

SPRAWOZDANIE MERYTORYCZNE**z realizacji zadania na rzecz postępu biologicznego w produkcji roślinnej w 2017 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

B. DANE WNIOSKODAWCY

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

**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; Fa×: 81-533-35-49, e-mail: biuro.rektora@up.lublin.pl**

C. INFORMACJA O WYKONAWCACH

1. Zespół badawczy

kierownik zadania		
imię i nazwisko	stopień i tytuł naukowy	miejsce zatrudnienia
Edyta Paczos-Grzęda	dr	Uniwersytet Przyrodniczy w Lublinie Instytut Genetyki, Hodowli i Biotechnologii Roślin
wykonawcy zadania		
imię i nazwisko	stopień i tytuł naukowy	miejsce zatrudnienia
Sylwia Sowa	mgr 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
Krzysztof Kowalczyk	prof. dr hab.	Uniwersytet Przyrodniczy w Lublinie, Instytut Genetyki, Hodowli i Biotechnologii Roślin
Adam Kuzdrałiński	dr inż.	Uniwersytet Przyrodniczy w Lublinie, Katedra Biotechnologii, Żywnienia Człowieka i Towaroznawstwa Żywności
Justyna Leśniowska- Nowak	dr inż.	Uniwersytet Przyrodniczy w Lublinie, Instytut Genetyki, Hodowli i Biotechnologii Roślin
Michał Nowak	dr inż.	Uniwersytet Przyrodniczy w Lublinie, Instytut Genetyki, Hodowli i Biotechnologii Roślin
Sylwia Okoń	dr 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
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, z którą można się kontaktować w razie nieobecności kierownika zadania

Aneta Koroluk, mgr inż.
Uniwersytet Przyrodniczy w Lublinie
Instytut Genetyki, Hodowli i Biotechnologii Roślin
ul. Akademicka 15
20-934 Lublin
tel. (81) 445-68-84, kom. 509089757
aneta.koroluk@up.lublin.pl

D. OPIS ZADANIA

1. Cele zadania

Lp.	Cel (zgodnie ze szczegółowym opisem na dany rok)	Czy cel został zrealizowany (tak/nie /częściowo ¹)
1	Określenie patogeniczności izolatów <i>Puccinia coronata</i> skolekcjonowanych w roku 2016.	TAK
2	Poszukiwanie markerów dla genu odporności <i>Pc60</i> metodą SRAP.	TAK
3	Próba konwersji markerów losowych RAPD i SRAP dla genu <i>Pc39</i> na markery specyficzne.	TAK
4	Identyfikacja i próba konwersji na markery specyficzne sekwencji DArTseq sprzężonych z obecnością genu <i>Pc52</i> .	TAK
5	Genotypowanie populacji E660 z wykorzystaniem całogenomowych analiz polimorfizmu.	TAK

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 2016 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*.

Materialy i metody

Rozmnożeniu w warunkach polowych, z zachowaniem izolacji, poddano 45 linii referencyjnych. W celu określenia patogeniczności 40 izolatów *Puccinia coronata*, wyprowadzonych z populacji skolekcjonowanych w roku 2016 w Czesławicach, Kopaszewie, Polanowicach i Strzelcach względem 45 linii kontrolnych o zdefiniowanych genach odporności na pierwszych liściach 10-dniowych siewek przeprowadzono testy żywiciel-patogen. W celu określenia odporności na rdzę koronową 45 linii referencyjnych o zdefiniowanych genach odporności w warunkach naturalnej infekcji polowej założono metodą bloków losowanych jednopowtórzeniowe eksperymenty polowe w czterech lokalizacjach:

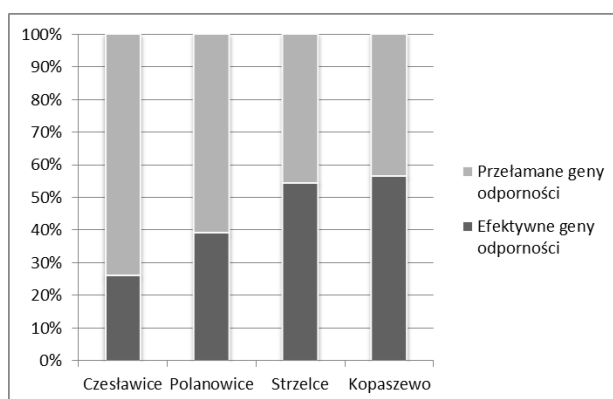
- Gospodarstwie Doświadczalnym UP w Lublinie, w Czesławicach k/Nałęczowa.
- Hodowli Roślin Strzelce Sp. z o.o. w Strzelcach
- DANKO Hodowli Roślin Sp. z o.o. w Kopaszewie
- Małopolskiej Hodowli Roślin Sp. z o.o. w Polanowicach.

Typ infekcji określono poprzez dokonanie wizualnej oceny liści wg skali 0–9 (McNeal i in. 1971), w której 0 oznaczało całkowitą odporność, zaś 9 – silne porażenie.

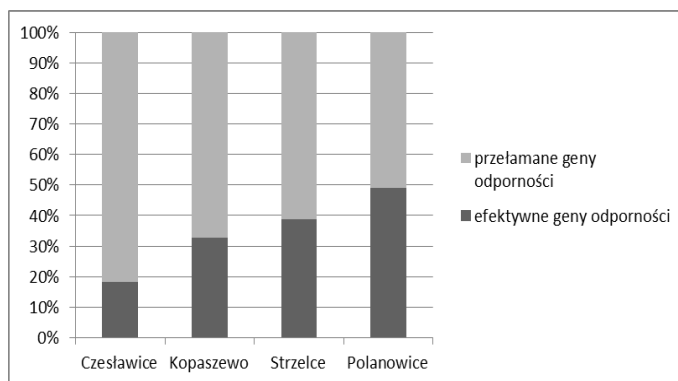
W populacji *Puccinia coronata* zebranych w Czesławicach, Polanowicach, Kopaszewie i Strzelcach wyprowadzono izolaty *Puccinia coronata*. W kolejnym roku badań uzyskane izolaty zostaną ocenione pod względem spektrum patogeniczności.

Wyniki

Izolaty wyprowadzone z populacji grzyba zebranych w Kopaszewie wykazały całkowitą awirulencję względem 26 linii z genami *Pc*, populacja *P. coronata* ze Strzelcec była awirulentna wobec 25 testowanych linii, natomiast populacja z Polanowic, wobec 18 linii z genami odporności na rdzę koronową. Populacja patogenu skolekcjonowana w Czesławicach, wykazała się największą zjadliwością i tylko 12 genów *Pc* pozostawało w pełni efektywnych względem izolatów pochodzących z tej miejscowości (wyk.1).



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



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

Przeprowadzona ocena pozwala uznać za najbardziej zjadliwą w warunkach naturalnej infekcji polowej populację występującą w Czesławicach, zaś najmniej zjadliwą populację z Polanowic.

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 .

3. 2. Ocena segregacji genów odporności

Cel tematu badawczego 2

- * Ocena segregacji genów odporności w 4 populacjach mieszańców F_2 .
- * Ocena segregacji genów odporności w populacji mapującej F_3 E660 ($Pc60 \times$ Kasztan) na podstawie testów żywiciel-patogen w warunkach laboratoryjnych.

Materiały i metody

Ziarniaki 4 populacji mapujących F_2 uzyskanych w wyniku krzyżowania przeprowadzonego w roku 2015:

$Pc14 \times$ Kasztan (840)

$Pc70 \times$ Kasztan (842)

$Pc71 \times$ Kasztan (845)

$Pc101 \times$ Kasztan (851)

poddano rozmnożeniu w warunkach polowych w celu uzyskania 200 roślin pokolenia F_3 każdej z populacji, zaś ocenę rozszczeń odporności na rdzę koronową przeprowadzono w stadium siewki F_2 w warunkach laboratoryjnych na podstawie testu 50 liści z 4 izolatami.

200 linii pokolenia F_3 reprezentujących kombinację mieszańcową E660 $Pc60 \times$ Kasztan przeznaczonych do oceny segregacji genu odporności $Pc60$ wysiano na paletach w fitotronie. Testy odporności wykonano dla 2 izolatów, które charakteryzują się zjadliwością w stosunku do odmiany 'Kasztan', a nie przełamują odporności warunkowanej genem $Pc60$.

Wyniki

Rośliny pokolenia F_2 4 populacji mapujących E840, E842, E845 oraz E851 (Tab. 1) uzyskanych w wyniku krzyżowania przeprowadzonego w roku 2015 poddano próbie oceny rozszczeń odporności na rdzę koronową w warunkach laboratoryjnych wykonując test dla 50 siewek przy wykorzystaniu czterech izolatów nie przełamujących odporności warunkowanej odpowiednio przez geny $Pc14$, $Pc70$, $Pc71$ oraz $Pc101$.

Tab. 1. Analizowane populacje mapujące pokolenia F_2 .

Populacja mapująca pokolenie F_2	Kombinacja mieszańcowa	Gen odporności	Liczba analizowanych roślin
840	$Pc14 \times$ Kasztan	$Pc14$	50
842	$Pc70 \times$ Kasztan	$Pc70$	50
845	$Pc71 \times$ Kasztan	$Pc71$	50
851	$Pc101 \times$ Kasztan	$Pc101$	50

Tab. 2 . Ocena stosunku rozszczepień mieszańców pokolenia F₂.

Kombinacja mieszańcowa	Izolat	Liczba testowanych roślin	Liczba roślin nie porażonych	Liczba roślin porażonych
840 <i>Pc14</i> × Kasztan	15.1	50	41	9
	39U(3)	50	42	8
	13.3/1	50	42	8
	133.1/5	50	46	4
845 <i>Pc71</i> × Kasztan	70U(12)	50	40	10
	15.1	50	37	13
	39U(3)	50	36	14
	101K(35)	50	26	24
842 <i>Pc70</i> × Kasztan	4.2	50	42	8
	48U(28)	50	38	12
	133.1/5	50	43	7
	57U(45)	50	31	19
851 <i>Pc101</i> × Kasztan	94U(63)	50	40	10
	CR 233	50	39	11
	230	50	42	8
	39U(3)	50	46	4

Aby stwierdzić, że odporność warunkowana jest obecnością genu głównego o charakterze dominującym, należy zaobserwować stosunek rozszczepień fenotypów w pokoleniu F₂ zbliżony do 3:1 (Tab. 2). Rozszczepienie zbliżone do 3:1 zaobserwowano w przypadku mieszańca 845 dla izolatów 15.1 i 39U(3), 842 – 48U(28), zaś dla 851 dla izolatów 94U(63) i CR 233.

Ocenie porażenia w stadium siewki w warunkach laboratoryjnych poddano również 200 linii F₃ populacji E660 w celu określenia jednocześnie genotypu i fenotypu analizowanych roślin. Do tego celu wykorzystano izolaty *P. coronata* 241 oraz 257.

Tab. 3. Ocena odporności pokolenia F₃ populacji E660 na 2 wybrane izolaty *P. coronata*
O – homozygoty odporne; P – homozygoty wrażliwe; H – heterozygoty.

Nr rośliny	Izolat <i>P. coronata</i>		Nr rośliny	Izolat <i>P. coronata</i>		Nr rośliny	Izolat <i>P. coronata</i>		Nr rośliny	Izolat <i>P. coronata</i>	
	241	257		241	257		241	257		241	257
1	O	O	51	P	P	101	O	O	151	P	P
2	O	O	52	P	P	102	O	O	152	P	P
3	P	P	53	H	H	103	O	O	153	H	H
4	P	P	54	H	H	104	P	P	154	H	H
5	H	H	55	H	H	105	H	H	155	H	H
6	O	O	56	H	H	106	P	P	156	O	O
7	P	P	57	P	P	107	H	H	157	H	H
8	H	H	58	H	H	108	H	H	158	H	H
9	H	H	59	H	H	109	O	O	159	H	H
10	H	H	60	P	P	110	P	P	160	P	P
11	O	O	61	O	O	111	H	H	161	O	O
12	O	O	62	H	H	112	H	H	162	O	O

Nr rośliny	Izolat <i>P. coronata</i>	
	241	257
13	H	H
14	H	H
15	H	H
16	H	H
17	P	P
18	P	P
19	H	H
20	H	H
21	H	H
22	H	H
23	P	P
24	H	H
25	H	H
26	H	H
27	H	H
28	O	O
29	O	O
30	H	H
31	H	H
32	H	H
33	O	O
34	O	O
35	O	O
36	H	H
37	O	O
38	O	O
39	P	P
40	P	P
41	O	O
42	P	P
43	P	P
44	P	P
45	O	O
46	O	O
47	O	O
48	O	O
49	P	P
50	O	O

Nr rośliny	Izolat <i>P. coronata</i>	
	241	257
63	P	P
64	P	P
65	P	P
66	P	P
67	H	H
68	P	P
69	H	H
70	H	H
71	O	O
72	O	O
73	H	H
74	O	O
75	H	H
76	H	H
77	H	H
78	O	O
79	H	H
80	H	H
81	H	H
82	P	P
83	P	P
84	P	P
85	P	P
86	H	H
87	H	H
88	H	H
89	O	O
90	O	O
91	H	H
92	H	H
93	P	P
94	P	P
95	O	O
96	O	O
97	P	P
98	P	P
99	H	H
100	H	H

Nr rośliny	Izolat <i>P. coronata</i>	
	241	257
113	H	H
114	H	H
115	P	P
116	H	H
117	P	P
118	H	H
119	H	H
120	P	P
121	P	P
122	H	H
123	H	H
124	H	H
125	H	H
126	H	H
127	H	H
128	H	H
129	H	H
130	P	P
131	H	H
132	H	H
133	H	H
134	P	P
135	H	H
136	O	O
137	O	O
138	O	O
139	O	O
140	H	H
141	H	H
142	H	H
143	H	H
144	H	H
145	H	H
146	P	P
147	P	P
148	H	H
149	H	H
150	P	P

Nr rośliny	Izolat <i>P. coronata</i>	
	241	257
163	P	P
164	P	P
165	O	O
166	H	H
167	H	H
168	H	H
169	H	H
170	H	H
171	H	H
172	H	H
173	H	H
174	O	O
175	H	H
176	H	H
177	H	H
178	P	P
179	H	H
180	P	P
181	O	O
182	P	P
183	H	H
184	H	H
185	H	H
186	P	P
187	O	O
188	H	H
189	H	H
190	H	H
191	O	O
192	O	O
193	O	O
194	O	O
195	O	O
196	O	O
197	H	H
198	P	P
199	O	O
200	O	O

Po weryfikacji otrzymanych wyników 3 stwierdzono proporcję rozszczepień: 2 rośliny heterozygotyczne: 1 roślina odporna: 1 roślina porażona (Tab. 3). Zastosowane izolaty pozwalają na identyfikację genu głównego *Pc60* w analizowanych mieszańcach i wytypowanie roślin do analiz polimorfizmu DNA w celu poszukiwania markera molekularnego.

3. 3. Piramidyzacja genów.

Cel tematu badawczego 3

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

Materiały i metody

Krzyżowania prowadzono w celu uzyskania mieszańców dwugenowych pomiędzy odmianą Celer, a roślinami reprezentującymi odmiany lub linie referencyjne z wysoce efektywnymi genami odporności: *Pc51*, *Pc52*, *Pc59*, *Pc60*, *Pc70*. Komponentem krzyżowań było również 5 kombinacji mieszańcowych F₁ uzyskanych w roku poprzednim. Na podstawie liczby wykastrowanych kwiatków oraz liczby zawiązanych ziarniaków określono efektywność krzyżowania.

Ziarniaki F₁ reprezentujące 10 kombinacji mieszańcowych uzyskanych w roku poprzednim wysiano w celu uzyskania pokolenia F₂. Wszystkie rośliny F₁ poddano ocenie fenotypowej. Fenotypowanie roślin F₁ polegało na ocenie podstawowych walorów rolniczych rośliny w warunkach laboratoryjnych. Ocenione zostały: wysokość, liczba pędów produkcyjnych i niedogonów, długość wiechy, liczba kłosek, liczba i masa ziarniaków z wiechy oraz masa ziarniaków z rośliny.

Wyniki

Przeprowadzono krzyżowania mające na celu uzyskanie mieszańców dwugenowych pomiędzy formami ze zdefiniowanymi genami odporności, czyli pomiędzy odmianą Celer, a roślinami reprezentującymi odmiany lub linie referencyjne z wysoce efektywnymi genami odporności: *Pc51*, *Pc52*, *Pc59*, *Pc60*, *Pc70*. Komponentem krzyżowań były również kombinacje mieszańcowe F₁ uzyskane w roku poprzednim.

Tab.4. Opracowanie statystyczne prowadzonych krzyżowań.

Lp.	Forma mateczna	Forma ojcowska	Liczba wiech	Ilość zapylnych kwiatków	Liczba ziarniaków	Efektywność krzyżowania
1.	<i>Pc 52</i>	968 (<i>552 Pc52</i> × <i>310 Pc39</i>)	3	28	14	50,0
2.	<i>Pc 60</i>	Celer <i>Pc39</i>	2	20	6	30,0
3.	<i>Pc 70</i>	Celer <i>Pc 39</i>	6	60	22	36,7
4.	977 (Celer <i>Pc39</i> × <i>Pc59K</i>)	990 (Kasztan × <i>Pc59K</i>)	1	12	1	8,3
5.	<i>Pc 51U</i>	Celer <i>Pc 39</i>	4	46	11	23,9
	Pozostałe	Pozostałe	26	358	0	-
Suma			42	524	54	10,3

W celu uzyskania mieszańców wykastrowano 524 kwiatki w 42 wiechach uzyskując 54 ziarniaki (Tab. 4). Efektywność krzyżowania wyniosła 10,3% wahając się od 8,3% w przypadku kombinacji 977 x 990 do 50% dla kombinacji *Pc52* x 968. Uzyskano od 1 do 22 ziarniaków mieszańcowych z kombinacji. Otrzymano wszystkie zaplanowane kombinacje mieszańcowe zawierające gen *Pc 39* w połączeniu z genami *Pc51*, *Pc52*, *Pc59*, *Pc60*, *Pc70*.

Mieszańce F₁ reprezentujące 10 kombinacji poddano ocenie fenotypowej (Tab.5.). 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.

Tab. 5. Ocena fenotypowa mieszańców reprezentujących 10 kombinacji krzyżówkowych F₁.

L.p.	Nr kombinacji	Kombinacja	Nr rośliny	Wysokość [cm]	Liczba pędów produkcyjnych	Liczba niedogonów	Długość wiechy [cm]	Liczba kłosków	Liczba ziarniaków	Masa ziarniaków [g]	MTZ [g]	Masa reszty ziarniaków z rośliny [g]
1	960	310/822 × 552/114	1	111	4	2	22	55	105	3,93	37,4	13,31
2	963	552/114 × 310/822	1	113	7	1	20	65	156	5,79	37,1	25,75
3	966	552/192 × 310/836	1	72	4	1	17	59	107	4,45	41,6	10,24
3	966	552/192 × 310/836	2	72	2	1	18	64	117	4,81	41,1	-
4	968	552/240 × 310/798	1	71	5	2	19	71	138	4,85	35,1	16,1
4	968	552/240 × 310/798	2	62	3	3	15	37	77	3,05	39,6	2,63
4	968	552/240 × 310/798	3	75	4	5	18	56	124	4,06	32,7	16,8
5	970	552/241 × 310/798	1	70	4	3	20	89	176	7,45	42,3	5,73
6	974	Pc 52 × 310/838	1	69	3	2	18	62	120	4,21	35,1	-
7	975	Pc 71 × 310/818	1	116	4	3	24	86	172	7	40,7	11,42
8	977	Celer × Pc 59K	1	94	8	6	21	33	85	3,91	46	26,15
9	978	Celer × Pc 60	1	110	5	3	23	58	118	4,72	40	18,92
10	979	Celer × Pc 71	1	98	3	1	20	56	99	4,12	41,6	5,52

3. 4. Genotypowanie z wykorzystaniem metody SRAP. Konwersja markerów losowych na specyficzne.

Cel tematu badawczego 4

- * Genotypowanie mieszańców F₂ homozygotycznych pod względem odporności na rdzę koronową w celu identyfikacji potencjalnych markerów dla genu odporności Pc60 z wykorzystaniem metody SRAP.
- * Konwersja markerów losowych RAPD – H11 i SRAP – Me23+Em14 dla genu Pc39 na markery specyficzne.

Materiały i metody

Do analiz wykorzystano DNA, które wyizolowano w ramach tematu 4.5 z 200 roślin F₂ populacji Pc60 × Kasztan. Następnie wyodrębniono homozygoty pod względem odporności wynikającej z obecności genu Pc60. Analizy molekularne przeprowadzono z wykorzystaniem metody SRAP na próbach zbiorczych DNA odpornych i nieodpornych roślin F₂.

Różnicujące fragmenty DNA RAPD i SRAP dla genu Pc39 po rozdziale w 1,5% żelu agarozowym wycięto z żelu i przeprowadzono izolację. Wyizolowane DNA poddano klonowaniu. Tak otrzymaną matrycę do PCR wykorzystano do amplifikacji fragmentu plazmidowego DNA, który zawierał wklonowany fragment przeznaczony do sekwencjonowania. Sekwencjonowanie przeprowadzono w obie strony dla co najmniej 5 sklonowanych matryc RAPD i 5 matryc SRAP. Wyniki sekwencjonowania poddano analizie bioinformatycznej przy użyciu oprogramowania MEGA 6.0. Kolejnym etapem było odszukanie sekwencji homologicznych do sekwencji uzyskanych fragmentów DNA w bazie danych GenBank NCBI (z wykorzystaniem narzędzia BLAST (Basic Local Alignment Search Tool)).

Do uzyskanych sekwencji zaprojektowano startery z wykorzystaniem oprogramowania Primer3. Wykorzystując jako matrycę DNA formy zawierającej *Pc39* (np. Celer) oraz formy porażonej (np. odmiana Kasztan) przeprowadzono reakcje *PCR* w odpowiednio zoptymalizowanych warunkach. Rozdział elektroforetyczny potwierdził obecność pożądaných produktów, więc uzyskany marker zwalidowano na populacji mapującej z genem *Pc39*. W celu walidacji opracowanych markerów SCAR przeprowadzono reakcję amplifikacji.

Wyniki

Spośród 200 testowanych par starterów na podstawie zdjęć rozdziałów elektroforetycznych wyselekcjonowano 22, z udziałem których reakcję powtórzono na losowo wybranym zestawie DNA 5 homozygot odpornych i 5 wrażliwych pokolenia F_2 populacji E660. Po przeprowadzeniu reakcji *PCR* produkty rozdzielono elektroforetycznie i po zweryfikowaniu powtarzalności pojawiających się wzorów prążkowych wybrano 14 par starterów dających powtarzalny produkt i dla nich nastawiono reakcje na matrycach DNA 10 odpornych i 10 wrażliwych osobników populacji E660. Produkty amplifikowane przy użyciu 14 par starterów SRAP pojawiły się u wszystkich przetestowanych form odpornych i heterozygot populacji E660. Reakcja była powtarzalna, a produkt różnicujący stabilny, niezależnie od warunków. Dalsza konwersja markera może umożliwić uzyskanie wysokiej specyficzności amplifikacji potwierdzonej jednoprażkowym obrazem rozdziału produktów reakcji *PCR* na żelu.

W celu konwersji na marker specyficzny dla genu *Pc39* produktu *PCR* uzyskanego z udziałem startera H11, reakcji z tym starterem poddano DNA 2 homozygotycznych genotypów wrażliwych populacji E310 oraz DNA wrażliwej odmiany *A. sativa* „Bingo”. Produkty amplifikacji zostały wyizolowane z żelu, a następnie poddane klonowaniu i sekwencjonowaniu. Sekwencję uzyskanego fragmentu poddano analizie podobieństwa z sekwencjami znajdującymi się w bazie danych GenBank. Wykazała ona, że fragment analizowanej sekwencji DNA podobny jest do niekodującego obszaru sekwencji chromosomu 3B pszenicy zwyczajnej *Triticum aestivum* L. znajdującego się w niewielkiej odległości (291 pz) od obszaru kodującego białko, które w swojej strukturze zawiera domenę konserwatywną z rodziny białek Potato inhibitor I. Na podstawie sekwencji DNA uzyskanego produktu RAPD-*PCR* zaprojektowano pary specyficznych starterów. Wszystkie testowane pary starterów amplifikowały produkt o pożądanym długości, jednak w przypadku 3 par produkt okazał się być monomorficzny. Przeprowadzone reakcje dostarczyły wstępnej informacji o przydatności poszczególnych starterów do identyfikacji genu *Pc39* i umożliwiły wytypowanie pary starterów, amplifikującej najmniejszą ilość produktów niespecyficznych. Dla pary tej do dalszych analiz wybrano optymalną temperaturę annealingu 58°C, w której powielany produkt był najbardziej stabilny. W celu weryfikacji czy potencjalny marker RAPD-SCAR jest sprzężony z genem odporności, przeprowadzono reakcję *PCR* z DNA roślin pokolenia F_2 populacji E310. Pożądany produkt różnicujący uległ amplifikacji w linii STH9210, większości homozygot wrażliwych na porażenie i heterozygot badanej populacji oraz dwóch homozygotach odpornych.

Przeprowadzono również konwersję produktu *PCR* uzyskanego z udziałem starterów SRAP. Chromatogramy potwierdziły czystość wszystkich sklonowanych fragmentów DNA różnicujących badane pule. Porównanie analizowanych sekwencji pozwoliło stwierdzić, że produkty są identyczne, co może świadczyć o ich uniwersalnym charakterze. Na podstawie sekwencji DNA uzyskanego produktu SRAP-*PCR* zaprojektowano pary specyficznych starterów. Przeprowadzone reakcje dostarczyły wstępnej informacji o przydatności poszczególnych starterów do identyfikacji genu *Pc39* i umożliwiły wytypowanie jednej pary starterów, dla której do dalszych analiz wybrano optymalną temperaturę annealingu 50°C, w której amplifikowany produkt był najbardziej stabilny. Pełną sekwencję uzyskanego fragmentu DNA poddano analizie podobieństwa z sekwencjami znajdującymi się w bazie danych GenBank. W celu weryfikacji czy potencjalny marker SRAP-SCAR jest sprzężony z genem odporności, przeprowadzono reakcję *PCR* z DNA roślin pokolenia F_2 populacji E310. Pożądany produkt różnicujący uległ amplifikacji we wszystkich roślinach badanej populacji. W roślinach odpornych i heterozygotach ilość amplifikowanego produktu była większa, niż w przypadku homozygot wrażliwych. Ze względu na to, że zidentyfikowana sekwencja, jest w dużej mierze komplementarna z sekwencjami o charakterze powtarzalnym, powstało wiele produktów

niespecyficznym, a oprócz tego produkt o wielkości ok 950 pz, którego segregacja w znacznie większym stopniu odpowiadała segregacji genu *Pc39*.

3. 5. Genotypowanie populacji mapujących z wykorzystaniem całogenomowych analiz polimorfizmu

Cel tematu badawczego 5

- * Genotypowanie form rodzicielskich i mieszańców F₂ homozygotycznych pod względem odporności na rdzę koronową w celu identyfikacji potencjalnych markerów dla genu odporności *Pc60* z wykorzystaniem całogenomowej analizy polimorfizmu metodą DArTseq
- * Próba konwersji na markery specyficzne sekwencji DArTseq sprzężonych z obecnością genu *Pc52*.

Materiały i metody

Ekstrakcję, a następnie ocenę parametrów fizycznych preparatów DNA przeznaczonych do analiz molekularnych przeprowadzono z form rodzicielskich oraz 200 roślin F₂ populacji *Pc60* × Kasztan. Wykorzystano komercyjne zestawy do izolacji DNA. DNA wyizolowano z młodych liści. Liście pobrano w roku poprzednim w fazie krzewienia i zamrożono w temp. -70°C do czasu izolacji. Czystość i stężenie DNA określono spektrofotometrycznie, a jakość elektroforetycznie. Wszystkie preparaty doprowadzono do stężenia 100 ng/μl i przeznaczono do dalszych analiz.

Analizy DArTseq przeprowadzono dla form rodzicielskich oraz 44 homozygotycznych pod względem genu odporności *Pc60* roślin F₂ populacji *Pc60* × Kasztan.

W oparciu o sekwencje DArT sprzężone z obecnością genu *Pc52* zidentyfikowane w roku poprzednim zaprojektowano startery specyficzne. Analizie poddano 5 markerów. Na podstawie sekwencji markerów zaprojektowano startery do reakcji typu ASA lub STS.

Wyniki

Analizy DArTseq przeprowadzono dla form rodzicielskich oraz 44 homozygotycznych pod względem genu odporności *Pc60* roślin F₂ populacji *Pc60* × Kasztan. Wyniki uzyskano w postaci macierzy binarnych i poddano wstępnej ocenie polimorfizmu. Macierz obejmuje 25 tys. Markerów typu silicoDArT oraz 15 tys. Markerów DArTseq. Potencjalne markery DArTseq i silicoDArT dla genu *Pc60* zostaną zidentyfikowane wśród fragmentów silicoDArT i DArTseq w roku kolejnym.

W oparciu o sekwencje DArTseq sprzężone z obecnością genu *Pc52* zidentyfikowane w roku poprzednim zaprojektowano startery specyficzne. Analizie poddano 5 sekwencji markerowych. Na podstawie sekwencji markerów zaprojektowano startery. Spośród 23 sekwencji, do których znaleziono homologi w bazie GenBank wybrano 5, dla których zaprojektowano 39 starterów. Sekwencje wybrano na podstawie ich podobieństwa do rejonów kodujących geny związane z odpornością roślin na stesy biotyczne. Po otrzymaniu zsintetyzowanych starterów połączono je w 51 kombinacji, aby móc określić, która z nich dostarczy najlepszych wyników. Biorąc pod uwagę temperatury topnienia (T_m) zarówno startera „Forward” jak i „Reverse” w każdej parze poszukiwano optymalnych temperatur annealingu. W tym celu ustalono wstępny zakres temperatur annealingu dla każdej z pary i przeprowadzono reakcję PCR w gradiencie temperatur.

Do poszukiwania optymalnych temperatur annealingu wykorzystano jako matrycę DNA form rodzicielskich, a więc: DNA podatnej na porażenie odmiany ‘Bingo’ oraz DNA odpornej linii *Pc52*.

Przeprowadzono walidację, a więc testowanie potencjalnych markerów na DNA roślin o przeciwstawnych fenotypach. Reakcję PCR przeprowadzono dla wybranych par starterów, w określonych dla nich temperaturach annealingu wykorzystując jako matrycę DNA 3 roślin odpornych i 3 roślin porażonych. Ze względu na otrzymane wyniki wybrano 4 pary, które uczestniczyły w kolejnym etapie analiz. Z ich udziałem przeprowadzono kolejną reakcję PCR na DNA 8 roślin odpornych oraz 6 roślin porażonych. Jedynie w przypadku jednej pary zaobserwowano zróżnicowanie w identyfikacji produktu odpowiadające częściowo segregacji fenotypowej, czyli odporności *Pc52*. Prążek o masie 50pz był obserwowany u wszystkich sześciu roślin porażonych, ale niestety także u 2 z 8 roślin odpornych, co wskazuje, że nie jest to marker idealny.