

SPRAWOZDANIE MERYTORYCZNE**z realizacji zadania na rzecz postępu biologicznego w produkcji roślinnej w 2019 roku****A. INFORMACJE OGÓLNE**

Tytuł zadania Piramidyzacja genów odporności na rdzę koronową w genomie owsa oraz identyfikacja i lokalizacja markerów DNA dla tych genów
Numer zadania (w załączniku nr 8 do rozporządzenia Ministra Rolnictwa i Rozwoju Wsi z dnia 29 lipca 2015 r. w sprawie stawek dotacji przedmiotowych dla różnych podmiotów wykonujących zadania na rzecz rolnictwa (Dz. U. z 14 sierpnia 2015 r. poz. 1170)) 31
Planowany okres realizacji zadania 12 miesięcy
Planowane nakłady w zł 48 240

B. DANE WNIOSKODAWCY

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

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

C. INFORMACJA O WYKONAWCACH

1. Zespół badawczy

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

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)

Edyta Paczos-Grzęda, dr hab.
Uniwersytet Przyrodniczy w Lublinie
Instytut Genetyki, Hodowli i Biotechnologii Roślin
ul. Akademicka 15
20-934 Lublin
tel. bezp. (81) 445-68-66, kom. 504098872, sekretariat (81) 445-68-84
edyta.paczos@up.lublin.pl

osoba do kontaktu w razie nieobecności kierownika zadania:

Sylwia Sowa, dr inż.
Uniwersytet Przyrodniczy w Lublinie
Instytut Genetyki, Hodowli i Biotechnologii Roślin
ul. Akademicka 15
20-934 Lublin
tel. (81) 445-68-84, kom. 509089757
sylwia.sowa@up.lublin.pl

D. OPIS ZADANIA

1. Cele zadania

Lp.	Cel	Czy cel został zrealizowany
1	Określenie patogeniczności izolatów <i>Puccinia coronata</i> zebranych w roku 2018.	TAK
2	Identyfikacja efektywnych w Polsce genów <i>Pc</i> .	TAK
3	Uzyskanie złożonych kombinacji genów odporności na rdzę koronową.	TAK
4	Próba konwersji na markery specyficzne sekwencji DArTseq sprzężonych z obecnością genu <i>Pc60</i> .	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.

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

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. Określenie spectrum patogeniczności izolatów *Puccinia coronata*.

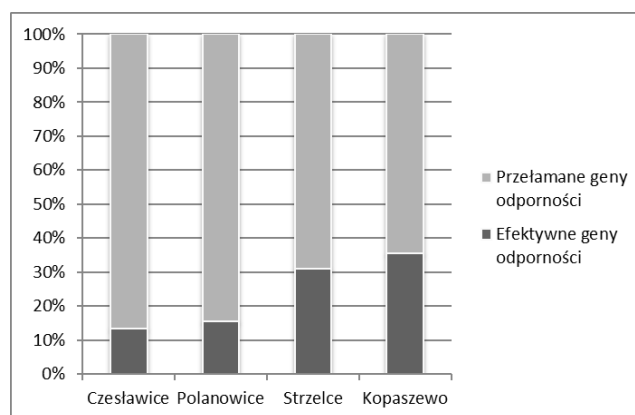
Cel tematu badawczego 1

- * Utrzymanie kolekcji 45 linii referencyjnych dla genów odporności na rdzę koronową owsa.
- * Określenie patogeniczności 40 izolatów *Puccinia coronata* wyprowadzonych z populacji skolekcjonowanych w roku 2018 w Czesławicach, Kopaszewie, Polanowicach i Strzelcach względem 45 linii referencyjnych
- * Ocena porażenia linii referencyjnych posiadających zdefiniowane geny odporności w warunkach naturalnej infekcji polowej.
- * Poszerzanie kolekcji izolatów *Puccinia coronata*.

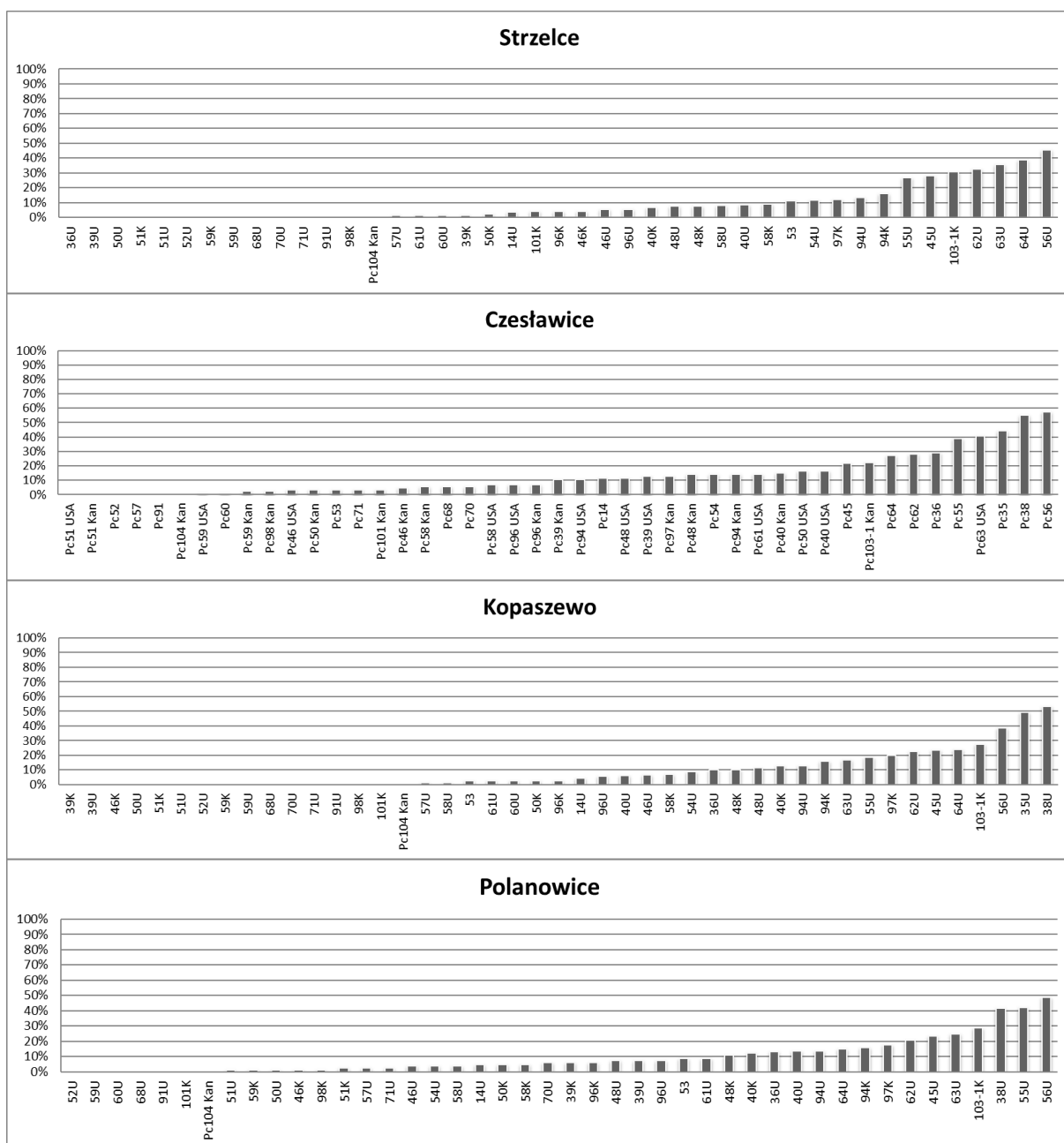
Wyniki

W celu zobrazowania wirulencji populacji rdzy koronowej występującej w 2018 roku na terenie Polski materiał do badań pobierano z miejsc hodowli owsa, gdzie spodziewano się największej presji selekcyjnej na populację patogenu. Wyniki porażenia 45 linii referencyjnych z genami *Pc* w stadium siewki przez izolaty wyprowadzone z populacji zebranych w Czesławicach, Kopaszewie, Polanowicach i Strzelcach przedstawiono za pomocą wartości procentowych (Tab.2). Izolaty wyprowadzone z populacji grzyba zebranych w Kopaszewie wykazały całkowitą awirulencję względem 16 linii z genami *Pc*, populacja *P. coronata* ze Strzelec była awirulentna wobec 14 testowanych linii, natomiast populacja z Polanowic, wobec 7 linii z genami odporności na rdzę koronową. Populacja patogenu zebrana w Czesławicach wykazała się największą zjadliwością i tylko 6 genów *Pc* pozostawało w pełni efektywnych względem izolatów pochodzących z tej miejscowości.

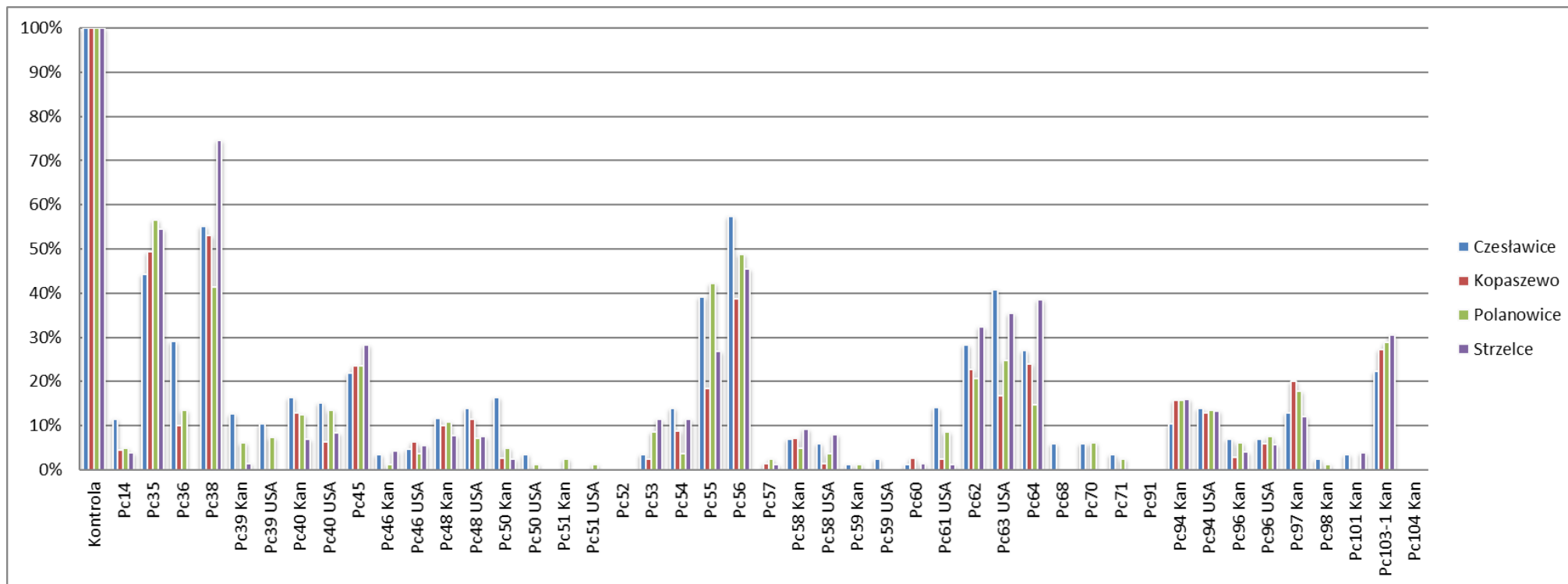
Wśród testowanych 45 linii referencyjnych z genami odporności (*Pc*) w stadium siewki najsilniej porażona była linia *Pc38*, względem której wirulencję wykazało ponad 50% izolatów z Czesławic, Kopaszewa i Strzelec (Wyk.2). Bardzo niskim poziomem odporności wykazały się również linie z genami *Pc35*, *Pc56*, *Pc55*, *Pc63* USA, *Pc103-1* Kan, *Pc64*, *Pc62* oraz *Pc45*. Pełną odpornością w stadium siewki charakteryzowały się linie zawierające geny *Pc52*, *Pc91* oraz *Pc104*, które nie zostały przełamane przez żaden z testowanych izolatów (Wyk. 3). Odporność warunkowaną genami *Pc51* USA, *Pc59* USA, *Pc59* Kan, *Pc51* Kan, *Pc98* Kan, *Pc50* USA, *Pc57* oraz *Pc60* przełamały w niewielkim stopniu jedynie pojedyncze izolaty, ponadto wysokim poziomem odporności wykazały się linie z genami *Pc68*, *Pc71*, *Pc101* Kan, a także *Pc46* Kan.



Wyk. 1. Wirulencja izolatów *P. coronata* wyprowadzonych z populacji w Czesławicach, Polanowicach, Kopaszewie i Strzelcach względem testowanych linii referencyjnych z genami *Pc*



Wyk. 2. Procent porażenia testowanych linii referencyjnych zawierających różne geny odporności na rdzę koronową (*Pc*) izolatami wyprowadzonymi z populacji *P. coronata* w Czesławicach, Kopaszewie, Polanowicach i Strzelcach.



Wyk. 3. Procent porażenia testowanych linii referencyjnych zawierających różne geny odporności na rdzę koronową (*Pc*) izolatami wyprowadzonymi z populacji *P. coronata* w Czesławicach, Kopaszewie, Polanowicach i Strzelcach przedstawiony dla wszystkich lokalizacji razem.

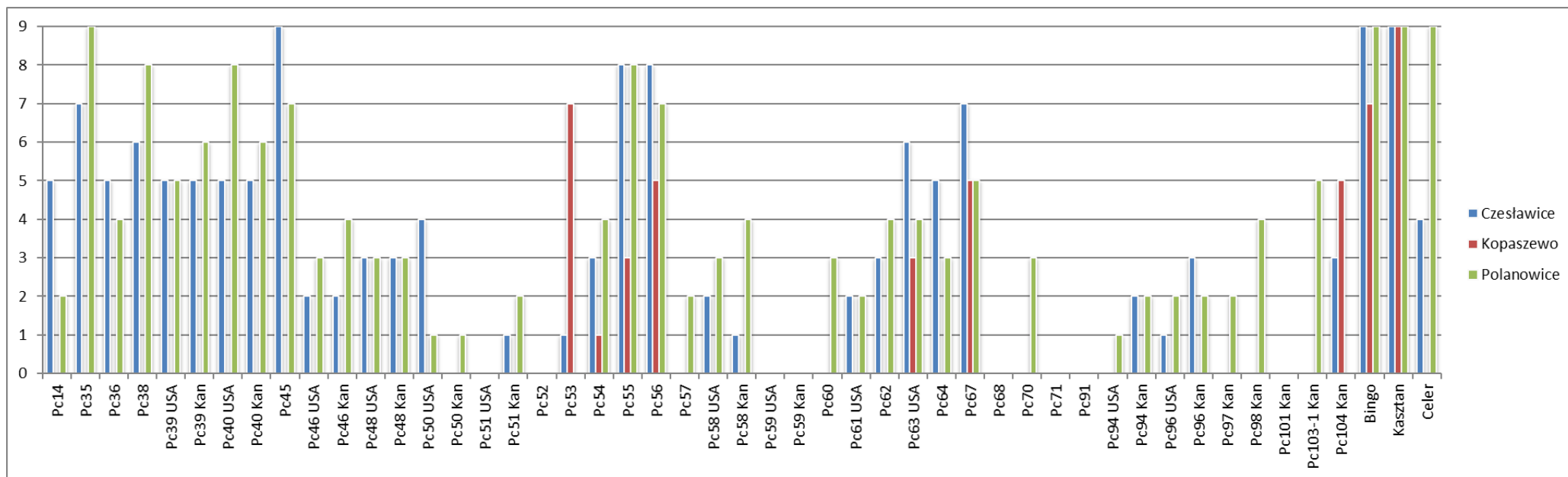
W celu oceny porażenia linii referencyjnych z genami *Pc* w warunkach naturalnej infekcji polowej założono doświadczenia polowe w czterech lokalizacjach: Czesławicach, Strzelcach, Kopaszewie i Polanowicach. Ocenę porażenia przez rdzę koronową w warunkach naturalnej infekcji polowej przeprowadzono dwukrotnie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

W Strzelcach nie zaobserwowano porażenia rdzą koronową linii referencyjnych. Największe porażenie grzybem *P. coronata* na poziomie ok. 72% zaobserwowano w Polanowicach. W Czesławicach poziom wirulencji wynosił 57%. W Kopaszewie natomiast przełamanych zostało zaledwie 6 genów (Tab.4, Wyk.4).



Wyk. 4. Stosunek linii odpornych do porażonych w warunkach naturalnej infekcji polowej w Czesławicach, Kopaszewie i Polanowicach.

Przeprowadzona ocena pozwala uznać za najbardziej efektywne w warunkach naturalnej infekcji polowej, w stadium rośliny dorosłej geny *Pc51* USA, *Pc52*, *Pc59* USA, *Pc59* Kan, *Pc68*, *Pc71*, *Pc91* oraz *Pc101* Kan. W żadnej z lokalizacji nie stwierdzono infekcji linii z tymi genami. Inne, wartościowe w stadium rośliny dorosłej geny to: *Pc50* i *Pc94* oraz *Pc60*, a także *Pc57*, *Pc97* Kan, *Pc51* Kan oraz *Pc96* USA. (Tab.3, Wyk.5)



Wyk. 5. Procent porażenia testowanych linii referencyjnych zawierających różne geny odporności na rdzę koronową (*Pc*) w warunkach naturalnej infekcji polowej w Czesławicach, Kopaszewie i Polanowicach przedstawiony dla wszystkich lokalizacji razem.

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

Mierniki dla tematu badawczego 1

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

3. 2. Ocena segregacji genów odporności

Cel tematu badawczego 2

- * Ocena segregacji genów odporności w populacjach F₃: E983, E630/1, E990 oraz E656 na podstawie testów żywiciel-patogen w warunkach laboratoryjnych.

Materiały i metody

Ziarniaki 4 populacji F₃ uzyskanych w wyniku krzyżowania przeprowadzonego w latach poprzednich: 983, 630/1, 990, 656 poddano rozmnożeniu w warunkach laboratoryjnych w celu uzyskania z każdej z populacji 90 linii (Tab. 5). Z każdej linii F₃ testowi żywiciel-patogen poddano min. 10 roślin w stadium 10-dniowej siewki. Metodyka i ocena testów zgodna z przedstawioną w temacie badawczym 2. Testy odporności zostały wykonane dla 2 izolatów, które charakteryzują się zjadliwością w stosunku do odmiany 'Kasztan', a nie przełamują odporności warunkowanej poszczególnymi genami, dla których w roku poprzednim wykazano profil wirulencji umożliwiającą identyfikację tych genów.

Wyniki

Rośliny pokolenia F₃ czterech populacji mapujących: E983, E630/1, E990 oraz E656 (Tab. 5) poddano ocenie rozszczepeń odporności na rdzę koronową w warunkach laboratoryjnych wykonując test dla 90 linii przy wykorzystaniu dwóch izolatów nie przełamujących odporności warunkowanej odpowiednio przez geny *Pc50K*, *Pc50U*, *Pc59K* oraz *Pc59U*.

Tab. 5. Analizowane populacje mapujące pokolenia F₃.

Populacja mapująca pokolenie F ₃	Kombinacja mieszańcowa	Gen odporności	Izolaty <i>Puccinia coronata</i>
983	Kasztan × <i>Pc50K</i>	<i>Pc50K</i>	51(22), 241
630/1	<i>Pc50U</i> × Kasztan	<i>Pc50U</i>	51(22), 241
990	Kasztan × <i>Pc59K</i>	<i>Pc59K</i>	254,257
656	Kasztan × <i>Pc59U</i>	<i>Pc59U</i>	241,254

Aby stwierdzić, że odporność warunkowana jest obecnością genu głównego o charakterze dominującym, należy zaobserwować stosunek rozszczepień fenotypów w pokoleniu F₃ zbliżony do 1:2:1 (Tab. 6). Rośliny porażone to homozygoty recesywne, zaś odporne to zarówno homozygoty dominujące, jak i heterozygoty. Ocena rozczepień roślin F₃ w warunkach laboratoryjnych, izolatem wywołującym podobną reakcję do reakcji w stadium rośliny dorosłej w warunkach polowych umożliwiłaby identyfikację odpornych homozygot dominujących już na etapie siewki.

Na podstawie oceny porażenia 90 roślin reprezentujących populacje z genami odporności *Pc50K*, *Pc50U*, *Pc59K* i *Pc59U* (Tab.6) stwierdzono, że w trzech spośród badanych populacji oprócz genów głównych występują również allele warunkujące odporność o mniejszym znaczeniu, które modyfikują aktywność genu głównego. W przypadku populacji z genem *Pc50U* profile porażenia były jednakowe dla różnych izolatów, co wskazuje, że możliwe jest identyfikowanie za ich pomocą efektu działania genu głównego. Najbardziej skomplikowany obraz uzyskano dla populacji z genem *Pc59K*. Wydaje się, że w linii tej występują dodatkowe geny mające wpływ na ekspresję genu głównego, zarówno o charakterze dominującym, jak i recesywnym.

Tab. 6 . Ocena stosunku rozszczepień mieszańców pokolenia F₃ w stadium siewki w teście żywiciel - patogen w warunkach laboratoryjnych.

Kombinacja mieszańcowa	Izolat	Liczba testowanych roślin	Liczba homozygot odpornych	Liczba homozygot porażonych	Liczba heterozygot	Wartość χ^2 dla rozszczepienia 1:2:1	p-value
983 Kasztan × <i>Pc50K</i>	51(22)	90	23	24	43	0,270	0,874
	CR241	90	26	22	42	0,591	0,744
630/1 <i>Pc50U</i> × Kasztan	51(22)	90	27	21	42	0,941	0,625
	CR241	90	27	21	42	0,941	0,625
990 Kasztan × <i>Pc59K</i>	CR254	90	27	22	41	1,05	0,591
	CR257	90	22	26	42	0,970	0,615
656 Kasztan × <i>Pc59U</i>	CR241	90	18	26	46	1,836	0,399
	CR254	90	19	25	46	1,127	0,569

Po weryfikacji otrzymanych wyników za pomocą testu χ^2 stwierdzono proporcję rozszczepień: 2 linie heterozygotyczne: 1 linia odporna: 1 linia wrażliwa (Tab. 6). Zastosowane izolaty pozwalają na identyfikację genów głównych *Pc50K*, *Pc50U*, *Pc59K* i *Pc59U* w analizowanych mieszańcach i wytypowanie roślin F₂ do analiz polimorfizmu DNA w celu poszukiwania markerów molekularnych.

Mierniki dla tematu badawczego 2

Lp.	miernik	wartość miernika podana w opisie zadania	wartość miernika zrealizowana
1.	Liczba populacji F ₃ poddanych ocenie rozszczepień.	4	4

3. 3. Piramidyzacja genów.

Cel tematu badawczego 3

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

Wyniki

Przeprowadzono krzyżowania mające na celu uzyskanie mieszańców trójgenowych pomiędzy mieszańcami odmiany Celer z liniami odporności *Pc50K*, *Pc50U*, *Pc59U* (Tab. 7).

Tab.7. Efektywność krzyżowań mieszańców trójgenowych.

Forma mateczna	Forma ojcowska	Liczba wykastrowanych i zapylonych wiech	Liczba wykastrowanych i zapylonych kwiatków	Liczba zawiązanych ziarniaków	Efektywność krzyżowania (%)	Połączone geny
Celer x 50U	Celer x 59U	7	84	4	4,76	39U, 50U, 59U
Celer x 59U	Celer x 50U	8	81	5	6,17	39U, 50U, 59U
Celer x 50U	Celer x 50K	3	31	1	3,23	39U, 50K, 50U
Celer x 50K	Celer x 50U	4	46	3	6,52	39U, 50K, 50U
Suma		22	242	13	-	-
Średnia		5,5	60,5	3,25	5,37	-

W celu uzyskania mieszańców wykastrowano 242 kwiatki w 22 wiechach uzyskując 13 ziarniaków (Tab. 7). Średnia efektywność krzyżowania wyniosła 5,37% wahając się od 3,23% w przypadku kombinacji 'Celer' × *Pc50U* × 'Celer' × *Pc50K* do 6,52% dla krzyżowania zwrotnego. Otrzymano ziarniaki wszystkich zaplanowanych kombinacji mieszańców trójgenowych. Dla genów *Pc39U*, *Pc50U*, *Pc59U* – zawiązało się dziewięć ziarniaków, dla kombinacji *Pc39U*, *Pc50K*, *Pc50U* – cztery.

Komponentami krzyżowania były również trójgenowe kombinacje mieszańcowe F₁ wyprowadzone w roku poprzednim, krzyżowane w celu uzyskania mieszańców czterogenowych (Tab.8). Wykastrowano 275 kwiatków w 24 wiechach otrzymując zaledwie 5 ziarniaków. Średnia efektywność krzyżowania wyniosła 1,92%. Najwyższą efektywność 3,51% osiągnięto dla kombinacji 1006×1004×1001×1004, zaś najniższą 1,23% dla kombinacji 1001×1002×1001×1004. W uzyskanych mieszańcach kumulacji uległy geny *Pc39+Pc52+Pc60+Pc91* oraz *Pc39+Pc52+Pc60+Pc70*.

Mieszańce F₁ reprezentujące 7 kombinacji poddano ocenie fenotypowej (Tab.9.). Wartość poszczególnych cech, w zależności od kombinacji, charakteryzowała się dużą zmiennością. Wstępna ocena odporności mieszańców w warunkach naturalnej infekcji polowej wskazuje, że formy te charakteryzuje odporność w stadium rośliny dorosłej zarówno na rdzę koronową, jak i w mniejszym stopniu na mączniaka prawdziwego. Formy te mogą zostać wykorzystane bezpośrednio jako materiał wyjściowy do hodowli nowych odmian, jak również jako nowe komponenty w hodowli twórczej.

Tab.8. Efektywność krzyżowań mieszańców czterogenowych.

Forma mateczna	Forma ojcowska	Liczba wykastrowanych i zapylonych wiech	Liczba wykastrowanych kwiatków	Liczba zawiązanych ziarniaków	Efektywność krzyżowania (%)	Wprowadzone geny
1001 (Pc52×Celer Pc39) × 1002 (Pc52×NAM2 Pc91)	1001 (Pc52×Celer Pc39) × 1004 (Pc60×Celer Pc39)	7	81	1	1,23	Pc39+Pc52+Pc60+Pc91
1001 (Pc52×Celer Pc39) × 1004 (Pc60×Celer Pc39)	1001 (Pc52×Celer Pc39) × 1002 (Pc52×NAM2 Pc91)	6	75	1	1,33	Pc39+Pc52+Pc60+Pc91
1001 (Pc52×Celer Pc39) × 1004 (Pc60×Celer Pc39)	1006 (Pc70×Celer Pc39) × 1004 (Pc60×Celer Pc39)	6	62	1	1,61	Pc39+Pc52+Pc60+Pc70
1006 (Pc70×Celer Pc39) × 1004 (Pc60×Celer Pc39)	1001 (Pc52×Celer Pc39) × 1004 (Pc60×Celer Pc39)	5	57	2	3,51	Pc39+Pc52+Pc60+Pc70
Suma		24	275	5	-	-
Średnia		6	68,75	1,25	1,92	-

Mierniki dla tematu badawczego 3

Lp.	miernik	wartość miernika podana w opisie zadania	wartość miernika zrealizowana
1.	Liczba nowych kombinacji trójgenowych	2	2
2.	Liczba nowych kombinacji czterogenowych	2	2
3.	Liczba fenotypowanych kombinacji F ₁	7	7

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

Cel tematu badawczego 4

- * Próba konwersji na markery specyficzne sekwencji DArTseq i *silico*DArT sprzężonych z obecnością genu *Pc60*

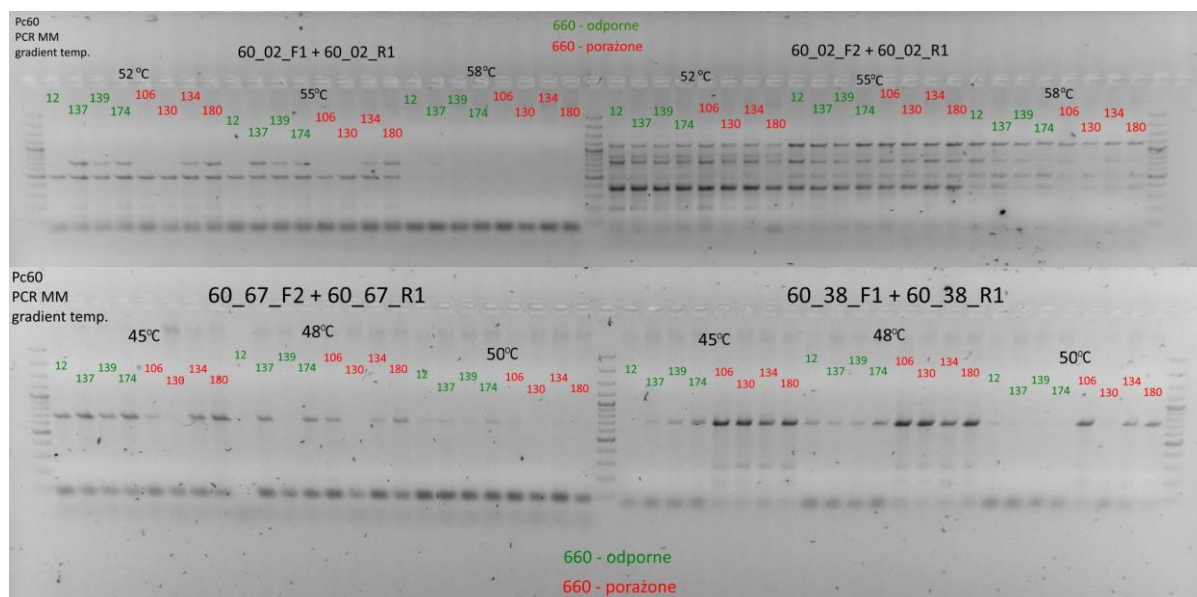
Wyniki

Na podstawie segregacji markerów DArT i DArTseq zidentyfikowano sekwencje sprzężone z obecnością genu odporności *Pc60*. Dla czterech najsilniej sprzężonych sekwencji o właściwej pozycji SNP jak również podobieństwie sekwencji do genów związanych bezpośrednio lub pośrednio z odpornością zaprojektowano startery (Tab. 10) i przeprowadzono reakcje PCR.

Tab. 10. Startery zaprojektowane w oparciu o sekwencje sprzężone z genem *Pc60*.

Nazwa sekwencji DArTseq/silicoDArT	Nazwa startera	Sekwencja 5'3'	Sekwencja nukleotydowa DArTseq/silicoDArT / Wynik BLAST
5445602 F 0-21:C>T-21:C>T	60_02_F1	GCAGCTGCTTCCCGTCCC	TGCAGCAGCTGCTTCCCGTCCcTGTCAGCCAGACCTTCCTCGGGACCGTCTGGACGCCG XM_004960139.2 <i>Setaria italica</i> beta-fructofuranosidase , insoluble isoenzyme 7 (LOC101781847), mRNA
	60_02_F2	GCAGCTGCTTCCCGTCCT	
	60_02_R1	CGTCCAGACGGTCCCGAG	
37041367 F 0-17:T>G-17:T>G	60_67_F1	CTGCAGTATTGGTGCTGAT	TGCAGTATTGGTGCTGAiAAGTCGTTTGGCCGTGACATAGTTGACTCGCACTACAAGGCTT GCCTCTTT KY678612.1 <i>Poa pratensis</i> glutamine synthetase (GS1) mRNA, complete cds
	60_67_F2	CTGCAGTATTGGTGCTGAG	
	60_67_R1	AAAGAGGCAAGCCTTG TAG	
20599760	60_60_F1	TGCAGGACAGGACCAGCGA	TGCAGGACAGGACCAGCGACGCCTACCGCTGGATGCTGCACCACGGGGAGAG GTACCGCGACGCGGACG XM_020340691.1 <i>Aegilops tauschii</i> subsp. <i>tauschii</i> UDP-glycosyltransferase 72B1-like
	60_60_R1	CGCGGTACCTCTCCCGTG	
3278538	60_38_F1	TACTAGCCTGTCACAAGTTC	TGCAGGTACAAC TAGTACTAGCCTGTCACAAGTTCGATCATTGTCATTGTTCCGGAGAGTTA TCATACAC XM_020333758.1 <i>Aegilops tauschii</i> subsp. <i>tauschii</i> putative disease resistance RPP13-like protein 3
	60_38_R1	CTCTCCGAACAATGCAAATG	

Początkowo amplifikację prowadzono w obecności DNA 4 homozygotycznych roślin odpornych i 4 porażonych reprezentujących populację E660 w gradiencie temperatur dobranych zgodnie z temperatura topnienia poszczególnych starterów (Fot. 1).

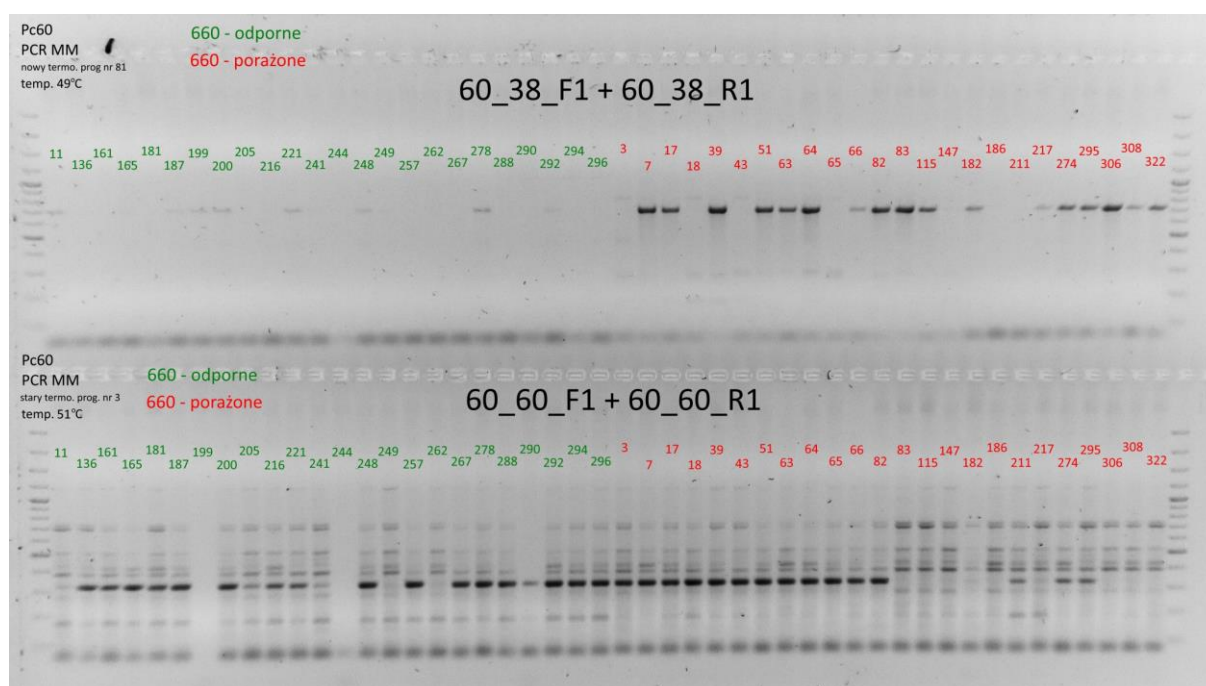


Fot. 1. Przykładowe produkty PCR uzyskane po włączeniu do reakcji zaprojektowanych par starterów charakterystycznych dla genu *Pc60*.

Po przeanalizowaniu elektroforegramów do dalszej analizy na większej ilości próbek (24 odpornych i na 24 porażonych wybrano m.in. pary starterów:

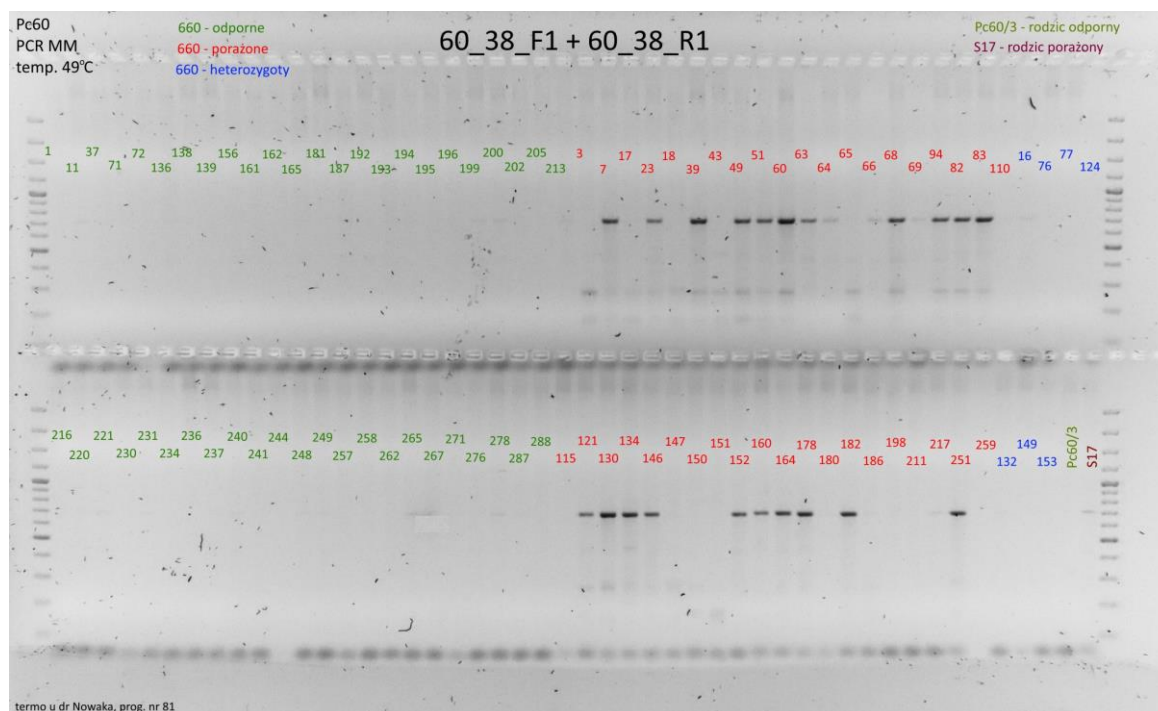
1. 60_38_F1 + 60_38_R1 temp. 49°C
2. 60_60_F1 + 60_60_R1 temp. 51°C

Sz szczególnie zadowalający był wynik uzyskany dla pierwszej pary starterów, która determinowała amplifikacje produktu występującego wyłącznie u form porażonych (Fot. 2). Niestety produkt ten nie był obecny u wszystkich form porażonych.



Fot. 2. Produkty PCR uzyskane po włączeniu do reakcji par starterów: 60_38_F1 + R1 oraz 60_60_F1 + R1.

W kolejnym etapie analiz przeprowadzono reakcje amplifikacji dla wszystkich roślin z populacji E660 (Fot. 3). Niestety, w dalszym ciągu produkt o masie ok. 750 pz był obecny tylko u niektórych porażonych form co wskazuje, że odległość markera od genu *Pc60* jest duża, a marker nie może być wykorzystany w selekcji MAS.



Fot. 3. Produkty PCR uzyskane po włączeniu do reakcji pary starterów 60_38_F1 + R1 dla populacji E660 segregującej pod względem obecności genu *Pc60*.

Mierniki dla tematu badawczego 4

Lp.	miernik	wartość miernika podana w opisie zadania	wartość miernika zrealizowana
1.	Liczba sekwencji DArTseq i <i>silico</i> DArT konwertowanych do warunków specyficznego PCR	4	4