCACCGGCTTTRT 90
wysoki_Dw1c     GATGCGTGAGATTTGGCAYATCRTCSAACAACTACCGGTCAGATCCACCGGCTTTRT 91
                *****

wysoki_Dw1b     TTACGAGCTGGCCAGAGCTCGTATCATTCCAAGTGCAGAACAACCTGTTTTTCAGGGAGGA 180
wysoki_Dw1a     TYACGAGCTGGCCAGAGCTCRTATCATTCCAAGTGCARAACAACCTGTTTTTCAGGGAGGA 150
wysoki_Dw1c     TYACGAGCTGGCCAGAGCTCRTATCATTCCAAGTGCARAACAACCTGTTTTTCAGGGAGGA 151
                *****

wysoki_Dw1b     TCCACCGGAGCTCGGCAAGGCAGCAAGTGAAAACTCTGTATCTTTCAGCAACAATC 240
wysoki_Dw1a     TCCACCGGAGCTCGGCAAGGCAGCAAGTGAAAACTCTGTATCTTTCAGCAACAATC 210
wysoki_Dw1c     TCCACCGGAGCTCGGCAAGGCAGCAAGTGAAAACTCTGTATCTTTCAGCAACAATC 211
                *****

wysoki_Dw1b     TTGTCGGCTCTATCCCTGCAGAGCTGGGCGACCTAGTGAGCCTGAATCACTTGGATTTGT 300
wysoki_Dw1a     TTGTCGGCTCTATCCCTGCAGAGCTGGGCGACCTRTGTAGCCTGAATCACTTGGATTTGT 270
wysoki_Dw1c     TTGTCGGCTCTATCCCTGCAGAGCTGGGCGACCTRTGTAGCCTGAATCACTTGGATTTGT 271
                *****

wysoki_Dw1b     CGGTGAACCTCTCACGGGACCGATCCCAGCTCGTTCCGGAACTCAAGCATCTCATGA 360
wysoki_Dw1a     CGGTGAACCTCTCACGGGACCGATCCCAGCTCGTTCCGGAACTCAAGCAGCTCCTGA 330
wysoki_Dw1c     CGGTGAACCTCTCACGGGACCGATCCCAGCTCGTTCCGGAACTCAAGCAGCTCCTGA 331
                *****

wysoki_Dw1b     GGTGGCGA----- 369
wysoki_Dw1a     GGTGGCGCTCTTCTTCAAAA 351
wysoki_Dw1c     GGTGGCGCTCTTCTTCAAC- 351
                *****
                * *

```

Rys. 5. Zestawienia wielosekwencyjne amplikonów z form wysokich wygenerowane w programie Clustal Omega. Gwiazdkami oznaczono dwa potencjalnie zamaskowane SNP.

CLUSTAL O(1.2.4) multiple sequence alignment

```

niski_Dw1b      GMSCAGGAAWRGKMTGAACAGCTCACCGGTGCCTGCCCGCGGAGTTGTCGGGATGCGC   60
wysoki_Dw1b    -GGGCCGCMCTGGMGTGAGCAGCTCACCGGTGCCTGCCCGCGGAGTTGTCGGGATGCGC   59
niski_Dw1a     -----GGGCGCGCGGGGRGTTGTCGGAATGCGCC   29
niski_Dw1c     -----TGGGCGGCGCGGGGRGTTGTCGGAATGCGCC   30
wysoki_Dw1a    -----GGGCCTCCWCCGYGCTGTCGGGATGCGCC   29
wysoki_Dw1c    -----TGGGCCTCCWCCGYGCTGTCGGGATGCGCC   30
                                     * * * * *
niski_Dw1b      CAGATGCGTGAATTTGGCACATCATCGAACAACTCACCGGTGAGATTCCACCGGCTTTA   120
wysoki_Dw1b    CAGATGCGTGAATTTGGCACATCATCGAACAACTCACCGGTGAGATTCCACCGGCTTTA   119
niski_Dw1a     AGATGCG-TGAATTTGGCAYATCATCGAACAACTCACCGGTGAGATYCCACCGGCTTTA   88
niski_Dw1c     AGATGCG-TGAATTTGGCAYATCATCGAACAACTCACCGGTGAGATYCCACCGGCTTTA   89
wysoki_Dw1a    AGATGCGTGAGATTTGGCAYATCRTCSAACAACTCACCGGTGAGATTCCACCGGCTTTR   89
wysoki_Dw1c    AGATGCGTGAGATTTGGCAYATCRTCSAACAACTCACCGGTGAGATTCCACCGGCTTTR   90
                                     ***** ** ** *****

niski_Dw1b      TTTACGAGCTGGCCAGAGCTCGTATCATTCCAAGTGCAGAACAACCTGTTTTCAGGGAGG   180
wysoki_Dw1b    TTTACGAGCTGGCCAGAGCTCGTATCATTCCAAGTGCAGAACAACCTGTTTTCAGGGAGG   179
niski_Dw1a     TTTACGAGCTGGCCAGAGCTCRTATCATTCCAAGTGCARAACAACCTGTTTTCAGGGAGG   148
niski_Dw1c     TTTACGAGCTGGCCAGAGCTCRTATCATTCCAAGTGCARAACAACCTGTTTTCAGGGAGG   149
wysoki_Dw1a    TTYACGAGCTGGCCAGAGCTCRTATCATTCCAAGTGCARAACAACCTGTTTTCAGGGAGG   149
wysoki_Dw1c    TTYACGAGCTGGCCAGAGCTCRTATCATTCCAAGTGCARAACAACCTGTTTTCAGGGAGG   150
                                     ** *****

niski_Dw1b      ATCCACCGGAGCTCGGCAAGGCAGCCAAGCTGAAAATCCTGTATCTCTTCAGCAACAAT   240
wysoki_Dw1b    ATCCACCGGAGCTCGGCAAGGCAGCCAAGCTGAAAATCCTGTATCTCTTCAGCAACAAT   239
niski_Dw1a     ATCCACCGGAGCTCGGCAAGGCAGCCAAGCTGAAAATCCTGTATCTCTTCAGCAACAAT   208
niski_Dw1c     ATCCACCGGAGCTCGGCAAGGCAGCCAAGCTGAAAATCCTGTATCTCTTCAGCAACAAT   209
wysoki_Dw1a    ATCCACCGGAGCTCGGCAAGGCASCCAAGCTGAAAATCCTGTATCTCTTCAGCAACAAT   209
wysoki_Dw1c    ATCCACCGGAGCTCGGCAAGGCASCCAAGCTGAAAATCCTGTATCTCTTCAGCAACAAT   210
                                     *****

niski_Dw1b      CTTGTCGGCTCTATCCCTGCAGAGCTGGGCGACCTAGTGAGCCTGAATCACTTGATTG    300
wysoki_Dw1b    CTTGTCGGCTCTATCCCTGCAGAGCTGGGCGACCTAGTGAGCCTGAATCACTTGATTG    299
niski_Dw1a     CTTGTCGGCTCTATCCCTGCAGAGCTGGGCGACCTRGTGAGCCTGAATCACTTGATTG    268
niski_Dw1c     CTTGTCGGCTCTATCCCTGCAGAGCTGGGCGACCTRGTGAGCCTGAATCACTTGATTG    269
wysoki_Dw1a    CTTGTCGGCTCTATCCCTGCAGAGCTGGGCGACCTRGTGAGCCTGAATCACTTGATTG    269
wysoki_Dw1c    CTTGTCGGCTCTATCCCTGCAGAGCTGGGCGACCTRGTGAGCCTGAATCACTTGATTG    270
                                     *****

niski_Dw1b      TCGGTGAACTCTCTACGGGACCGATCCCCAGCTCGTTCGGGAATCTCAAGCATCTCATG    360
wysoki_Dw1b    TCGGTGAACTCTCTACGGGACCGATCCCCAGCTCGTTCGGGAATCTCAAGCATCTCATG    359
niski_Dw1a     TCGGTGAACTCTCTACGGGACCGATCCCCAGCTCGTTCGGGAATCTCAAGCATCTCTG    328
niski_Dw1c     TCGGTGAACTCTCTACGGGACCGATCCCCAGCTCGTTCGGGAATCTCAAGCATCTCTG    329
wysoki_Dw1a    TCGGTGAACTCTCTACGGGACCGATCCCCAGCTCGTTCGGRAATCTCAAGCATCTCTG    329
wysoki_Dw1c    TCGGTGAACTCTCTACGGGACCGATCCCCAGCTCGTTCGGRAATCTCAAGCATCTCTG    330
                                     *****
                                     * *
niski_Dw1b      AGGTTGGCGA----- 370
wysoki_Dw1b    AGGTTGGCGA----- 369
niski_Dw1a     AGGTTGGCGCTCTTCTTCAAA- 349
niski_Dw1c     AGGTTGGCGCTCTTCTTCAAC- 350
wysoki_Dw1a    AGGTTGGCGCTCTTCTTCAAAA 351
wysoki_Dw1c    AGGTTGGCGCTCTTCTTCAAC- 351
                                     ****

```

Rys. 6. Zestawienia wielosekwencyjne wszystkich uzyskanych amplikonów wygenerowane w programie Clustal Omega. Gwiazdkami oznaczono dwa potencjalnie zamaskowane SNP.

Dodatkowo wykonano zestawienia dla wszystkich sześciu sekwencji, na których umieszczono analizowane markery 4344398, 3604723 oraz 3610345 (rys. 7-9). Otrzymane zestawienia przeanalizowano pod kątem identyfikacji potencjalnych różnic między formą niską a wysoką w okolicach miejsca restrykcyjnego enzymu *Pst*I. Na podstawie analizy uzyskanych wyników zidentyfikowano jeden potencjalny SNP różnicujący formę niską od wysokiej, którego lokalizację w obrębie wszystkich analizowanych sekwencji przedstawia rys. 10.

wysoki_Dw1a	CAGATGCGTGAGATTTGGCAYATCRTCSAACAACTCACCGGTCAGATTCACCGGCTTT	88
wysoki_Dw1c	CAGATGCGTGAGATTTGGCAYATCRTCSAACAACTCACCGGTCAGATTCACCGGCTTT	89
niski_Dw1b	CAGAT - GCGTGAATTTGGCACATCATCGAACAACTCACCGGTCAGATTCACCGGCTTT	119
wysoki_Dw1b	CAGAT - GCGTGAATTTGGCACATCATCGAACAACTCACCGGTCAGATTCACCGGCTTT	118
niski_Dw1a	CAGAT - GCGTGAATTTGGCAYATCATCGAACAACTCACCGGTCAGATYCCACCGGCTTT	87
niski_Dw1c	CAGAT - GCGTGAATTTGGCAYATCATCGAACAACTCACCGGTCAGATYCCACCGGCTTT	88
3604723_rev	-----CGGCTTT	7

wysoki_Dw1a	RTTYACGAGCTGGCCAGAGCTCRTATCATTCCAAGTGCARAACAACCTCGTTTTCAGGGAG	148
wysoki_Dw1c	RTTYACGAGCTGGCCAGAGCTCRTATCATTCCAAGTGCARAACAACCTCGTTTTCAGGGAG	149
niski_Dw1b	ATTTACGAGCTGGCCAGAGCTCGTATCATTCCAAGTGCAGAACAACCTCGTTTTCAGGGAG	179
wysoki_Dw1b	ATTTACGAGCTGGCCAGAGCTCGTATCATTCCAAGTGCAGAACAACCTCGTTTTCAGGGAG	178
niski_Dw1a	ATTTACGAGCTGGCCAGAGCTCRTATCATTCCAAGTGCARAACAACCTCGTTTTCAGGGAG	147
niski_Dw1c	ATTTACGAGCTGGCCAGAGCTCRTATCATTCCAAGTGCARAACAACCTCGTTTTCAGGGAG	148
3604723_rev	ATTCACGAGCTGGCCAGAGCTCATATCATTCCAAGTGCAGAACTGCA-----	46

Rys. 7. Lokalizacja markera 3604723 na zestawieniu wielosekwenyjnym. Podkreśleniem zaznaczono część miejsca restrykcyjnego rozpoznawanego przez enzym *Pst*I. Gwiazdką oznaczono potencjalny SNP różnicujący formę niską od wysokiej.

niski_Dw1a	TTTACGAGCTGGCCAGAGCTCRTATCATTCCAAGTGCARAACAACCTCGTTTTCAGGGAGG	148
niski_Dw1c	TTTACGAGCTGGCCAGAGCTCRTATCATTCCAAGTGCARAACAACCTCGTTTTCAGGGAGG	149
wysoki_Dw1a	TTYACGAGCTGGCCAGAGCTCRTATCATTCCAAGTGCARAACAACCTCGTTTTCAGGGAGG	149
wysoki_Dw1c	TTYACGAGCTGGCCAGAGCTCRTATCATTCCAAGTGCARAACAACCTCGTTTTCAGGGAGG	150
4344398	-----TGAGAACTCGTTTTCTGGAAGG	26
niski_Dw1b	TTTACGAGCTGGCCAGAGCTCGTATCATTCCAAGTGCAGAACAACCTCGTTTTCAGGGAGG	180
wysoki_Dw1b	TTTACGAGCTGGCCAGAGCTCGTATCATTCCAAGTGCAGAACAACCTCGTTTTCAGGGAGG	179

niski_Dw1a	ATCCCACCGGAGCTCGGCAAGGCAGCCAAGCTGAAAATCCTGTATCTCTTCAGCAACAAT	208
niski_Dw1c	ATCCCACCGGAGCTCGGCAAGGCAGCCAAGCTGAAAATCCTGTATCTCTTCAGCAACAAT	209
wysoki_Dw1a	ATCCCACCGGAGCTCGGCAAGGCASCAGCTGAAAATCCTGTATCTCTTCAGCAACAAT	209
wysoki_Dw1c	ATCCCACCGGAGCTCGGCAAGGCASCAGCTGAAAATCCTGTATCTCTTCAGCAACAAT	210
4344398	ATCCCACCG-----	35
niski_Dw1b	ATCCCACCGGAGCTCGGCAAGGCAGCCAAGCTGAAAATCCTGTATCTCTTCAGCAACAAT	240
wysoki_Dw1b	ATCCCACCGGAGCTCGGCAAGGCAGCCAAGCTGAAAATCCTGTATCTCTTCAGCAACAAT	239


Rys. 8 Lokalizacja markera 4344398 na zestawieniu wielosekwenyjnym. Podkreśleniem zaznaczono część miejsca restrykcyjnego rozpoznawanego przez enzym *Pst*I. Gwiazdką oznaczono potencjalny SNP różnicujący formę niską od wysokiej.

niski_Dw1b	ATCCCACCGGAGCTCGGCAAGGCAGCCAAGCTGAAAATCCTGTATCTCTTCAGCAACAAT	240
wysoki_Dw1b	ATCCCACCGGAGCTCGGCAAGGCAGCCAAGCTGAAAATCCTGTATCTCTTCAGCAACAAT	239
wysoki_Dw1a	ATCCCACCGGAGCTCGGCAAGGCASCAGCTGAAAATCCTGTATCTCTTCAGCAACAAT	209
wysoki_Dw1c	ATCCCACCGGAGCTCGGCAAGGCASCAGCTGAAAATCCTGTATCTCTTCAGCAACAAT	210
niski_Dw1a	ATCCCACCGGAGCTCGGCAAGGCAGCCAAGCTGAAAATCCTGTATCTCTTCAGCAACAAT	208
niski_Dw1c	ATCCCACCGGAGCTCGGCAAGGCAGCCAAGCTGAAAATCCTGTATCTCTTCAGCAACAAT	209
3610345_rev	-----CTCGGCAAGGCAACCAAGCTGAAAATCCTGAATCTCTCCGCAACAAC	48

niski_Dw1b	CTTGTCGGCTCTATCCCTGCAGAGCTGGGCGACCTAGTGAGCCTGAATCACTTGGATTTG	300
wysoki_Dw1b	CTTGTCGGCTCTATCCCTGCAGAGCTGGGCGACCTAGTGAGCCTGAATCACTTGGATTTG	299
wysoki_Dw1a	CTTGTCGGCTCTATCCCTGCAGAGCTGGGCGACCTRGTGAGCCTGAATCACTTGGATTTG	269
wysoki_Dw1c	CTTGTCGGCTCTATCCCTGCAGAGCTGGGCGACCTRGTGAGCCTGAATCACTTGGATTTG	270
niski_Dw1a	CTTGTCGGCTCTATCCCTGCAGAGCTGGGCGACCTRGTGAGCCTGAATCACTTGGATTTG	268
niski_Dw1c	CTTGTCGGCTCTATCCCTGCAGAGCTGGGCGACCTRGTGAGCCTGAATCACTTGGATTTG	269
3610345_rev	CTTGTCGGCTCTATCCCTGCA-----	69

Rys. 9. Lokalizacja markera 3610345 na zestawieniu wielosekwenyjnym. Podkreśleniem zaznaczono część miejsca restrykcyjnego rozpoznawanego przez enzym *Pst*I.

CLUSTAL O(1.2.4) multiple sequence alignment

niski_Dw1b	GMSCAGGAAWRGKMTGAACAGCTCACCGGTGTCCTGCCGCCGGAGTTGTCCGGGATGCGC	60
wysoki_Dw1b	-GGGCCGMCTGGMTGAGCAGCTCACCGGTGTCCTGCCGCCGGAGTTGTCCGGGATGCGC	59
niski_Dw1a	-----GGGGCGCGCGGRGTTGTCCGAATGCGCC	29
niski_Dw1c	-----TGGGCGCGCGGRGTTGTCCGAATGCGCC	30
wysoki_Dw1a	-----GGGCCTCCWCCGYGCTGTCCGGATGCGCC	29
wysoki_Dw1c	-----TGGGCCTCCWCCGYGCTGTCCGGATGCGCC	30
	* * * * *	
niski_Dw1b	CAGATGCGTGAATTTGGCACATCATCGAACAACTCACCGGTGAGATTCCACCGGCTTTA	120
wysoki_Dw1b	CAGATGCGTGAATTTGGCACATCATCGAACAACTCACCGGTGAGATTCCACCGGCTTTA	119
niski_Dw1a	AGATGCG - TGAATTTGGCAYATCATCGAACAACTCACCGGTGAGATTCCACCGGCTTTA	88
niski_Dw1c	AGATGCG - TGAATTTGGCAYATCATCGAACAACTCACCGGTGAGATTCCACCGGCTTTA	89
wysoki_Dw1a	AGATGCGTGAATTTGGCAYATCRTCSAACAACTCACCGGTGAGATTCCACCGGCTTTR	89
wysoki_Dw1c	AGATGCGTGAATTTGGCAYATCRTCSAACAACTCACCGGTGAGATTCCACCGGCTTTR	90
	***** ** *	
niski_Dw1b	TTTACGAGCTGGCCAGAGCTCGTATCATTCCAAGTGCAGAACAACCTGTTTTCAGGGAGG	180
wysoki_Dw1b	TTTACGAGCTGGCCAGAGCTCGTATCATTCCAAGTGCAGAACAACCTGTTTTCAGGGAGG	179
niski_Dw1a	TTTACGAGCTGGCCAGAGCTCRTATCATTCCAAGTGCARAACAACCTGTTTTCAGGGAGG	148
niski_Dw1c	TTTACGAGCTGGCCAGAGCTCRTATCATTCCAAGTGCARAACAACCTGTTTTCAGGGAGG	149
wysoki_Dw1a	TTYACGAGCTGGCCAGAGCTCRTATCATTCCAAGTGCARAACAACCTGTTTTCAGGGAGG	149
wysoki_Dw1c	TTYACGAGCTGGCCAGAGCTCRTATCATTCCAAGTGCARAACAACCTGTTTTCAGGGAGG	150
	** *****	
		
niski_Dw1b	ATCCCACCGGAGCTCGGCAAGGCAGCCAAGCTGAAAATCCTGTATCTCTTCAGCAACAAT	240
wysoki_Dw1b	ATCCCACCGGAGCTCGGCAAGGCAGCCAAGCTGAAAATCCTGTATCTCTTCAGCAACAAT	239
niski_Dw1a	ATCCCACCGGAGCTCGGCAAGGCAGCCAAGCTGAAAATCCTGTATCTCTTCAGCAACAAT	208
niski_Dw1c	ATCCCACCGGAGCTCGGCAAGGCAGCCAAGCTGAAAATCCTGTATCTCTTCAGCAACAAT	209
wysoki_Dw1a	ATCCCACCGGAGCTCGGCAAGGCASCCAAGCTGAAAATCCTGTATCTCTTCAGCAACAAT	209
wysoki_Dw1c	ATCCCACCGGAGCTCGGCAAGGCASCCAAGCTGAAAATCCTGTATCTCTTCAGCAACAAT	210

niski_Dw1b	CTTGTCGGCTCTATCCCTGCAGAGCTGGGCGACCTAGTGAGCCTGAATCACTTGGATTTG	300
wysoki_Dw1b	CTTGTCGGCTCTATCCCTGCAGAGCTGGGCGACCTAGTGAGCCTGAATCACTTGGATTTG	299
niski_Dw1a	CTTGTCGGCTCTATCCCTGCAGAGCTGGGCGACCTRGTGAGCCTGAATCACTTGGATTTG	268
niski_Dw1c	CTTGTCGGCTCTATCCCTGCAGAGCTGGGCGACCTRGTGAGCCTGAATCACTTGGATTTG	269
wysoki_Dw1a	CTTGTCGGCTCTATCCCTGCAGAGCTGGGCGACCTRGTGAGCCTGAATCACTTGGATTTG	269
wysoki_Dw1c	CTTGTCGGCTCTATCCCTGCAGAGCTGGGCGACCTRGTGAGCCTGAATCACTTGGATTTG	270

niski_Dw1b	TCGGTGAACCTCTCACGGGACCGATCCCCAGCTCGTTCGGGAATCTCAAGCATCTCATG	360
wysoki_Dw1b	TCGGTGAACCTCTCACGGGACCGATCCCCAGCTCGTTCGGGAATCTCAAGCATCTCATG	359
niski_Dw1a	TCGGTGAACCTCTCACGGGACCGATCCCCAGCTCGTTCGGGAATCTCAAGCAGCTCCTG	328
niski_Dw1c	TCGGTGAACCTCTCACGGGACCGATCCCCAGCTCGTTCGGGAATCTCAAGCAGCTCCTG	329
wysoki_Dw1a	TCGGTGAACCTCTCACGGGACCGATCCCCAGCTCGTTCGGGAATCTCAAGCAGCTCCTG	329
wysoki_Dw1c	TCGGTGAACCTCTCACGGGACCGATCCCCAGCTCGTTCGGGAATCTCAAGCAGCTCCTG	330
	***** ** *	
niski_Dw1b	AGGTTGGCGA----- 370	
wysoki_Dw1b	AGGTTGGCGA----- 369	
niski_Dw1a	AGGTTGGCGCTTCTTCAAA- 349	
niski_Dw1c	AGGTTGGCGCTTCTTCAAC- 350	
wysoki_Dw1a	AGGTKGGCGCTTCTTCAAAA 351	
wysoki_Dw1c	AGGTKGGCGCTTCTTCAAC- 351	
	**** *	

Rys.10 Zestawienie wielosekwyjne z zaznaczonym potencjalnym SNP (wskazanym gwiazdką) różnicującym formę niską od wysokiej.

Wnioski

1. Uzyskane markery DArT sprzężone z cechą znajdują się w obrębie sekwencji oznaczonej *Aegilops tauschii* subsp. *tauschii* receptor-like protein 12 (LOC109767969), transcript variant X2.

- Amplifikacja PCR z wykorzystaniem staretrów specyficznych dla sekwencji markerów sprzężonych z cechą karłowatości nie wykazała różnic w długości produktów.
- Uzyskane SNP różnicujące badane sekwencje mogą wskazywać na potencjalne różnice specyficzne dla analizowanych form różniących się wysokością.

Mierniki dla tematu badawczego 4 (podać w tabeli)

Lp.	miernik ⁵	Wartość miernika podana w opisie	Wartość miernika zrealizowana
1	Liczba markerów poddanych konwersji	3	3

Literatura

- Gruszecka D., Kowalczyk K. 2000. Charakterystyka wybranych cech ilościowych mieszańców pszenżyta (*X Triticosecale* Wittmack) z kozięcami (*Aegilops* sp.). Fol. Univ. Agric. Stetin., Agricultura 82(206): 83-87.
- Kociuba W. 2007. Charakterystyka zasobów genowych pszenżyta (*X Triticosecale* Wittmack) zgromadzonych w latach 1998-2005. Zesz. Probl. Post. Nauk Rol. 517: 369-377.
- Kociuba W., Kramek A., Doliński R. 2007. Porównanie wartości cech użytkowych krajowych odmian pszenżyta ozimego zarejestrowanych w latach 1982-2003. Zesz. Probl. Post. Nauk Rol. 517: 379-387.
- Tikhenko N., Rutten T, Senula A., Rubtsova M., E. R. Keller E. R. J., Borner A. The changes in the reproductive barrier between hexaploid wheat (*Triticum aestivum* L.) and rye (*Secale cereale* L.): different states lead to different fates. *Planta* (2017) 246:377–388
- Mondal S, Rutkowski JE, Velu G, Singh PK, Crespo-Herrera LA, Guzman Bhavani S, Lan C, He X, Sigh RP (2016) Harnessing diversity in wheat to enhance grain yield, climate resilience, disease and insect pest resistance and nutrition through conventional and modern breeding approaches. *Front Plant Sci* 7:991. doi:10.3389/fpls.2016.00991
- Keilsmeier-Cook J., Danilova T.V., Friebe B., Rouse M.N. 2015. Resistance to the Ug99 race group of *Puccinia graminis* f. sp. *tritici* in wheat-intra/intergeneric hybrid derivatives. *Plant Dis.* 99(10): 1317-1325.
- Song J., Niu Z., Li Q., Bao Y., Ma X., Wang H., Kong L., Feng D. 2015. Isolation and identification of differentially expressed genes from wheat in response to *Blumeria graminis* f. sp. *tritici* (Bgt). *Plant Mol. Biol. Rep.* 33(5): 1371-1380.
- Zhao Q.Z., Jiang Q.T., Yang Q., Ma J., Wang J.R., Chen G.Y., Liu Y.X., Lu Z.X., Wei Y.M., Zheng Y.L. 2014. Characterization of intergeneric hybrid between common wheat and *Aegilops sharonensis* (Eig) and transfer of alien high molecular weight glutenin subunits into wheat. *Cereal Res. Commun.* 42(4): 640-647
- Hills M.J., Hall L.M., Messenger D.F., Graf R.J., Beres B.L., Eudes F. 2007. Evaluation of crossability between triticale (*X Triticosecale* Wittmack) and common wheat, durum wheat and rye. *Environ. Biosafety Res.* 6: 249-257.
- Jiang Y., Schmidt R. H., Zhao Y., Reif J.C. 2017. A quantitative genetic framework highlights the role of epistatic effects for grain-yield heterosis in bread wheat. *Nature Genetics* 49, 1741–1746.
- Kumar S., Singh N.K., Kumar R, Kumar Singh, Kumar C., Kumar A. 2017. Heterosis studies for various morphological traits of rice under drought conditions. *Int.J.Curr.Microbiol.App.Sci* (2017) 6(10): 507-521.
- Li G.R., Ji W., Wang G., Zhang J.X., Wang Y.J. 2014. An improved embryo-rescue protocol for hybrid progeny from seedless *Vitis vinifera* grapes × wild Chinese *Vitis* species. *In Vitro Cell Dev Biol Plant.* 50(1): 110–120.
- Zhuang C.L., Adachi T. 1996. Efficient hybridization between *Lycopersicon esculentum* and *L. peruvianum* via 'embryo rescue' and in vitro propagation. *Plant Breeding* 115, 251—256.

⁵ Podać miernik – np. ilość testów, prób, badanych genotypów etc.

14. Kroupin P., Charnook A., Karlov G., Soloviv A., Divashuk M. 2019. Effect of dwarfing gene *Dw1* on hight and agronomic traits in spring triticale in greenhoused and fild experiments in non-blck earth region of Russia. *Plants* (8): 13, 2-12.
15. Braun E.M, Tsvetkova N., Rotter B., Siekman D., Schwfel K., Krezorn N., Plieske J., Winter P., Voylokov A.V., Hackauf B. 2019. Gene expression profiling and fine mapping identifies a gibberelin 2-oxidase gene Co-segretating with the dominant dwarfing gene *Ddw1* in rye (*Secale ceale* L.). *Front. Plant. Sci.* 857.
16. Hackauf B., Ruud S., van der Voort J.R., Miedaner T., Wehling P. 2009. Comparative mapping od DNA sequences in rye (*Secale cereale* L.) in relation to the rice genome. *Theor. Appl. Genet.* 118: 371-384.

5. Informacja nt. prezentacji wyników badań (podać w tabeli - należy wymienić konferencje, na których planuje się zaprezentować wyniki i/lub wymienić publikacje, które zostaną przygotowane i przyjęte do druku w trakcie realizacji zadania w danym roku).

Prezentacja wyników na konferencjach			
lp.	konferencja	Rodzaj prezentacji ⁶	Liczba prezentacji
1	Plant Biotechnology: Green for Good 2019	poster	2
Publikacje w monografiach/czasopismach recenzowanych			
lp.	monografia/czasopismo	Rodzaj publikacji ⁷	Liczba publikacji

Tytuły prezentowanych posterów na Konferencji “Plant Biotechnology: Green for Good V” (wyniki z roku 2018 i 2019).

1. Development of DArT-based PCR markers for marker assisted selection of new dwarfing gene in triticale (x *Triticosecale* Wittmack).
2. Plant height and yield components in backcross interspecific hybrids derivatives from *Aegilops columnaris* x *Triticum aestivum* combination.

Sporządzono:
Lublin, 14.01.2020

Pieczęć jednostki

Osoba reprezentująca jednostkę

Kierownik zadania

data

podpis i pieczęć

podpis

⁶ Podać, czy planowany jest wykład plenarny, doniesienie konferencyjne czy poster.

⁷ Podać, czy planowana jest publikacja oryginalna, czy np. polemika, list do edytora, rozdział w monografii etc.