

SPRAWOZDANIE MERYTORYCZNE**z realizacji zadania na rzecz postępu biologicznego w produkcji roślinnej w 2017 roku****A. INFORMACJE OGÓLNE**

Tytuł zadania – Identyfikacja i lokalizacja markerów DNA dla wybranych genów odporności na mączniaka prawdziwego w owsie zwyczajnym oraz piramidyzacja efektywnych genów odporności w genomie owsa.
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> - 91
Planowany okres realizacji zadania 2017
Planowane nakłady w zł 90 000

B. DANE WNIOSKODAWCY

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

Prorektora 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
Sylwia Okoń	Dr	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

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 Sylwia Okoń

ul. Akademicka 15

20-950 Lublin

tel 81 445 66 25, 510467984

Sekretariat Uczelni – tel. 81 445 66 22

e-mail: sylwia.okon@up.lublin.pl

mgr inż. Tomasz Ociepa – tel 792038343

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	Ocena poziomu efektywności opisanych do tej pory genów odporności na mączniaka prawdziwego w owsie w warunkach naturalnej infekcji polowej	TAK
2	Analiza poziomu wirulencji mączniaka prawdziwego na terenie Polski w 2016 roku	TAK
3	Ocena zróżnicowania genetycznego izolatów mączniaka prawdziwego zebranych na terenie Polski w latach 2010-2016	TAK
4	Ocena segregacji genów odporności w populacjach F ₂ oraz analiza rozszczepień w pokoleniu F ₃ z wykorzystaniem testów żywiciel-patogen	TAK
5	Uzyskanie na drodze krzyżowania roślin, mieszańców owsa zwyczajnego z liniami zawierającymi efektywne geny odporności na mączniaka prawdziwego	TAK
6	Poszukiwanie markerów RAPD i SRAP różnicujących pule roślin odpornych i podatnych w populacjach F ₂ APR122 × Fuchs i Av1860 x Fuchs	TAK
7	poszukiwanie markerów DArTseq różnicujących pule roślin odpornych i podatnych w populacji F ₂ . Av1860 × Fuchs	TAK
8	Weryfikacja losowych markerów RAPD sprzężonych z genem Pm4 odporności na mączniaka prawdziwego	TAK

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

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	Przewidywane koszty realizacji tematu badawczego
1	Analiza efektywności genów odporności na mączniaka prawdziwego w warunkach polowych oraz ocena poziomu wirulencji populacji mączniaka prawdziwego występującego na terenie Polski.	1-12	12 000
2	Ocena segregacji genów odporności w populacjach F ₂ oraz analiza rozszczepień w pokoleniu F ₃ z wykorzystaniem testów żywiciel-patogen	1-12	18 000
3	Piramidyzacja i wprowadzanie do genomu owsa efektywnych genów odporności przeciwko mączniakowi prawdziwemu na drodze krzyżowania roślin	6-9	16 000
4	Genotypowanie form rodzicielskich i mieszańców F ₂ homozygotycznych pod względem odporności na mączniaka prawdziwego z wykorzystaniem technik RAPD, ISSR i SRAP.	1-12	19 000
5	Genotypowanie populacji z wykorzystaniem całogenomowych analiz typu DArTseq	1-12	22 000
6	Konwersja markerów lososwych na markery specyficzne	10-12	3 000
RAZEM			90 000

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 populacji mączniaka prawdziwego występującego na terenie Polski

Cel tematu badawczego 1

Celem zadania 1 była ocena poziomu efektywności opisanych do tej pory genów odporności na mączniaka prawdziwego w owsie w warunkach polowych. W 2017 roku oceniono również poziom wirulencji populacji mączniaka prawdziwego owsa na terenie kraju w 2016 roku. Ponadto w ramach zadania 1 przeprowadzona została ocena poziomu zróżnicowania genetycznego kolekcji izolatów mączniaka prawdziwego pochodzących z różnych części Polski

Materiały i metody

Przedmiotem badań w zakresie analizy efektywności genów odporności na mączniaka prawdziwego w warunkach polowych były odmiany i linie owsa posiadające opisane do tej pory geny odporności na mączniaka prawdziwego: Jumbo – *Pm1*, Mostyn – *Pm3*, Av1860-*Pm4*, Bruno- *Pm6*, APR122 – *Pm7* oraz odmiana Fuchs nieposiadająca genów odporności na mączniaka prawdziwego. Do oceny włączono również odmianę Canyon, która posiada 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 - Małopolska Hodowla Roślin, Czesławice koło Nałęczowa – Gospodarstwo Doświadczalne Uniwersytetu Przyrodniczego w Lublinie.

Formy kontrolne wysiane zostały na poletkach 2-rzędowych o długości 1 m (powierzchnia 0,2m²), w siewie gęstym, rzutowym (ok. 200 ziarniaków na m²). Rozstawa rzędów wynosiła 20cm.

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

Przedmiotem badań w zakresie analizy wirulencji populacji mączniaka prawdziwego owsa były jednoczarodnikowe izolaty mączniaka prawdziwego zebrane w 2016 roku 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.

Izolaty mączniaka prawdziwego zostały przetestowane na zestawie linii i odmian kontrolnych z wykorzystaniem testów żywiciel-patogen. Fragmenty liści 10-dniowych siewek genotypów kontrolnych (Jumbo – *Pm1*, Mostyn – *Pm3*, Av1860- *Pm4*, Am27 – *Pm5*, Bruno- *Pm6* i APR122 – *Pm7* oraz odmiany wrażliwej Fuchs) wyłożone zostały na szalki Petriego wypełnione do połowy pożywką agarową z dodatkiem beznymidazolu (6g agaru na 1l wody i 35 mg/l benzimidazolu). Dodatkowo do analiz włączono odmianę Canyon posiadającą niescharakteryzowane do tej pory źródło odporności na mączniaka prawdziwego. Szalki z fragmentami liści poddano inokulacji zarodnikami poszczególnych izolatów mączniaka prawdziwego. Po inokulacji szalki zostały umieszczone 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.

Zastosowana została skala 5-stopniowa, 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 20%-50% 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 był klasyfikowany 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 zostały przeprowadzone z oparciem o program HaGiS Tool (Herrmann i in. 1999).

Ocena zróżnicowania genetycznego kolekcji izolatów mączniaka prawdziwego pochodzących z różnych części kraju została przeprowadzona w oparciu o metodę RAPD. Zarodniki poszczególnych izolatów pobrano do probówek typu Eppendorf i zamrożono. DNA wyizolowano zgodnie z metodą Iqbal i in (2013) partą o CTAB. Wyizolowany DNA oceniono spektrofotometrycznie, odpowiednio rozcieńczono i poddano amplifikacji ze starterami RAPD. Do analiz wybrano 50 starterów. Reakcje amplifikacji przeprowadzono zgodnie z metodyką opisaną przez Williams i in (1990) z modyfikacjami. Skład mieszaniny reakcyjnej o objętości 10µl był następujący: 1 x Silver Taq PCR MIX LOAD, 5,3 pM startera, 60 ng genomowego DNA. 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. Żele podświetlano na transiluminatorze i fotografowano z wykorzystaniem systemu dokumentacji żeli Poly Doc.

W analizie polimorfizmu obecność lub brak prążka traktowano jako pojedynczą cechę i przypisywano jej odpowiednio wartość 1 lub 0. Podobieństwo genetyczne (SI – *similarity index*) pomiędzy parami wszystkich badanych form oszacowano zgodnie z formułą Dice'a (Nei i Li, 1979). W oparciu o matrycę SI wykonano analizę skupień metodą średnich połączeń UPGMA (*unweighted pair group method with arithmetic average*) stosując program PAST (Hammerr i in. 2001)

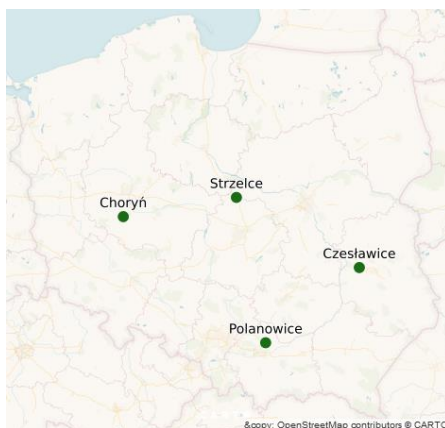
Wyniki

W 2017 roku objawy mączniaka prawdziwego obserwowano we wszystkich 4 lokalizacjach, w których prowadzono doświadczenia polowe. Jednakże nasilenie objawów było tak niewielkie że uniemożliwiło prawidłową ocenę analizowanych linii kontrolnych. Najsilniejsze objawy porażenia mączniakiem prawdziwym obserwowano na terenie Polski wschodniej, w lokalizacji „Czesławice” (woj. lubelskie). Najbardziej porażona była odmiana Fuchs, która nie posiada żadnych genów odporności na mączniaka prawdziwego. Porażenie obserwowano również na liściach odmian Bruno z genem *Pm6* i Jumbo z genem *Pm1*. Odmiana Mostyn, z genem *Pm3* była porażona w niewielkim stopniu, co może świadczyć o tym, że gen *Pm3* nadal utrzymuje umiarkowaną odporność na mączniaka prawdziwego w stadium rośliny dorosłej. 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 (Tab. 1). W lokalizacjach „Kopaszewo”, „Strzelce” i „Polanowice” obserwowano jedynie pojedyncze kolonie mączniaka prawdziwego co uniemożliwiło prawidłową ocenę analizowanych genotypów.

Tabela 1. Odporność linii i odmian kontrolnych w warunkach naturalnej infekcji polowej w 2017 roku

Lokalizacja	Jumbo (Pm1)	Bruno (Pm6)	Mostyn (Pm3)	Av1860 (Pm4)	APR122 (Pm7)	Fuchs	Canyon
Kopaszewo	9	8	9	9	8	9	8
Strzelce	9	9	9	9	9	9	9
Polanowice	9	9	9	9	9	9	9
Czesławice	5	5	7	9	9	5	9

Populacje mączniaka prawdziwego wykorzystane do oceny wirulencji patogenu skolekcjonowano w 2016 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).

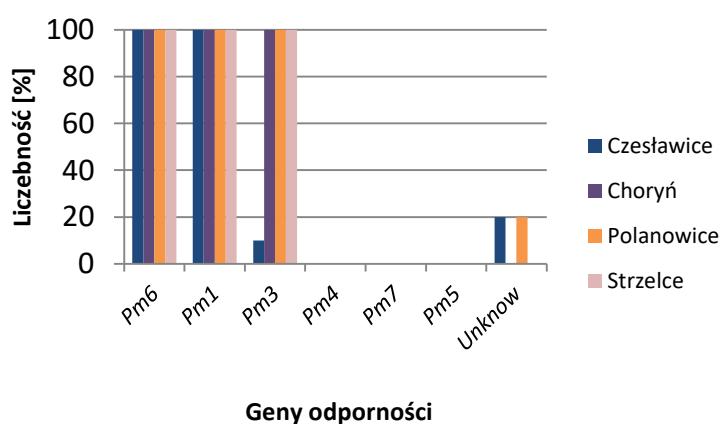


Rys.1. Lokalizacje kolekcjonowania mączniaka prawdziwego w 2016 roku

Na podstawie testów żywiciel-patogen przeprowadzonych na zestawie linii i odmian kontrolnych wyliczono frekwencje wirulencji analizowanych izolatów mączniaka prawdziwego. Testowane izolaty mączniaka prawdziwego całkowicie przełamały odporność warunkowaną genami *Pm1* i *Pm6*. Frekwencja wirulencji wobec tych genów wynosiła 100%. Gen *Pm3* utrzymał zadowalający poziom odporności wobec izolatów skolekcjonowanych w lokalizacji Czesławice, frekwencja wirulencji wynosiła 10%. Izolaty skolekcjonowane w pozostałych lokalizacjach całkowicie przełamały odporność warunkowaną tym genem. Żaden z izolatów pozyskanych w 2016 roku nie przełamał odporności warunkowanej genami *Pm4*, *Pm5* i *Pm7*. Dodatkowo w 2016 roku określono poziom wirulencji izolatów mączniaka prawdziwego wobec źródła odporności zidentyfikowanego w odmianie Canyon. Odporność odmiany Canyon została przełamana przez 20% izolatów skolekcjonowanych w lokalizacjach Czesławice i Polanowice. Izolaty z zachodniej i środkowej części kraju nie były w stanie przełamać odporności zidentyfikowanej w odmianie Canyon (Tab. 2., Rys. 2).

Tabela 2. Frekwencja wirulencji izolatów mączniaka prawdziwego skolekcjonowanych w Polsce w 2016 roku.

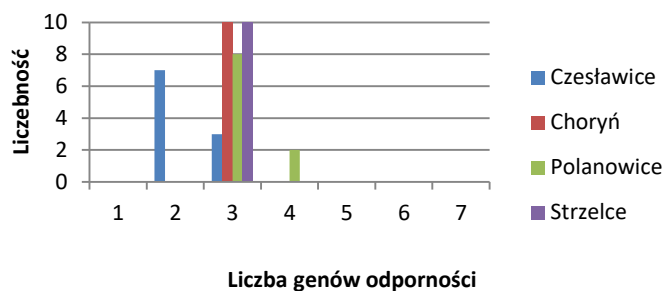
Lokalizacja	Geny odporności						
	<i>Pm6</i>	<i>Pm1</i>	<i>Pm3</i>	<i>Pm4</i>	<i>Pm7</i>	<i>Pm5</i>	Canyon
Czesławice	100	100	10	0	0	0	20
Choryń	100	100	100	0	0	0	0
Polanowice	100	100	100	0	0	0	20
Strzelce	100	100	100	0	0	0	0



Rys.2. graficzne przedstawienie wirulencji mączniaka prawdziwego w 2016 roku

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

Skolekcjonowane w 2016 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 (Rys. 3).



Rys.3. kompleksowość wirulencji mączniaka prawdziwego w 2016 roku w poszczególnych lokalizacji

Na podstawie modelu porażenia poszczególnych linii kontrolnych przez badane izolaty mączniaka prawdziwego określono patotypy tych izolatów za pomocą kodu Glimour (Tab.3.) Najliczniej występującym patotypem był patotyp 700, który reprezentowany był przez 72,5% analizowanych izolatów mączniaka prawdziwego. W poszczególnych lokalizacjach zidentyfikowano od 1 (Choryń i Strzelce) do 3 (Czesławice) patotypów mączniaka prawdziwego (Tab 4.). 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.3. klasyfikacja patotypów wg. Glimour dla wszystkich lokalizacji

Odrębny patotyp	Liczebność	Frekwencja [%]
300	7	17,5
301	2	5
700	29	72,5
701	2	5

Tab. 4. Różnorodność patotypów mączniaka prawdziwego w 2016 w poszczególnych lokalizacjach

Parametr	Czesławice	Choryń	Polanowice	Strzelce
Ilość izolatów	10	10	10	10
Liczba różnych patotypów	3	1	2	1
Patotypy z oceną >1	2	1	2	1
Diversity: Simple	0,30	0,10	0,20	0,10
Diversity: Gleason	0,87	0,00	0,43	0,00
Diversity: Shannon	0,80	0,00	0,50	0,00

Do oceny zróżnicowania genetycznego kolekcji izolatów mączniaka prawdziwego wybrano 18 izolatów skolekcjonowanych na terenie polski w latach 2010-2016 (Tab.5.). Ocenę przeprowadzono w oparciu o zestaw 50 losowo wybranych starterów RAPD (Tab. 6.)

Tabela 5. 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 6. Charakterystyka starterów RAPD wybranych do oceny zróżnicowania genetycznego izolatów mączniaka prawdziwego.

Lp	starter	Liczba produktów			Frekwencja prążków polimorficznych (%)
		całkowita	polimorficznych	monomorficznych	
1	C01	9	4	5	44%
2	D20	7	3	4	43%
3	E01	7	3	4	43%
4	G18	5	2	3	40%
5	J13	8	1	7	13%
6	L19	9	3	6	33%
7	L20	8	3	5	38%
8	M13	11	8	3	73%
9	M15	10	3	7	30%
10	N15	8	1	7	13%
11	N20	12	9	3	75%
12	T12	10	4	6	40%
13	U600	17	9	8	53%
14	H13	11	5	6	45%
15	R14	8	3	5	38%
16	S05	9	4	5	44%
17	Q16	6	4	2	67%
Suma		155	69	86	45%
Średnio/starter		9,11	4,05	5,05	
Średnio/genotyp		8,61	3,83	4,77	

W pierwszym kroku analiz przeprowadzono screening starterów RAPD, wybrano te, które inicjowały amplifikację produktów na matrycy DNA mączniaka prawdziwego. Do dalszych analiz wybrano 24 startery, wśród których 17 inicjowało amplifikacje produktów polimorficznych w obrębie analizowanych izolatów mączniaka prawdziwego. Łącznie w

reakcji z 17 starterami RAPD uzyskano 155 produktów, z których jedynie 45% (69 produktów) było polimorficznych. Na pojedynczy starter przypadało średnio 4,05 polimorficznych produktów, zaś na izolat 3,83. Pojedynczy starter inicjował amplifikację od 1 (J13, N15) do 9 (N20, U600) polimorficznych produktów.

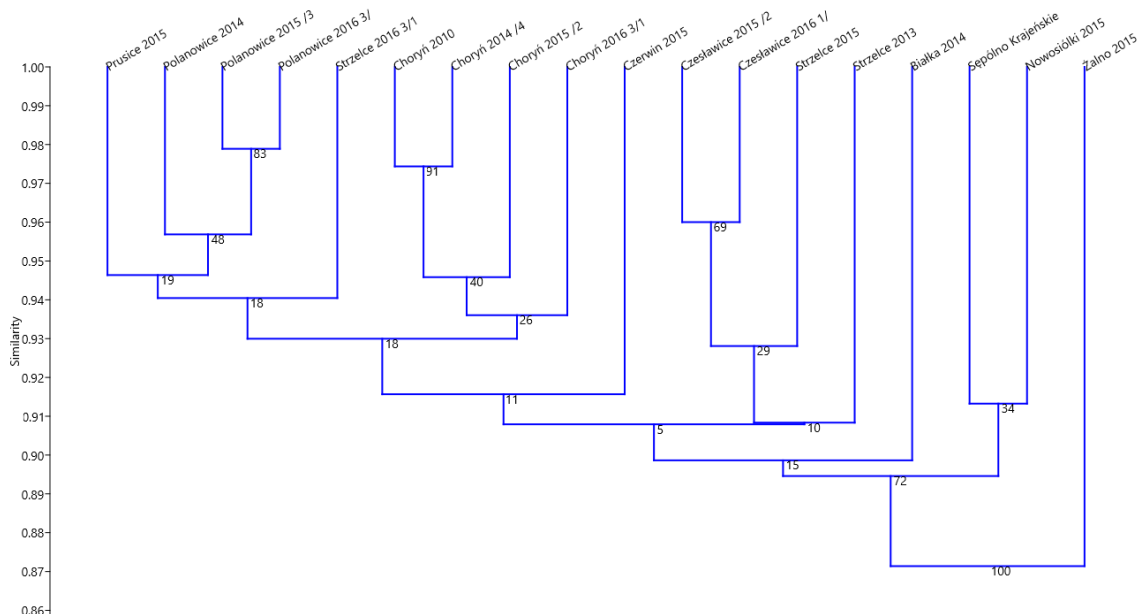
Wyniki badań polimorfizmu markerów RAPD izolatów mączniaka prawdziwego stanowiły podstawę do utworzenia matrycy indeksów podobieństwa genetycznego Dice'a (Tab. 7). Analizowane izolaty mączniaka prawdziwego charakteryzowały się wysokim podobieństwem genetycznym. Wartość indeksów podobieństwa wahała się od 0.834 do 0.979 a średnio wynosiła 0,909. Największe podobieństwo do wszystkich pozostałych izolatów wykazały izolaty pozyskane z Polanowic w 2015 i 2016 roku, najmniejsze zaś izolat pozyskany w lokalizacji Żalno w 2015 roku.

W oparciu o matrycę SI wykonano analizę skupień metodą UPGMA (Rys. 4). Na uzyskanym dendrogramie izolaty skolekcjonowane w lokalizacji Choryń w latach 2010, 2014, 2015 i 2016 uległy wspólnej klasteryzacji, wskazuje to na duże podobieństwo izolatów pozyskanych z terenów Polski zachodniej. Wspólnej klasteryzacji uległy również izolaty skolekcjonowane w lokalizacji Polanowice w latach 2014, 2015 i 2016, oraz izolaty z lokalizacji Czesławice pozyskane w latach 2015 i 2017. Najbardziej różnorodnie były izolaty pozyskane z lokalizacji Strzelce pozysane w latach 2013, 2015 i 2016. Izolaty te ułożyły się w różnych grupach skupień. Na obrzeżach dendrogramu ułożył się izolat skolekcjonowany w lokalizacji Żalno w 2015 roku. Jego lokalizacja na dendrogramie potwierdza że jest on najbardziej odmienny od pozostałych izolatów.

Tabela 7. Matryca indeksów podobieństwa analizowanych izolatów mączniaka prawdziwego określonych na podstawie polimorfizmu markerów RAPD

	Białka 2014	Sępólno Krajeńskie	Żalno 2015	Prusice 2015	Nowosiółki 2015	Czerwin 2015	Choryń 2010	Choryń 2014 /4	Choryń 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
Białka 2014		0,894	0,867	0,893	0,877	0,911	0,912	0,903	0,893	0,909	0,876	0,889	0,895	0,866	0,895	0,919	0,903	0,917
Sępólno Krajeńskie	0,894		0,839	0,867	0,913	0,869	0,906	0,896	0,877	0,876	0,894	0,890	0,869	0,913	0,879	0,861	0,887	0,876
Żalno 2015	0,867	0,839		0,875	0,858	0,868	0,895	0,885	0,868	0,858	0,883	0,879	0,834	0,847	0,911	0,877	0,885	0,883
Prusice 2015	0,893	0,867	0,875		0,919	0,928	0,937	0,945	0,934	0,934	0,927	0,949	0,911	0,893	0,946	0,927	0,954	0,959
Nowosiółki 2015	0,877	0,913	0,858	0,919		0,913	0,922	0,922	0,895	0,894	0,920	0,925	0,887	0,894	0,905	0,887	0,922	0,902
Czerwin 2015	0,911	0,869	0,868	0,928	0,913		0,906	0,914	0,904	0,920	0,904	0,908	0,897	0,868	0,897	0,921	0,931	0,920
Choryń 2010	0,912	0,906	0,895	0,937	0,922	0,906		0,974	0,946	0,937	0,922	0,935	0,889	0,905	0,932	0,914	0,923	0,937
Choryń 2014 /4	0,903	0,896	0,885	0,945	0,922	0,914	0,974		0,946	0,928	0,912	0,926	0,914	0,904	0,940	0,929	0,931	0,945
Choryń 2015 /2	0,893	0,877	0,868	0,934	0,895	0,904	0,946	0,946		0,943	0,902	0,898	0,904	0,894	0,921	0,919	0,921	0,934
Choryń 2016 3/1	0,909	0,876	0,858	0,934	0,894	0,920	0,937	0,928	0,943		0,901	0,932	0,903	0,884	0,921	0,911	0,928	0,942
Czesławice 2015 /2	0,876	0,894	0,883	0,927	0,920	0,904	0,922	0,912	0,902	0,901		0,960	0,904	0,930	0,913	0,878	0,912	0,901
Czesławice 2016 1/2	0,889	0,890	0,879	0,949	0,925	0,908	0,935	0,926	0,898	0,932	0,960		0,908	0,926	0,935	0,891	0,934	0,932
Strzelce 2013	0,895	0,869	0,834	0,911	0,887	0,897	0,889	0,914	0,904	0,903	0,904	0,908		0,913	0,889	0,929	0,922	0,911
Strzelce 2015	0,866	0,913	0,847	0,893	0,894	0,868	0,905	0,904	0,894	0,884	0,930	0,926	0,913		0,896	0,877	0,913	0,902

Strzelce 2016 3/1	0,895	0,879	0,911	0,946	0,905	0,897	0,932	0,940	0,921	0,921	0,913	0,935	0,889	0,896		0,922	0,949	0,946
Polanowice 2014	0,919	0,861	0,877	0,927	0,887	0,921	0,914	0,929	0,919	0,911	0,878	0,891	0,929	0,877	0,922		0,954	0,959
Polanowice 2015 /3	0,903	0,887	0,885	0,954	0,922	0,931	0,923	0,931	0,921	0,928	0,912	0,934	0,922	0,913	0,949	0,954		0,979
Polanowice 2016 3/1	0,917	0,876	0,883	0,959	0,902	0,920	0,937	0,945	0,934	0,942	0,901	0,932	0,911	0,902	0,946	0,959	0,979	
średnie podobieństwo do pozostałych	0,895	0,883	0,871	0,923	0,903	0,905	0,923	0,924	0,912	0,913	0,908	0,919	0,899	0,896	0,917	0,910	0,926	0,926



Rys.4. Dendrogram izolatów mączniaka prawdziwego. uzyskany metodą UPGMA w oparciu o markery RAPD

Mierniki dla tematu badawczego 1 (podać w tabeli)

Lp.	Miernik ²	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	30	40*
3	Liczba starterów RAPD użyta do analizy zróżnicowania genetycznego mączniaka prawdziwego	50	50

*Większa wartość miernika wynika z faktu, że izolaty mączniaka pobrano z 4 a nie jak zakładano z 3 lokalizacji, większa liczba lokalizacji pozwoli na wydzielenie bardziej wartościowych wniosków dotyczących zmienności mączniaka prawdziwego owsa w Polsce

3.2 Temat badawczy 2: Ocena segregacji genów odporności w populacjach F₂ oraz analiza rozszczepień w pokoleniu F₃ z wykorzystaniem testów żywiciel-patogen

Cel tematu badawczego 2

Celem zadania 2 było przeprowadzenie testów żywiciel-patogen w populacjach F₂ i ocena segregacji pod względem odporności na mączniaka prawdziwego w populacjach Canyon x Fuchs i Canyon x Sam

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

Materiały i metody

Przedmiotem badań realizowanych w 2017 roku były populacje F₂ uzyskane w wyniku krzyżowania odmiany Canyon zawierającej niescharakteryzowane do tej pory źródło odporności na mączniaka prawdziwego z wrażliwymi odmianami Fuchs i Sam. Z każdej populacji F₂ przetestowanych zostało po 300 osobników.

Do testów żywiciel-patogen wybrano 3 izolaty mączniaka prawdziwego charakteryzujące się awirulencją dla odmiany Canyon.

Ziarniaki populacji F₂ wysiano pojedynczo do pojemników z ziemią ogrodniczą i umieszczono w fitotronie. Po 10 dniach fragmenty liści analizowanych form wyłożono na 12-sto dołkowe płytki wypełnione do połowy agarą z dodatkiem benzimidazolu (6g agaru na 1l wody i 35 mg/l benzimidazolu). Płytki z fragmentami liści poddano 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 genotypów przez wybrane izolaty mączniaka prawdziwego. Do oceny porażenia 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 20% - 50% powierzchni liścia, 4 – obfita grzybnia zajmująca ponad 50% powierzchni liścia. Na podstawie uzyskanych wyników oceniono segregację odporności na mączniaka prawdziwego w poszczególnych populacjach. W celu potwierdzenia zgodności otrzymanych w testach odporności rozszczepień w segregujących pokoleniach F₂ badanych populacji, zastosowano test zgodności χ^2 .

Osobniki populacji F₂ analizowane w testach żywiciel-patogen wysadzono na poletka doświadczalne Uniwersytetu Przyrodniczego w Lublinie zlokalizowane w Czesławicach koło Nałęczowa. Rośliny wysadzono co 10 cm na 1 metrowych poletkach w rozstawie rzędów 20 cm. Po zakończeniu okresu wegetacji z każdej rośliny F₂ zebrano ziarniaki F₃. Ziarniaki te wykorzystano do oceny homozygotyczności osobników pokolenia F₂ z wykorzystaniem testów żywiciel-patogen. Do testów wysiano po 20 ziarniaków F₃ reprezentujących osobnika pokolenia F₂. Testy żywiciel-patogen przeprowadzono w oparciu o wybrane wcześniej izolaty mączniaka prawdziwego. Na podstawie uzyskanych wyników wyselekcjonowano osobniki homozygotyczne (odporne i wrażliwe) pod względem odporności na mączniaka prawdziwego.

Wyniki

Populacje Canyon x Fuchs i Canyon x Sam testowano w oparciu o 3 izolaty awirulentne dla źródła odporności zidentyfikowanego w odmianie Canyon: Białka 2014, Kopaszewo 2015 (1), Strzelce 2016 (4). Wyniki testów przedstawiono w Tabeli 8. Rośliny, których reakcja na patogen była oceniona jako 3 i 4 klasyfikowano jako wrażliwe, rośliny ocenione jako 0 klasyfikowano jako w pełni odporne, 1 i 2 klasyfikowano jak odpowiedź umiarkowaną i zaliczano te rośliny do odpornych.

W pokoleniu F₂ mieszańców Canyon x Fuchs, Canyon x Sam, uzyskano segregację roślin na odporne i podatne na porażenie przez wybrane izolaty mączniaka prawdziwego (Tab. 9, Rys. 5). Po weryfikacji otrzymanych wyników za pomocą testu χ^2 we wszystkich analizowanych populacjach stwierdzono proporcję rozszczepień pasującą do modelu 3 rośliny odporne: 1 roślina wrażliwa.

Tabela 8. Wyniki testów żywiciel-patogen przeprowadzone na populacjach F₂

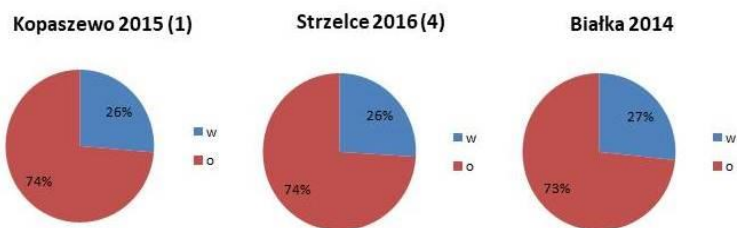
roślina F3	Canyon x Fuchs												Canyon x Sam																		
	Białka 2014	Kopaszewo 2015 (1)	Strzelce 2016 (4)	roślina F3	Białka 2014	Kopaszewo 2015 (1)	Strzelce 2016 (4)	roślina F3	Białka 2014	Kopaszewo 2015 (1)	Strzelce 2016 (4)	roślina F3	Białka 2014	Kopaszewo 2015 (1)	Strzelce 2016 (4)	roślina F3	Białka 2014	Kopaszewo 2015 (1)	Strzelce 2016 (4)	roślina F3	Białka 2014	Kopaszewo 2015 (1)	Strzelce 2016 (4)								
1	4	4	4	76	4	4	4	151	0	0	0	226	0	0	0	1	0	0	0	76	4	4	4	151	0	0	0	226	4	4	4
2	0	0	0	77	0	0	0	152	4	4	4	227	0	0	0	2	4	3	3	77	4	4	4	152	4	4	4	227	4	4	4
3	4	3	4	78	0	0	0	153	0	0	0	228	4	4	4	3	1	0	0	78	0	0	0	153	0	0	0	228	0	0	0
4	3	4	4	79	0	0	0	154	0	0	0	229	4	4	4	4	3	3	3	79	0	0	0	154	0	0	0	229	4	4	4
5	4	3	2	80	0	0	0	155	0	0	0	230	0	0	0	5	4	3	4	80	0	0	0	155	0	0	0	230	0	0	0
6	0	0	0	81	4	4	4	156	4	4	4	231	0	0	0	6	4	3	4	81	0	0	0	156	4	4	4	231	0	0	0
7	0	0	0	82	0	0	0	157	4	4	4	232	0	0	0	7	0	0	0	82	4	4	4	157	4	4	4	232	0	0	0
8	0	1	0	83	0	0	0	158	4	4	4	233	0	0	0	8	1	0	0	83	4	4	4	158	4	4	4	233	0	0	0
9	1	0	2	84	0	0	0	159	0	0	0	234	4	4	4	9	0	0	0	84	4	4	4	159	0	0	0	234	4	4	4
10	4	4	4	85	0	0	0	160	0	0	0	235	4	4	4	10	0	0	0	85	4	4	4	160	0	0	0	235	4	4	4
11	0	0	0	86	4	4	4	161	0	0	0	236	4	4	4	11	4	3	4	86	0	0	0	161	0	0	0	236	4	4	4
12	4	3	3	87	4	4	4	162	0	0	0	237	4	4	4	12	3	4	4	87	0	0	0	162	0	0	0	237	4	4	4
13	1	0	0	88	0	0	0	163	4	4	4	238	0	0	0	13	4	3	2	88	0	0	0	163	4	4	4	238	0	0	0
14	3	3	3	89	0	0	0	164	4	4	4	239	0	0	0	14	0	0	0	89	0	0	0	164	4	4	4	239	0	0	0
15	4	3	4	90	0	0	0	165	4	4	4	240	0	0	0	15	0	0	0	90	0	0	0	165	4	4	4	240	0	0	0
16	4	3	4	91	0	0	0	166	0	0	0	241	0	0	0	16	0	0	0	91	0	0	0	166	0	0	0	241	0	0	0
17	0	0	0	92	4	4	4	167	0	0	0	242	0	0	0	17	0	0	0	92	4	4	4	167	0	0	0	242	0	0	0
18	1	0	0	93	4	4	4	168	0	0	0	243	0	0	0	18	0	0	0	93	4	4	4	168	0	0	0	243	0	0	0
19	0	0	0	94	4	4	4	169	0	0	0	244	4	4	4	19	0	0	0	94	4	4	4	169	0	0	0	244	4	4	4
20	0	0	0	95	4	4	4	170	0	0	0	245	4	4	4	20	0	0	0	95	4	4	4	170	0	0	0	245	4	4	4
21	4	3	4	96	0	0	0	171	0	0	0	246	4	4	4	21	4	4	4	96	0	0	0	171	0	0	0	246	4	4	4
22	3	4	4	97	0	0	0	172	0	0	0	247	4	4	4	22	2	3	2	97	0	0	0	172	0	0	0	247	4	4	4
23	4	3	2	98	0	0	0	173	4	4	4	248	0	0	0	23	4	4	4	98	0	0	0	173	0	0	0	248	0	0	0
24	0	0	0	99	0	0	0	174	0	0	0	249	0	0	0	24	3	3	2	99	0	0	0	174	0	0	0	249	0	0	0
25	0	0	0	100	0	0	0	175	4	4	4	250	0	0	0	25	1	1	0	100	0	0	0	175	4	4	4	250	0	0	0
26	0	0	0	101	0	0	0	176	0	0	0	251	0	0	0	26	4	4	3	101	0	0	0	176	0	0	0	251	4	4	4
27	0	0	0	102	4	4	4	177	0	0	0	252	0	0	0	27	0	0	1	102	0	0	0	177	4	4	4	252	0	0	0
28	0	0	0	103	4	4	4	178	0	0	0	253	0	0	0	28	0	0	0	103	4	4	4	178	4	4	4	253	4	4	4
29	0	0	0	104	4	4	4	179	0	0	0	254	0	0	0	29	0	0	0	104	0	0	0	179	4	4	4	254	4	4	4

30	0	0	0	105	4	4	4	180	0	0	0	255	4	4	4	30	0	0	0	105	0	0	0	180	0	0	0	255	4	4	4
31	4	4	4	106	0	0	0	181	0	0	0	256	0	0	0	31	0	0	0	106	0	0	0	181	0	0	0	256	0	0	0
32	2	3	2	107	0	0	0	182	0	0	0	257	0	0	0	32	4	4	4	107	0	0	0	182	0	0	0	257	0	0	0
33	4	4	4	108	0	0	0	183	0	0	0	258	0	0	0	33	0	0	0	108	0	0	0	183	0	0	0	258	0	0	0
34	3	3	2	109	0	0	0	184	4	4	4	259	0	0	0	34	0	0	0	109	0	0	0	184	0	0	0	259	0	0	0
35	1	1	0	110	0	0	0	185	0	0	0	260	0	0	0	35	0	0	0	110	0	0	0	185	0	0	0	260	0	0	0
36	4	4	3	111	0	0	0	186	0	0	0	261	0	0	0	36	0	0	0	111	0	0	0	186	0	0	0	261	0	0	0
37	0	0	1	112	0	0	0	187	0	0	0	262	0	0	0	37	0	0	0	112	0	0	0	187	0	0	0	262	0	0	0
38	0	0	0	113	4	4	4	188	0	0	0	263	0	0	0	38	0	0	0	113	4	4	4	188	0	0	0	263	0	0	0
39	0	0	0	114	0	0	0	189	0	0	0	264	0	0	0	39	0	0	0	114	4	4	4	189	4	4	4	264	0	0	0
40	0	0	0	115	0	0	0	190	0	0	0	265	4	4	4	40	0	0	0	115	0	0	0	190	4	4	4	265	4	4	4
41	0	0	0	116	0	0	0	191	0	0	0	266	4	4	4	41	0	0	0	116	0	0	0	191	0	0	0	266	4	4	4
42	4	4	4	117	0	0	0	192	0	0	0	267	4	4	4	42	4	3	4	117	4	4	4	192	0	0	0	267	0	0	0
43	0	0	0	118	0	0	0	193	0	0	0	268	4	4	4	43	4	4	4	118	0	0	0	193	0	0	0	268	4	4	4
44	0	0	0	119	0	0	0	194	4	4	4	269	4	4	4	44	0	0	0	119	0	0	0	194	4	4	4	269	4	4	4
45	0	0	0	120	0	0	0	195	4	4	4	270	0	0	0	45	4	3	4	120	0	0	0	195	4	4	4	270	0	0	0
46	0	0	0	121	0	0	0	196	0	0	0	271	0	0	0	46	4	4	4	121	4	4	4	196	0	0	0	271	0	0	0
47	0	0	0	122	0	0	0	197	4	4	4	272	0	0	0	47	0	0	0	122	0	0	0	197	4	4	4	272	0	0	0
48	0	0	0	123	4	4	4	198	4	4	4	273	4	4	4	48	0	0	0	123	4	4	4	198	4	4	4	273	4	4	4
49	0	0	0	124	4	4	4	199	0	0	0	274	4	4	4	49	0	0	0	124	0	0	0	199	0	0	0	274	4	4	4
50	0	0	0	125	0	0	0	200	0	0	0	275	4	4	4	50	4	4	4	125	4	4	4	200	0	0	0	275	4	4	4
51	0	0	0	126	0	0	0	201	0	0	0	276	0	0	0	51	0	0	0	126	0	0	0	201	0	0	0	276	0	0	0
52	4	3	4	127	4	4	4	202	4	4	4	277	4	4	4	52	4	4	4	127	4	4	4	202	4	4	4	277	4	4	4
53	4	4	4	128	0	0	0	203	0	0	0	278	0	0	0	53	0	0	0	128	0	0	0	203	0	0	0	278	0	0	0
54	0	0	0	129	0	0	0	204	4	4	4	279	4	4	4	54	4	4	4	129	4	4	4	204	4	4	4	279	4	4	4
55	4	3	4	130	0	0	0	205	0	0	0	280	0	0	0	55	0	0	0	130	0	0	0	205	0	0	0	280	0	0	0
56	4	4	4	131	4	4	4	206	4	4	4	281	4	4	4	56	4	4	4	131	0	0	0	206	4	4	4	281	4	4	4
57	0	0	0	132	0	0	0	207	0	0	0	282	0	0	0	57	0	0	0	132	4	4	4	207	0	0	0	282	0	0	0
58	0	0	0	133	4	4	4	208	4	4	4	283	0	0	0	58	4	4	4	133	4	4	4	208	4	4	4	283	0	0	0
59	0	0	0	134	0	0	0	209	0	0	0	284	4	4	4	59	0	0	0	134	0	0	0	209	0	0	0	284	4	4	4
60	4	4	4	135	4	4	4	210	4	4	4	285	0	0	0	60	0	0	0	135	4	4	4	210	0	0	0	285	0	0	0
61	0	0	0	136	0	0	0	211	0	0	0	286	4	4	4	61	0	0	0	136	4	4	4	211	0	0	0	286	4	4	4
62	4	4	4	137	4	4	4	212	0	0	0	287	4	4	4	62	0	0	0	137	4	4	4	212	4	4	4	287	4	4	4
63	0	0	0	138	0	0	0	213	0	0	0	288	4	4	4	63	0	0	0	138	0	0	0	213	0	0	0	288	4	4	4
64	4	4	4	139	4	4	4	214	0	0	0	289	0	0	0	64	4	4	4	139	0	0	0	214	4	4	4	289	0	0	0
65	0	0	0	140	0	0	0	215	0	0	0	290	0	0	0	65	4	4	4	140	0	0	0	215	4	4	4	290	0	0	0
66	4	4	4	141	0	0	0	216	4	4	4	291	0	0	0	66	4	4	4	141	4	4	4	216	4	4	4	291	0	0	0
67	0	0	0	142	4	4	4	217	4	4	4	292	0	0	0	67	0	0	0	142	0	0	0	217	0	0	0	292	0	0	0
68	4	4	4	143	4	4	4	218	4	4	4	293	0	0	0	68	0	0	0	143	4	4	4	218	0	0	0	293	0	0	0
69	0	0	0	144	0	0	0	219	0	0	0	294	0	0	0	69	0	0	0	144	0	0	0	219	0	0	0	294	0	0	0
70	0	0	0	145	4	4	4	220	0	0	0	295	0	0	0	70	0	0	0	145	4	4	4	220	0	0	0	295	0	0	0
71	0	0	0	146	4	4	4	221	0	0	0	296	0	0	0	71	4	4	4	146	0	0	0	221	0	0	0	296	0	0	0
72	0	0	0	147	4	4	4	222	0	0	0	297	0	0	0	72	0	0	0	147	0	0	0	222	0	0	0	297	0	0	0
73	0	0	0	148	0	0	0	223	0	0	0	298	4	4	4	73	0	0	0	148	4	4	4	223	0	0	0	298	4	4	4
74	4	4	4	149	0	0	0	224	0	0	0	299	4	4	4	74	0	0	0	149	0	0	0	224	0	0	0	299	4	4	4
75	4	4	4	150	0	0	0	225	0	0	0	300	0	0	0	75	0	0	0	150	4	4	4	225	0	0	0	300	0	0	0

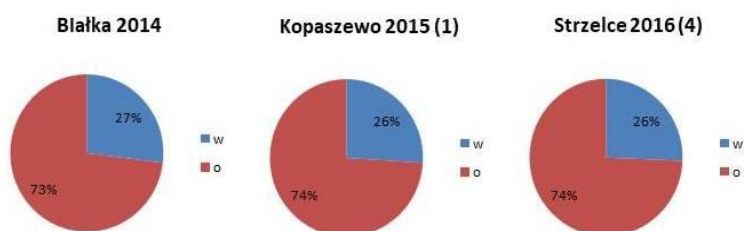
Tabela 9. Segregacja mieszańców pokolenia F₂ pod względem odporności na mączniaka prawdziwego

Mieszańce	Izolaty mączniaka prawdziwego	Liczba testowanych roślin	Liczba roślin odpornych	Liczba roślin wrażliwych	Oczekiwane rozszczepienie	Wartość χ^2
Canyon x Fuchs	Białka 2014	300	220	80	3:1	0,444
	Kopaszewo 2015 (1)	300	221	79	3:1	0,284
	Strzelce 2016 (4)	300	222	78	3:1	0,160
Canyon x Sam	Białka 2014	300	219	79	3:1	0,373
	Kopaszewo 2015 (1)	300	222	78	3:1	0,160
	Strzelce 2016 (4)	300	223	77	3:1	0,071

Canyon x Fuchs



Canyon x Sam



Rysunek 5. Segregacja mieszańców pokolenia F₂ analizowanych populacji pod względem odporności na mączniaka prawdziwego

Z analizowanych populacji zebrano ziarniaki F₃ z każdej rośliny oddzielnie i wysiano w celu oceny homozygotyczności roślin F₂. Ocenę homozygotyczności przeprowadzono w oparciu o testy żywiciel-patogen z wykorzystaniem izolatów awirulentnych dla źródła odporności zidentyfikowanego w odmianie Canyon. Na podstawie przeprowadzonych testów wyselekcjonowano osobniki homozygotyczne i heterozygotyczne w analizowanych populacjach (Tab. 10).

Tabela 10. Rozkład osobników homozygotycznych i heterozygotycznych w

Mieszańce	Izolat mączniaka prawdziwego	Liczba testowanych roślin	Liczba homozygot odpornych	Liczba homozygot wrażliwych	Liczba heterozygot
Canyon x Fuchs	Białka 2014	292	80	76	136
	Kopaszewo 2015 (1)	292	81	73	138
	Strzelce 2016 (4)	292	83	78	131
Canyon x Sam	Białka 2014	284	85	70	129
	Kopaszewo 2015 (1)	284	80	75	129
	Strzelce 2016 (4)	284	79	76	129

Mierniki dla tematu badawczego 2 (podać w tabeli)

Lp.	Miernik ³	Wartość miernika podana w opisie zadania	Wartość miernika zrealizowana
1	Liczba przetestowanych populacji F ₂ (300 osobników z każdej populacji)	2	2
2	Liczba izolatów mączniaka prawdziwego wybranych do oceny każdej z analizowanych populacji F ₂	3	3

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

3.3 Temat badawczy 3: Piramidyżacja 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 piramidyżacja efektywnych genów odporności w genomie owsa.

Materiały i metody

Przedmiotem analiz w zadaniu 3 były odmiany owsa zwyczajnego wrażliwe na porażenie przez mączniaka prawdziwego, linie hodowlane pozyskane ze spółek hodowli roślin oraz linie owsa zawierające zdefiniowane geny odporności na mączniaka prawdziwego. W celu piramidyżacji genów odporności na mączniaka prawdziwego przekrzyżowano ze sobą odmiany i linie owsa zawierające zdefiniowane geny odporności na ten patogen oraz przeprowadzono krzyżowania mieszańców F1 uzyskanych w 2016 roku.

Genotypy przeznaczone do krzyżowań wysiano na polkach doświadczalnych Uniwersytetu Przyrodniczego w Lublinie zlokalizowanych w Czesławicach koło Nałęczowa (Tab.11.). 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 %.

Tabela 11. Genotypy owsa wysiane do krzyżowań w 2017 roku

Lp	Odmiany owsa zwyczajnego	Genotypy z Hodowli Roślin DANKO	Linie i odmiany kontrolne	Mieszańce F ₁ uzyskane w 2016 roku
1	Arab	DC1	Linia kontrolna Pm4	Arden x Pm4
2	Arden	DC2	Av1860 (Pm4)	Arden x Pm7
3	Arkan	DC3	Cc4761 (Pm4)	Arkan x Pm4
4	Berdysz	DC4	Linia kontrolna Pm7	Arkan x Pm7
5	Bingo	DC5	APR122	Breton x Pm4
6	Breton	DC6	Fuchs	Elegant x Pm7
7	Celer	DC7		Romulus x Pm4
8	Deresz	DC8		Romulus x Pm7
9	Elegant	DC9		
10	Gniady	DC10		
11	Haker	Dc11		
12	Harnaś	DC12		
13	Kasztan	DC13		

14	Komfort	DC14		
15	Koneser			
16	Krezus			
17	Maczo			
18	Nawigator			
19	Paskal			
20	Polar			
21	Rajtar			
22	Romulus			
23	Siwiek			
24	Sławko			
25	Zuch			

Wyniki

W ramach realizacji zadania wykonano krzyżowania roślin zgodnie z zaplanowanym schematem, który został sprecyzowany o dokładną liczbę odmian i rodów. W 2017 roku do krzyżowań przeznaczono 14 linii Hodowlanych pochodzących z Hodowli Roślin DANKO (Tab. 12). Liczbę odmian przeznaczonych do krzyżowań zwiększono do 25 (Tab. 13). Do schematu krzyżowań dołączono linie z genami *Pm4* i *Pm7* oraz mieszańce pokolenia F1 uzyskane w 2016 roku (Tab. 14). Łącznie wykastrowano 2117 kwiatków z form matecznych. Najwięcej wykastrowanych kwiatków przypadało dla linii DC1, najmniej dla odmiany Polar. Średnio na jedną odmianę mateczną przypadało 45,08 wykastrowanych kwiatków, na genotyp ojcowski zaś 338.

W 2017 roku wykonano 100 kombinacji krzyżówkowych. Ziarniaki mieszańcowe uzyskano dla 44 kombinacji. Łącznie w wyniku krzyżowań przeprowadzonych w 2017 roku uzyskano 137 ziarniaków. Procent zawiązanych ziarniaków wahał się od 60% do 3%. (Tab. 13). Najwięcej ziarniaków uzyskano w wyniku zapylenia pyłkiem pochodzącym z linii Pm4 (52 ziarniaki). W 2017 roku nie powiodły się krzyżowania, w których formą ojcowską była linia APR122, w wyniku zapylenia pyłkiem z tej linii nie uzyskano żadnych ziarniaków. Średnio na jedną formę ojcowską przypadało 44,33 ziarniaka.

Rozpatrując formy mateczne, najwięcej ziarniaków uzyskano dla kombinacji z linią DC1 (21 ziarniaków), średnio na jedną odmianę mateczną wykorzystaną w krzyżowaniach przypadało 3,04 ziarniaka.

Tabela 12. Kombinacje krzyżówkowe wykonane pomiędzy liniami otrzymanymi z Hodowli Roślin DANKO a liniami zawiązującymi geny *Pm4* i *Pm7*

forma mateczna	forma ojcowska	Liczba wykastrowanych kwiatków	liczba ziarniaków	% zawiązanych ziarniaków
DC1	Pm7	35	2	6%
	Pm4	40	13	33%
	Cc4761	10	6	60%
DC2	pm7	10	3	30%
	Pm4	9	3	33%
	Cc4761	15	1	7%

DC3	Pm7	21	0	0%
	Pm4	21	3	14%
	Cc4761	13	0	0%
DC4	Pm7	22	1	5%
	Pm4	19	0	0%
	Cc4761	14	0	0%
DC5	Pm7	21	2	10%
	pm4	23	0	0%
	Av1860	23	1	4%
DC6	Pm7	24	1	4%
	Cc4761	12	0	0%
	Av1860	18	0	0%
DC7	Pm7	18	0	0%
	pm4	21	0	0%
	Cc4761	6	0	0%
DC8	Pm7	20	0	0%
	Pm4	30	2	7%
	Cc4761	11	0	0%
DC9	pm7	24	0	0%
	Pm4	32	7	22%
	Cc4761	7	0	0%
DC10	Pm7	21	0	0%
	Pm4	10	2	20%
	Cc4761	17	0	0%
Dc11	Pm7	22	1	5%
	Cc4761	26	0	0%
	Av1860	21	0	0%
DC12	Pm7	22	1	5%
	Pm4	20	10	50%
	APR122	9	0	0%
DC13	Pm7	23	2	9%
	Cc4761	22	0	0%
	Av1860	25	0	0%
DC14	Pm7	25	4	16%
	Pm4	19	0	0%
	APR122	11	0	0%
suma		812	65	8%

Tabela 13. Kombinacje krzyżówkowe wykonane pomiędzy odmianami owsa zwyczajnego a liniami a genami *Pm4* i *Pm7*

Forma mateczna	Forma ojcowska	Liczba kwiatków	Liczba ziarniaków	%zawiązanych ziarniaków
Arab	Pm7	26	0	0%
	Pm4	23	1	4%
Arden	Pm7	36	3	8%
	Pm4	10	1	10%
Arkan	Pm7	22	4	18%
	PM4	24	0	0%
Berdysz	Pm7	25	0	0%

	Pm4	22	0	0%
Bingo	Pm7	23	1	4%
	Pm4	23	2	9%
	Cc4761	24	0	0%
	APR122	9	0	0%
Breton	Pm7	18	0	0%
	Pm4	19	1	5%
Celer	Pm7	21	0	0%
	Pm4	6	0	0%
Deresz	Pm7	23	1	4%
Elegant	Pm7	27	1	4%
	Pm4	21	0	0%
Gniady	Pm7	18	2	11%
	Pm4	19	0	0%
Haker	Pm7	26	0	0%
	Pm4	17	0	0%
Harnaś	Pm7	29	0	0%
	Pm4	27	0	0%
Kasztan	Pm7	22	1	5%
	Pm4	19	2	11%
Komfort	Pm7	23	0	0%
	pm4	19	0	0%
Koneser	Pm7	24	0	0%
	Pm4	17	0	0%
Krezus	Pm7	21	1	5%
	Pm4	9	0	0%
Maczo	Pm7	25	1	4%
Nawigator	Pm7	17	2	12%
	m4	26	0	0%
Paskal	Pm7	20	0	0%
	Pm4	14	0	0%
Polar	Pm7	18	1	6%
Rajtar	Pm7	35	1	3%
	Pm4	10	1	10%
Romulus	Pm7	30	0	0%
	Pm4	8	0	0%
Siwek	Pm7	16	0	0%
	Pm4	12	0	0%
Sławko	Pm7	24	0	0%
	Pm4	17	4	24%
Zuch	Pm7	23	0	0%
	Pm4	22	0	0%
Suma		1009	31	3%

Tabela 14. Kombinacje krzyżówkowe wykonane pomiędzy mieszkańcami F1 użytymi w 2016 roku

Forma mateczna	Forma ojcowska	Liczba kwiatków	Liczba ziarniaków	%zawiązaných ziarniaków
Arden x Pm4	Elegant x Pm7	16	0	0%
Arden x Pm4	Arden x Pm7	52	2	4%
Arden x Pm7	Arden x Pm4	36	7	19%

Arkan x Pm4	Arkan x Pm7	49	8	16%
Arkan x Pm7	Arkan x Pm4	20	5	25%
Breton x Pm4	Elegant x Pm7	30	0	0%
Elegant x Pm7	Arden x Pm4	22	0	0%
Romulus x Pm4	Romulus x Pm7	39	9	23%
Romulus x Pm7	Romulus x Pm4	32	10	31%
Suma		296	41	14%

Mierniki dla tematu badawczego 3

Lp.	Miernik ⁴	Wartość miernika podana w opisie zadania	Wartość miernika zrealizowana
1	Liczba wykonanych kombinacji krzyżówkowych	100	100

4.4 Temat badawczy 4: Genotypowanie form rodzicielskich i mieszańców F₂ homozygotycznych pod względem odporności na mączniaka prawdziwego z wykorzystaniem technik RAPD, ISSR i SRAP

Cel tematu badawczego 2

Celem prac prowadzonych w ramach tematu 4 było poszukiwanie losowych markerów DNA różnicujących pule roślin odpornych i podatnych w populacji F₂ APR122 × Fuchs oraz w populacji Av1860 x Fuchs

Materiały i metody

Przedmiotem badań realizowanych w 2017 roku były homozygotyczne pod względem odporności na mączniaka prawdziwego osobniki populacji APR122 x Fuchs i Av1860 x Fuchs oraz formy rodzicielskie. Na podstawie testów żywiciel-patogen, z analizowanych 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 genów Pm4 i Pm7 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 przypadku populacji APR122 x Fuchs w 2017 roku przetestowano 400 starterów RAPD oraz zestaw 200 kombinacji starterów SRAP. Natomiast w przypadku populacji Av1860 x Fuchs przetestowano 600 starterów RAPD i zestaw 200 kombinacji starterów SRAP. Skład mieszaniny reakcyjnej dla obu systemów markerowych był następujący: 1 x Taq PCR SILVER MIX (Syngen), 5,3 pM startera, 60 ng genomowego DNA. Reakcje amplifikacji

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

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 (dla markerów RAPD) i 2% żelu agarozowym (dla markerów SRAP) 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 z każdej analizowanej populacji wybrano po 60 osobników homozygotycznych pod względem odporności na macznia prawdziwego. 30 osobników stanowiły homozygoty odporne na macznia prawdziwego, kolejne 30 homozygoty wrażliwe. Ponadto materiałem w analizach molekularnych były również formy rodzicielskie : linia APR122 z genem Pm7 i odmiana Fuchs dla populacji APR122 x Fuchs oraz linia av1860 z genem Pm4 i odmiana Fuchs dla populacji Av1860 x Fuchs (tab 15 i 16)

Tabela 15. Genotypy populacji APR122 x Fuchs wybrane do analiz molekularnych

Lp	Genotypy odporne (Numer rośliny F ₂)	Fenotyp	Genotypy wrażliwe (Numer rośliny F ₂)	Fenotyp
1	1	O O O	10	W W W
2	2	O O O	14	W W W
3	6	O O O	19	W W W
4	9	O O O	20	W W W
5	17	O O O	25	W W W
6	18	O O O	26	W W W
7	36	O O O	28	W W W
8	37	O O O	31	W W W
9	39	O O O	43	W W W
10	46	O O O	44	W W W
11	47	O O O	45	W W W
12	49	O O O	51	W W W
13	50	O O O	60	W W W
14	55	O O O	68	W W W
15	56	O O O	81	W W W
16	61	O O O	83	W W W
17	62	O O O	89	W W W
18	65	O O O	90	W W W
19	66	O O O	92	W W W
20	70	O O O	93	W W W
21	71	O O O	99	W W W
22	76	O O O	108	W W W
23	82	O O O	110	W W W
24	85	O O O	111	W W W
25	88	O O O	116	W W W
26	91	O O O	119	W W W
27	95	O O O	125	W W W
28	97	O O O	126	W W W
29	101	O O O	127	W W W
30	113	O O O	133	W W W
31	APR122	O O O	Fuchs	W W W

Tabela 16. Genotypy populacji Av1860 x Fuchs wybrane do analiz molekularnych

Lp	Genotypy odporne (Numer rośliny F ₂)	Fenotyp	Genotypy wrażliwe (Numer rośliny F ₂)	Fenotyp
1	6	O O O	1	W W W

2	7	O	O	O	2	W	W	W
3	9	O	O	O	3	W	W	W
4	11	O	O	O	4	W	W	W
5	14	O	O	O	13	W	W	W
6	16	O	O	O	19	W	W	W
7	17	O	O	O	23	W	W	W
8	21	O	O	O	24	W	W	W
9	22	O	O	O	35	W	W	W
10	29	O	O	O	47	W	W	W
11	32	O	O	O	49	W	W	W
12	36	O	O	O	50	W	W	W
13	41	O	O	O	53	W	W	W
14	56	O	O	O	54	W	W	W
15	57	O	O	O	63	W	W	W
16	58	O	O	O	73	W	W	W
17	60	O	O	O	75	W	W	W
18	65	O	O	O	78	W	W	W
19	66	O	O	O	88	W	W	W
20	67	O	O	O	92	W	W	W
21	68	O	O	O	103	W	W	W
22	72	O	O	O	104	W	W	W
23	77	O	O	O	116	W	W	W
24	84	O	O	O	124	W	W	W
25	87	O	O	O	126	W	W	W
26	89	O	O	O	130	W	W	W
27	90	O	O	O	137	W	W	W
28	96	O	O	O	139	W	W	W
29	104	O	O	O	148	W	W	W
30	110	O	O	O	156	W	W	W
31	Av1860	O	O	O	Fuchs	W	W	W

Do poszukiwania potencjalnych markerów sprzężonych z genem Pm7 w populacji APR122 x Fuchs wybrano zestaw 400 starterów RAPD oraz 200 kombinacji starterów SRAP.

Natomiast do poszukiwania potencjalnych markerów sprzężonych z genem Pm4 w populacji Av1860 x Fuchs wybrano zestaw 600 starterów RAPD oraz 200 kombinacji starterów SRAP.

Symbol i sekwencje starterów przedstawiono w tabelach 17 i 18

Tabela 17. Sekwencje starterów RAPD wybrane do poszukiwania markerów dla genów odporności na mączniaka prawdziwego w owsie zwyczajnym.

Na szaro zaznaczono startery wybrane do analiz populacji APR122 x Fuchs

Lp	Symbol startera	Sekwencja startera	Lp	Symbol startera	Sekwencja startera	Lp	Symbol startera	Sekwencja startera	Lp	Symbol startera	Sekwencja startera
1	A-01	CAGGCCCTTC	151	H-08	GAAACACCCC	301	O-17	GGCTTATGCC	451	U-05	TTGGCGGCCT
2	A-02	TGCCGAGCTG	152	H-09	TGTAGCTGGG	302	O-18	CTCGCTATCC	452	U-06	ACCTTTGCGG
3	A-03	AGTCAGCCAC	153	H-10	CCTACGTCAG	303	O-19	GGTGACGTT	453	U-07	CCTGCTCATC
4	A-04	AATCGGGCTG	154	H-11	CTTCCGAGT	304	O-20	ACACACGCTG	454	U-08	GGCGAAGGTT
5	A-05	AGGGGTCTTG	155	H-12	ACGCGCATGT	305	OPJ-1	CCC GGC ATA A	455	U-09	CCACATCGGT
6	A-06	GGTCCCTGAC	156	H-13	GACGCCACAC	306	OPJ-11	ACT CCT GCG A	456	U-10	ACCTCGGCAC
7	A-07	GAAACGGGTG	157	H-14	ACCAGGTTGG	307	OPJ-12	GTC CCG TGG T	457	U-11	AGACCCAGAG
8	A-07B	GAA ACG GGT G	158	H-15	AATGGCGCAG	308	OPJ-14	CAC CCG GAT G	458	U-12	TCACCAGCCA
9	A-08	GTGACGTAGG	159	H-16	TCTCAGCTGG	309	OPJ-15	TGTAGCAGGG	459	U-13	GGCTGGTTCC
10	A-09	GGGTAACGCC	160	H-17	CACTCTCCTC	310	OPJ-16	CTG CTT AGG G	460	U-136	TAC GTC TTG C
11	A-10	GTGATCGCAG	161	H-18	GAATCGGCCA	311	OPJ-17	ACG CCA GTT C	461	U-14	TGGGTCCCTC
12	A-11	CAATCGCCGT	162	H-19	CTGACCAGCC	312	OPJ-18	TGG TCG CAG A	462	U-15	ACGGGCCAGT
13	A-12	TCGGCGATAG	163	H-20	GGGAGACATC	313	OPJ-19	CAC AGG CGG A	463	U-16	CTGCCTGGA
14	A-13	CAGCACCCAC	164	I-01	ACCTGGACAC	314	OPJ-2	CCC GTT GGG A	464	U-17	ACCTGGGGAG
15	A-14	TCTGTGCTGG	165	I-02	GGAGGAGAGG	315	OPJ-20	GTG TCG CGA G	465	U-18	GGG CCG TTT A
16	A-15	TTCCGAACCC	166	I-03	CAGAAGCCCA	316	OPJ-3	TCT CCG CTT G	466	U-18	GAGGTCCACA
17	A-16	AGCCAGCGAA	167	I-04	CCGCCTAGTC	317	OPJ-4	CCG AAC ACG G	467	U-19	GTCAGTGGCG
18	A-17	GACCGCTTGT	168	I-05	TGTTCCACGG	318	OPJ-5	CTT CAT GGG G	468	U-197	TCC CCG TTC C
19	A-18	AGGTGACCGT	169	I-06	AAGGCGGCAG	319	OPJ-6	TCG TTC CGC A	469	U-20	ACAGCCCCCA
20	A-19	CAAACGTCGG	170	I-07	CAGCGACAAG	320	OPJ-7	CCT CTC GAC A	470	U-221	CCC GTC AAT A
21	A-20	GTGCGATCC	171	I-08	TTTGCCCGT	321	OPJ-8	CAT ACC GTG G	471	U-225	CGA CTC ACA G

22	B-01	GTTTCGCTCC	172	I-09	TGGAGAGCAG	322	OPR-1	TGC GGG TCC T	472	U-250	CGA CAG TCC C
23	B-02	TGATCCCTGG	173	I-10	ACAACGCGAG	323	OPR-19	CCT CCT CAT C	473	U-254	CGC CCC CAT T
24	B-03	CATCCCCCTG	174	I-11	ACATGCCGTG	324	P-01	GTAGCACTCC	474	U-280	CTG GGA GTG G
25	B-04	GGACTGGAGT	175	I-12	AGAGGGCACA	325	P-02	TCGGCACGCA	475	U-287	CGA ACG GCG G
26	B-05	TGCGCCCTTC	176	I-13	CTGGGGCTGA	326	P-03	CTGATACGCC	476	U-295	CGC GTT CCT G
27	B-06	TGCTCTGCC	177	I-14	TGACGGCGGT	327	P-04	GTGTCTCAGG	477	U-300	GGC TAG GGC G
28	B-07	GGTGACGCAG	178	I-15	TCATCCGAGG	328	P-05	CCCCGGTAAC	478	U-386	TGT AAG CTC G
29	B-08	GTCCACACGG	179	I-16	TCTCCGCCT	329	P-06	GTG GGC TGA C	479	U-532	TTG AGA CAG G
30	B-09	TGGGGGACTC	180	I-17	GGTGGTGATG	330	P-06	GTGGGCTGAC	480	U-534	CAC CCC CTG C
31	B-10	CTGCTGGGAC	181	I-18	TGCCAGCCT	331	P-07	GTCCATGCCA	481	U-535	CCA CCA ACA G
32	B-11	GTAGACCCGT	182	I-19	AATGCGGGAG	332	P-08	ACATCGCCCA	482	U-552	CTA AAT GGC G
33	B-12	CCTTGACGCA	183	I-20	AAAGTGGCGG	333	P-09	GTGGTCCGCA	483	U-572	TTC GAC CAT C
34	B-13	TTCCCCCGCT	184	J-01	CCCGGCATAA	334	P-10	TCCCGCTAC	484	U-600	GAA GAA CCG C
35	B-14	TCCGCTCTGG	185	J-02	CCCGTTGGGA	335	P-11	AACGCGTCGG	485	V-01	TGACGCATGG
36	B-15	GGAGGGTGTT	186	J-03	TCTCCGCTTG	336	P-12	AAGGGCGAGT	486	V-02	AGTCACTCCC
37	B-16	TTTGCCCGGA	187	J-04	CCGAACACGG	337	P-13	GGAGTGCCTC	487	V-03	CTCCCTGCAA
38	B-17	AGGGAACGAG	188	J-05	CTC CAT GGG G	338	P-14	CCAGCCGAAC	488	V-04	CCCCTACGA
39	B-18	CCACAGCAGT	189	J-05	CTCCATGGGG	339	P-15	GGAAGCCAAC	489	V-05	TCCGAGAGGG
40	B-19	ACCCCCGAAG	190	J-06	TCGTTCCGCA	340	P-16	CCAAGCTGCC	490	V-06	ACGCCCAGGT
41	B-20	GGACCCITAC	191	J-07	CCTCTCGACA	341	P-17	TGACCCGCCT	491	V-07	GAAGCCAGCC
42	C-01	TTCGAGCCAG	192	J-08	CATACCGTGG	342	P-18	GGCTTGGCCT	492	V-08	GGACGGCGTT
43	C-02	GTGAGGCGTC	193	J-09	TGAGCCTCAC	343	P-19	GGGAAGGACA	493	V-09	TGTACCCGTC
44	C-03	GGGGGTCTTT	194	J-10	AAGCCCGAGG	344	P-20	GACCCTAGTC	494	V-10	GGACCTGCTG
45	C-04	CCGCATCTAC	195	J-11	ACTCCTGCGA	345	Q-01	GGGACGATGG	495	V-11	CTCGACAGAG
46	C-05	GATGACCGCC	196	J-12	GTCCCGTGGT	346	Q-02	TCTGTCCGTC	496	V-12	ACCCCCACT
47	C-06	GAACGGACTC	197	J-13	CCACACTACC	347	Q-03	GGTACCTCA	497	V-13	ACCCCTGAA
48	C-07	GTCCCGACGA	198	J-14	CACCCGATG	348	Q-04	AGTGCGCTGA	498	V-14	AGATCCCGCC
49	C-08	TGGACCGGTG	199	J-15	TGTAGCAGGG	349	Q-05	CCGCTCTTG	499	V-15	CAGTGCCGGT
50	C-09	CTCACCGTCC	200	J-16	CTGCTTAGGG	350	Q-06	GAGCGCCTTG	500	V-16	ACACCCACA
51	C-10	TGTCTGGGTG	201	J-17	ACGCCAGTTC	351	Q-07	CCCCGATGGT	501	V-17	ACCGCTTGT
52	C-11	AAAGTGCJGG	202	J-18	TGGTCCGAGA	352	Q-08	CTCCAGCGGA	502	V-18	TGGTGGCGTT
53	C-12	TGTCATCCCC	203	J-19	GGACACCACT	353	Q-09	GGCTAACCGA	503	V-19	GGGTGTGCAG
54	C-13	AAGCCTCGTC	204	J-20	AAGCGGCCTC	354	Q-10	TGTGCCCGAA	504	V-20	CAGCATGGTC
55	C-14	TGCGTGCTTG	205	K-01	CATTCGAGCC	355	Q-11	TCTCCGCAAC	505	W-01	CTCAGTGTCC
56	C-15	GACGGATCAG	206	K-02	GTCTCCGCAA	356	Q-12	AGTAGGGCAC	506	W-02	ACCCCGCAA
57	C-16	CACACTCCAG	207	K-03	CCAGCTTAGG	357	Q-13	GGAGTGGACA	507	W-03	GTCCGGAGTG
58	C-17	TTCCCCCAG	208	K-04	CCGCCAAAAC	358	Q-14	GGACGCTTCA	508	W-04	CAGAAGCGGA
59	C-18	TGAGTGGGTG	209	K-05	TCTGTGAGGG	359	Q-15	GGGTAACGTG	509	W-05	GGCGGATAAG
60	C-19	GTTGCCAGCC	210	K-06	CACCTTCCC	360	Q-16	AGTGCAGCCA	510	W-06	AGGCCCGATG
61	C-20	ACTTCGCCAC	211	K-07	AGCGAGCAAG	361	Q-17	GAAGCCCTTG	511	W-07	CTGGACGTCA
62	D-01	ACCGCAAGG	212	K-08	GAACACTGGG	362	Q-18	AGGCTGGGTG	512	W-08	GACTGCCTCT
63	D-02	GGACCCAACC	213	K-09	CCCTACCGAC	363	Q-19	CCCCCTATCA	513	W-09	GTGACCGAGT
64	D-03	GTGCGCGTCA	214	K-10	GTGCAACGTG	364	Q-20	TCGCCAGTC	514	W-10	TCGCATCCCT
65	D-04	TCTGGTGAGG	215	K-11	AATGCCCCAG	365	R-01	TGCGGGTCTT	515	W-11	CTGATGCGTG
66	D-05	TGAGCGGACA	216	K-12	TGGCCCTCAC	366	R-02	CACAGCTGCC	516	W-12	TGGGCAGAAG
67	D-06	ACCTGAACGG	217	K-13	GGTTGTACCC	367	R-03	ACACAGAGGG	517	W-13	CACAGCGACA
68	D-07	TTGGCACGGG	218	K-14	CCCGCTACAC	368	R-04	CCCGTAGCAC	518	W-14	CTGCTGAGCA
69	D-08	GTGTGCCCCA	219	K-15	CTCCTGCCAA	369	R-05	GACCTAGTGG	519	W-15	ACACCGGAAC
70	D-09	CTCTGGAGAC	220	K-16	GAGCGTCGAA	370	R-06	GTCTACGGCA	520	W-16	CAGCCTACCA
71	D-10	GGTCTACACC	221	K-17	CCCAGCTGTG	371	R-07	ACTGGCCTGA	521	W-17	GTCTGGGTT
72	D-11	AGCGCCATTG	222	K-18	CCTAGTCGAG	372	R-08	CCCGTTGCCT	522	W-18	TTCAGGGCAC
73	D-12	CACCGTATCC	223	K-19	CACAGGCGGA	373	R-09	TGAGCACGAG	523	W-19	CAAAGCGCTC
74	D-13	GGGGTGACGA	224	K-20	GTGTCGCGAG	374	R-10	CCATTCCCA	524	W-20	TGTGGCAGCA
75	D-14	CTTCCCAAG	225	L-01	GGCATGACCT	375	R-11	GTAGCCGTCT	525	X-01	TGG CCA GTG A
76	D-15	CATCCGTGCT	226	L-02	TGGGCGTCAA	376	R-12	ACAGGTGCGT	526	X-01	CTGGGCACGA
77	D-16	AGGGCGTAAG	227	L-03	CCAGCAGCTT	377	R-13	GGACGACAAG	527	X-02	AGG GTA CCA G
78	D-17	TTTCCACGG	228	L-04	GACTGCACAC	378	R-14	CAGGATTCCC	528	X-02	TTCCGCCACC
79	D-18	GAGAGCCAAC	229	L-05	ACGCAGGCAC	379	R-15	GGACAACGAG	529	X-03	GTA GCT GAC G
80	D-19	CTGGGGACTT	230	L-06	GAGGGAAGAG	380	R-16	CTCTGCGCGT	530	X-03	TGGCGCAGTG
81	D-20	ACCCGGTCAC	231	L-07	AGGCGGGAAC	381	R-17	CCGTACGTAG	531	X-04	TCA GTC CGA C
82	E-01	CCCAAGGTCC	232	L-08	AGCAGGTGGA	382	R-18	GGCTTTGCCA	532	X-04	CCGCTACCGA
83	E-02	GGTGCJGGAA	233	L-09	TGCGAGAGTC	383	R-19	CCTCCTCATC	533	X-05	GAC AGG TAC C
84	E-03	CCAGATGCAC	234	L-10	TGGGAGATGG	384	R-20	ACGGCAAGGA	534	X-05	CCTTCCCTC

85	E-04	GTGACATGCC	235	L-11	ACGATGAGCC	385	S-01	CTACTGCGCT	535	X-06	TCC GAG TCT G
86	E-05	TCAGGGAGGT	236	L-12	GGGCGGTACT	386	S-02	CCTCTGACTG	536	X-06	ACGCCAGAGG
87	E-06	AAGACCCCTC	237	L-13	ACCGCCTGCT	387	S-03	CAGAGGTCCC	537	X-07	GAGCGAGGCT
88	E-07	AGATGCAGCC	238	L-14	GTGACAGGCT	388	S-04	CACCCCCTTG	538	X-08	CAGGGGTGGA
89	E-08	TCACCACGGT	239	L-15	AAGAGAGGGG	389	S-05	TTTGGGGCCT	539	X-09	GGTCTGGTTG
90	E-09	CTTACCCGA	240	L-16	AGGTTGCAGG	390	S-06	GATACCTCGG	540	X-10	CCCTAGACTG
91	E-10	CACCAGGTGA	241	L-17	AGCCTGAGCC	391	S-07	TCCGATGCTG	541	X-11	GGAGCCTCAG
92	E-11	GAGTCTCAGG	242	L-18	ACCACCACC	392	S-08	TTCAGGGTGG	542	X-12	TCGCCAGCCA
93	E-12	TTATCGCCCC	243	L-19	GAGTGGTGAC	393	S-09	TCCTGGTCCC	543	X-13	ACGGGAGCAA
94	E-13	CCCGATTCCG	244	L-20	TGGTGGACCA	394	S-10	ACCGTCCAG	544	X-14	ACAGGTGCTG
95	E-14	TGCGGCTGAG	245	M-01	GTTGGTGGCT	395	S-11	AGTCGGGTGG	545	X-15	CAGACAAGCC
96	E-15	ACGCACAACC	246	M-02	ACAACGCCTC	396	S-12	CTGGGTGAGT	546	X-16	CTCTGTTCCG
97	E-16	GGTGACTGTG	247	M-03	GGGGGATGAG	397	S-13	GTCTTCTCTG	547	X-17	GACACGGACC
98	E-17	CTACTGCCGT	248	M-04	GGCGGTGTC	398	S-14	AAAGGGTCC	548	X-18	GACTAGGTGG
99	E-18	GGAAGTGCAGA	249	M-05	GGGAACGTGT	399	S-15	CAGTTCACGG	549	X-19	TGGCAAGGCA
100	E-19	ACGGCGTATG	250	M-06	CTGGGCAACT	400	S-16	AGGGGGTCC	550	X-20	CCCAGCTAGA
101	E-20	AACGGTGACC	251	M-07	CCGTGACTCA	401	S-17	TGGGGACCAC	551	Y-01	GTGGCATCTC
102	F-01	ACGGATCCTG	252	M-08	TCTGTTCCCC	402	S-18	CTGGCGAACT	552	Y-02	CATGCCGCA
103	F-02	GAGGATCCCT	253	M-09	GTCTTGCGGA	403	S-19	GAGTCAGCAG	553	Y-03	ACAGCTGCT
104	F-03	CCTGATCACC	254	M-10	TCTGGCGCAC	404	S-20	TCTGGACGGA	554	Y-04	GGCTGCAATG
105	F-04	GGTGATCAGG	255	M-11	GTCCACTGTG	405	SE-101	CGT CGT GGA A	555	Y-05	GGCTGCGACA
106	F-05	CCG AAT TCC C	256	M-12	GGGACGTTGG	406	SE-139	GTC CCG ACG A	556	Y-06	AAGGCTCACC
107	F-05	CCGAATTCCC	257	M-13	GGTGGTCAAG	407	SE-166	TGC GGC TGA G	557	Y-07	AGAGCCGTC
108	F-06	GGGAATTCGG	258	M-14	AGGGTCTGTT	408	SE-177	ACG CGC ATG T	558	Y-08	AGGCAGAGCA
109	F-07	CCGATATCCC	259	M-15	GACCTACCAC	409	SE-199	TCC GCG GTC T	559	Y-09	AGCAGCGCAC
110	F-08	GGGATATCGG	260	M-16	GTAACCAGCC	410	SE-223	GGA ACT ACG T	560	Y-10	CAAACGTGGG
111	F-09	CCAAGCTTCC	261	M-17	TCAGTCCGGG	411	SE-224	TGC CGC TAA G	561	Y-11	AGACGATGGG
112	F-10	GGAAGCTTGG	262	M-18	CACCATCCGT	412	SE-231	TCG CGC TGT C	562	Y-12	AAGCTGCGA
113	F-11	TTGGTACCCC	263	M-19	CCTTCAGGCA	413	SE-25	AAG CAC CGG C	563	Y-13	GGGTCTCGGT
114	F-12	ACGGTACCAG	264	M-20	AGGTCTTGGG	414	SE-29	AGA GAT CTC C	564	Y-14	GGTCGATCTG
115	F-13	GGCTGCAGAA	265	N-01	CTCACGTTGG	415	SE-294	AGG GTG TAC G	565	Y-15	AGTCGCCCTT
116	F-14	TGCTGCAGGT	266	N-02	ACCAGGGGCA	416	SE-310	AAC GCG TTC T	566	Y-16	GGGCCAATGT
117	F-15	CCAGTACTCC	267	N-03	GGTACTCCCC	417	SE-479	GTG TAC GGA T	567	Y-17	GACGTGGTGA
118	F-16	GGAGTACTGG	268	N-04	GACCGACCCA	418	SE-502	AAC GGT GAC C	568	Y-18	GTGGAGTCAG
119	F-17	AAC CCG GGA A	269	N-05	ACTGAACGCC	419	SE-6	TGT CCA GCT T	569	Y-19	TGAGGGTCCC
120	F-17A	AACCCGGGAA	270	N-06	GAGACGCACA	420	SE-69	TCG CCC CAT T	570	Y-20	AGCCGTGGAA
121	F-18	TTCCCGGGTT	271	N-07	CAGCCCAGAG	421	T-01	CGC AGT ACT C	571	Z-01	TCTGTGCCAC
122	F-19	CCTCTAGACC	272	N-08	ACCTCAGCTC	422	T-01	GGGCCACTCA	572	Z-02	CCTACGGGGA
123	F-20	GGTCTAGAGG	273	N-09	TGCCGGCTTG	423	T-02	GTC CTA CTC G	573	Z-03	CAGCACCGCA
124	G-01	CTACGGAGGA	274	N-10	ACAACGGGG	424	T-02	GGAGAGACTC	574	Z-04	AGGCTGTGCT
125	G-02	GGCACTGAGG	275	N-11	TCGCCGAAA	425	T-02B	CTA CAC AGG C	575	Z-05	TCCCATGCTG
126	G-03	GAGCCCTCCA	276	N-12	CACAGACACC	426	T-03	GTC CTT AGC G	576	Z-06	GTGCCGTTCA
127	G-04	AGCGTGTCTG	277	N-13	AGCGTCACTC	427	T-03	TCCACTCCTG	577	Z-07	CCAGGAGGAC
128	G-05	CTGAGACGGA	278	N-14	TCGTGCGGGT	428	T-04	GTC CTC AAC G	578	Z-08	GGGTGGGTAA
129	G-06	GTGCCTAACC	279	N-15	CAGCGACTGT	429	T-04	CACAGAGGGA	579	Z-09	CACCCAGTC
130	G-07	GAACCTGCGG	280	N-16	AAGCGACCTG	430	T-05	GGGTTTGGCA	580	Z-10	CCGACAAACC
131	G-08	TCACGTCCAC	281	N-17	CATTGGGGAG	431	T-06	CAAGGGCAGA	581	Z-11	CTCAGTCGCA
132	G-09	CTGACGTAC	282	N-18	GGTGAGGTCA	432	T-07	GGCAGGCTGT	582	Z-12	TCAACGGGAC
133	G-10	AGGGCCGTCT	283	N-19	GTCCGTACTG	433	T-08	AACGGCGACA	583	Z-13	GACTAAGCCC
134	G-11	TGCCCGTCGT	284	N-20	GGTGCTCCGT	434	T-09	CACCCCTGAG	584	Z-14	TCGGAGGTTT
135	G-12	CAGCTCACGA	285	O-01	GGCACGTAAG	435	T-10	CCTTCGGAAG	585	Z-15	CAGGGCTTTC
136	G-13	CTCTCCGCA	286	O-02	ACGTAGCGTC	436	T-11	TTCCCCGCGA	586	Z-16	TCCCATCAC
137	G-14	GGATGAGACC	287	O-03	CTGTTGCTAC	437	T-12	GGGTGTGTAG	587	Z-17	CCTTCCACT
138	G-15	ACTGGGACTC	288	O-04	AAGTCCGCTC	438	T-13	AGGACTGCCA	588	Z-18	AGGGTCTGTG
139	G-16	AGCGTCTTCC	289	O-05	CCCAGTCACT	439	T-14	AATGCCGAG	589	Z-19	GTGCGAGCAA
140	G-17	ACGACCGACA	290	O-06	CCACGGGAAG	440	T-15	GGATGCCACT	590	Z-20	ACTTTGGCGG
141	G-18	GGCTCATGTG	291	O-07	CAGCACTGAC	441	T-16	GGTGAACGCT	591	ME-01	GTTGGTGGCT
142	G-19	GTCAGGGCAA	292	O-08	CCTCCAGTGT	442	T-17	CCAACGTCGT	592	ME-02	ACAACGCCTC
143	G-20	TCTCCCTCAG	293	O-09	TCCCACGCAA	443	T-18	GATGCCAGAC	593	ME-03	GGGGATGAG
144	H-01	GGTCGGAGAA	294	O-10	TCAGAGCGCC	444	T-19	GTCCGTATGG	594	ME-04	GGCGTTGTC
145	H-02	TCGGACGTGA	295	O-11	GACAGGAGGT	445	T-20	GACCAATGCC	595	ME-05	GGGAACGTGT
146	H-03	AGACGTCCAC	296	O-12	CAGTGCTGTG	446	U-01	ACGGACGTCA	596	ME-06	CTGGGCAACT
147	H-04	GGAAGTCGCC	297	O-13	GTCAGAGTCC	447	U-02	CTG AGG TCT C	597	ME-07	CCGTGACTCA

148	H-05	AGTCGTCCCC	298	O-14	AGCATGGCTC	448	U-02	CTGAGGTCTC	598	ME-08	TCTGTTCCCC
149	H-06	ACGCATCGCA	299	O-15	TGGCGTCCTT	449	U-03	CTATGCCGAC	599	ME-09	GTCTTGCGGA
150	H-07	CTGCATCGTG	300	O-16	TCGGCGGTTT	450	U-04	ACCTTCGGAC	600	ME-10	TCTGGCGCAC

Tabela 18. Sekwencje starterów SRAP wykorzystane do poszukiwania markerów dla genów odporności na mączniaka prawdziwego w owsie zwyczajnym

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 z genem Pm4 i roślin wrażliwych uzyskano 7200 prążków RAPD, spośród nich jedynie 15% było polimorficznych. W wyniku reakcji ze starterami SRAP uzyskano 3800 produktów amplifikacji, spośród nich 930 było polimorficznych.

W wyniku przeprowadzonych reakcji amplifikacji z w populacji APR122 x Fuchs w obecności starterów RAPD uzyskano 4500 produktów, z których 1600 było polimorficznych w obrębie analizowanych próbek. W wyniku reakcji ze starterami SRAP uzyskano 4120 produktów, z których 980 było polimorficznych.

Mierniki dla tematu badawczego 4 (podać w tabeli)

Lp.	Miernik ⁵	Wartość miernika podana w opisie zadania	Wartość miernika zrealizowana
1	Liczba osobników wybranych do analiz molekularnych z każdej populacji	62	62
2	Liczba przetestowanych starterów RAPD dla populacji APR122 x Fuchs	400	400
3	Liczba przetestowanych starterów RAPD dla populacji AV1860 x Fuchs	600	600
4	Liczba przetestowanych kombinacji starterów SRAP dla każdej z analizowanych populacji	200	200

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

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

Cel tematu badawczego 5

Celem prac prowadzonych w ramach tematu 5 w 2017 roku było poszukiwanie markerów DArTseq różnicujących pule roślin odpornych i podatnych w populacji Av1860 x Fuchs

Materialy i metody

Przedmiotem badań realizowanych w 2017 roku były osobniki populacji AV1860 x Fuchs oraz formy rodzicielskie. Do analiz typu DArTseq przygotowano całą populację złożoną ze 158 osobników fenotypowanych na podstawie testów żywiciel-patogen. Izolację DNA z badanych mieszańców oraz form rodzicielskich przeprowadzono z wykorzystaniem komercyjnego zestawu kolumnkowego. Po izolacji oceniono jakość i ilość uzyskanego DNA oraz wykonano odpowiednie rozcieńczenia. Analizy DArTseq realizowano w Diversity Arrays Technology, University of Canberra w Australii wg opracowanej i opatentowanej metodyki. Uzyskane matryce markerów silicoDArT i SNP dla populacji AV1860 x Fuchs oraz matryca dla populacji APR122 x Fuchs uzyskana w 2016 roku przeanalizowano pod kątem wyboru markerów segregujących z genami odporności na mączniaka prawdziwego.

Wyniki

Analizom typu DArTseq poddano całą populację F2 Av1860 x Fuchs złożoną ze 157 osobników oraz formy rodzicielskie Av1860 z genem Pm4 oraz odmianę Fuchs wrażliwą na mączniaka prawdziwego. W wyniku genotypowania metoda DArTseq w analizowanej populacji zidentyfikowano 46 230 markerów silicoDArT, wśród których 10564 było polimorficznych dla analizowanej populacji. Wartość PIC uzyskanych markerów silicoDArT zawierała się w przedziale od 0.013 do 0.500, z średnio wynosiła 0.374. 236 markerów charakteryzowało się bardzo niską wartością PIC (mniej niż 0.05) co wskazuje na bardzo niski poziom polimorfizmu tych markerów. Wartość współczynnika CallRate zawierała się w przedziale od 79.2 do 100% ze średnią 92.2%. Analiza uzyskanych markerów pozwoliła na identyfikację 3382 markerów typu SNP. Średnia wartość PIC dla markerów SNP wynosiła 0,350, 283 markery wykazały bardzo niski poziom polimorfizmu i nie były brane pod uwagę w dalszych analizach.

Dane uzyskane w wyniku genotypowania populacji Av1860 x Fuchs połączone 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 265 było skorelowane z odpornością na mączniaka prawdziwego warunkowana genem Pm4. 13 markerów było specyficznych dla form wrażliwych, 252 dla form odpornych. Dokładna analiza pozwoliła na wytypowanie 126 markerów najsilniej skorelowanych z genem Pm4. W przypadku markerów SNP porównanie uzyskanych danych z fenotypami poszczególnych osobników w populacji pozwoliło na wytypowanie 34 markerów SNP sprzężonych z genem Pm4. Wszystkie wytypowane markery silicoDArT oraz SNP segregowały w analizowanej populacji zgodnie z modelem 3:1.

Sekwencje wytypowanych markerów silicoDArT oraz SNP porównano z sekwencjami umieszczonymi w bazie GeneBank. Jedna z wytypowanych sekwencji (22076756) wykazała duże podobieństwo do sekwencji genu Pm3 odporności na mączniaka prawdziwego u pszenicy. Dokładna analiza podobieństwa sekwencji i możliwości konwersji zidentyfikowanej sekwencji zostaną przeprowadzone w 2018 roku.

Sekwencje markerów silicoDArT oraz SNP zostały przeanalizowane pod kątem możliwości konwersji w marker specyficzne oparte o PCR. Analizie poddano długość sekwencji oraz możliwość zaprojektowania do nich specyficznych starterów. Wśród markerów silicoDArT wybrano 48, których długość sekwencji była większa niż 50 pz. Analiza sekwencji nukleotydów pozwoliła na wytypowanie 20 sekwencji odpowiednich do zaprojektowania starterów. Konwersja wytypowanych markerów silicoDArT w markery oparte o PCR zostanie przeprowadzona w 2018 roku (Tab. 19). Zidentyfikowane sekwencje zawierające SNP sprzężone z odpornością na mączniaka prawdziwego zostały przeanalizowane pod względem położenia SNP i możliwości amplifikacji zidentyfikowanej sekwencji. Do próby konwersji wybrano 20 sekwencji zawierających SNP, będą one przedmiotem analiz prowadzonych w 2018 roku

Tabela 19 markery silicoDArT i SNP sprzężone z genem Pm4 odporności na mączniaka prawdziwego

L.p.	Marker silicoDArT	Marker SNP
1	3278298	3281094 F 0-6:A>G-6:A>G
2	10575906	5445255 F 0-17:G>A-17:G>A
3	22075510	3454727 F 0-16:G>A-16:G>A
4	22075466	3454963 F 0-40:C>A-40:C>A
5	22075224	3279616 F 0-11:G>C-11:G>C
6	5420825	5435136 F 0-42:C>G-42:C>G
7	10585960	5437488 F 0-43:T>C-43:T>C
8	10576146	5446741 F 0-49:C>T-49:C>T

9	22075478	3457428 F 0-29:C>A-29:C>A
10	22075230	5441530 F 0-60:A>G-60:A>G
11	22075655	13750783 F 0-23:C>T-23:C>T
12	22075436	16620717 F 0-7:G>A-7:G>A
13	22076637	16621552 F 0-13:C>T-13:C>T
14	22075380	20626104 F 0-16:C>T-16:C>T
15	22075457	16624136 F 0-38:C>T-38:C>T
16	3455045	16624871 F 0-25:C>A-25:C>A
17	22076756	20591616 F 0-23:G>C-23:G>C
18	22075491	3455452 F 0-20:C>T-20:C>T
19	22075547	5438716 F 0-13:T>C-13:T>C
20	5425208	5446415 F 0-26:A>G-26:A>G

W wyniku genotypowania osobników populacji APR122 x Fuchs uzyskano 5660 polimorficznych markerów silicoDArT. Wartość PIC uzyskanych markerów zawierała się w przedziale od 0,022 do 0,500, z średnio wynosiła 0,371. Wartość współczynnika CallRate zawierała się w przedziale od 77,6 do 100% ze średnią 90,9%.

Analiza uzyskanych markerów pozwoliła na identyfikację 1 900 markerów typu SNP. Średnia wartość PIC dla markerów SNP wynosiła 0,327.

Dane uzyskane z genotypowania osobników populacji APR122 x Fuchs połączono z danymi uzyskanymi w testach żywiciel-patogen. Porównanie tych danych umożliwiło identyfikację markerów silicoDArT i SNP sprzężonych z odpornością na mączniaka prawdziwego warunkowana genem Pm7. Wyselekcjonowano 220 markerów silicoDArT oraz 22 markery typu SNP. Sekwencje markerów poddano analizie BLAST w celu wyszukania homologii i porównania z innymi gatunkami roślin.

Sekwencje markerów silicoDArT oraz SNP zostały przeanalizowane pod kątem możliwości konwersji w marker specyficzne oparte o PCR. Analizie poddano długość sekwencji oraz możliwość zaprojektowania do nich specyficznych starterów. Wśród markerów silicoDArT wybrano 76, których długość sekwencji była większa niż 50 pz, wśród nich wyselekcjonowano 15 sekwencji do których możliwe było zaprojektowanie specyficznych starterów. Konwersja wytypowanych markerów silicoDArT w markery oparte o PCR zostanie przeprowadzona w 2018 roku (Tab.20).

Zidentyfikowane sekwencje zawierające SNP sprzężone z odpornością na mączniaka prawdziwego zostały przeanalizowane pod względem położenia SNP i możliwości amplifikacji zidentyfikowanej sekwencji. Do próby konwersji wybrano 10 sekwencji zawierających SNP, będą one przedmiotem analiz prowadzonych w 2018 roku.

Tabela 20. Markery silicoDArT i SNP sprzężone z genem Pm7 odporności na mączniaka prawdziwego

L.p.	Marker silicoDArT	Marker SNP
------	-------------------	------------

1	22347044	22347125 F 0-31:C>T-31:C>T
2	22346947	5440608 F 0-19:C>T-19:C>T
3	5439380	16627151 F 0-35:G>C-35:G>C
4	22346863	10590367 F 0-53:A>T-53:A>T
5	22346771	13744419 F 0-41:G>A-41:G>A
6	5436920	13748963 F 0-5:A>G-5:A>G
7	22347068	20620879 F 0-29:G>A-29:G>A
8	22347118	20625360 F 0-10:T>C-10:T>C
9	22347012	22347224 F 0-53:C>G-53:C>G
10	20609062	22347284 F 0-5:G>A-5:G>A
11	20603737	
12	22346792	
13	5427224	
14	22347126	
15	22347122	

Mierniki dla tematu badawczego 5 (podać w tabeli)

Lp.	Miernik ⁶	Wartość miernika podana w opisie zadania	Wartość miernika zrealizowana
1	Liczba osobników poddanych analizie typu DArTseq z populacji Av1860 x Fuchs	160	160

3.6 Temat badawczy 6: Konwersja markerów losowych na markery specyficzne

Cel tematu badawczego 6

Celem prac prowadzonych w ramach tematu 6 w 2017 roku było poszukiwanie i weryfikacja losowych markerów RAPD sprzężonych z genem *Pm4* odporności na mączniaka prawdziwego w owsie.

Materiały i metody

Przedmiotem analiz prowadzonych w 2017 roku było 200 wzorów prążkowych uzyskanych w wyniku reakcji RAPD-PCR dla homozygotycznych osobników populacji Av1860 x Fuchs. Wzory prążkowe uzyskane w wyniku elektroforezy agarozowej przeanalizowano pod kątem identyfikacji takich produktów, które występowały jedynie u form odpornych lub jedynie u form wrażliwych. Do analizy wykorzystano program komputerowy CLIQS 1D PRO (<http://totallab.com/>). w 2017 roku analizie poddanych zostanie 200 wzorów prążkowych uzyskanych w wyniku reakcji RAPD-PCR dla populacji Av1860 x Fuchs.

Zidentyfikowane potencjalne markery sprzężone z genem *Pm4* odporności na mączniaka prawdziwego zweryfikowano w PCR, w którym matrycę stanowił DNA wyizolowany z

⁶ Podać miernik – np. ilość planowanych testów, prób, badanych genotypów etc.

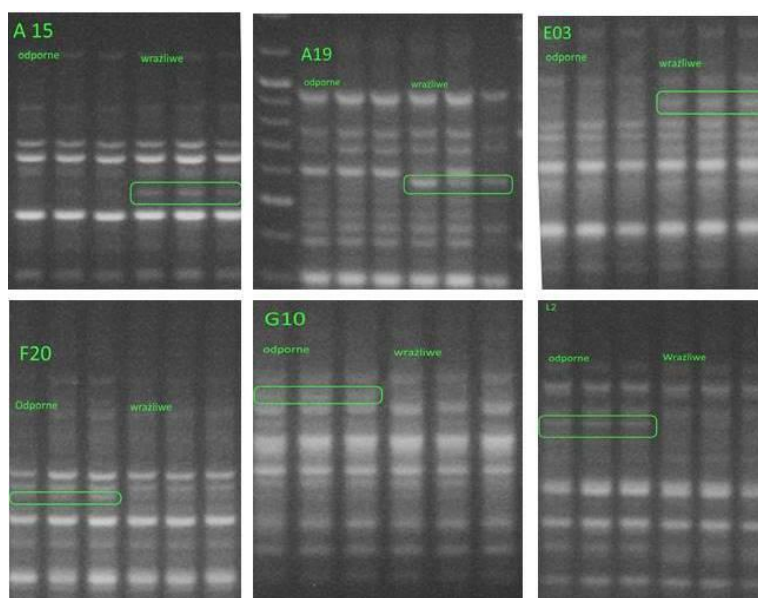
pojedynczych homozygotycznych roślin populacji F₂. Skład mieszaniny reakcyjnej był następujący: 1 Taq SILVER MIX LOAD, 5,3 pM startera, 1mM MgCl₂, 60 ng genomowego DNA. Reakcje amplifikacji przeprowadzono na termocyklerze Thermalcycler T1 Biometra z zastosowaniem następującego profilu termicznego: wstępna 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 rozdzielono na 1,5% żelu agarozowym zawierającym bromek etydyny. Jedynie te markery, których wzory prążkowe w pełni pokrywały się z cechą odporności wytypowano do konwersji w markery specyficzne typu STS.

Wyniki

Dokładna analiza wzorów prążkowych uzyskanych dla populacji Av1860 x Fuchs w wyniku reakcji RAPD-PCR pozwoliła na wytypowanie 6 markerów potencjalnie sprzężonych z genem Pm4 odporności na mączniaka prawdziwego w owsie. 3 z wyselekcjonowanych markerów było specyficzne dla pul roślin odpornych i linii Av1860 z genem Pm4, 3 kolejne było specyficzne dla pul roślin wrażliwych i wrażliwej odmiany Fuchs. (tab.21. Fot.1.).

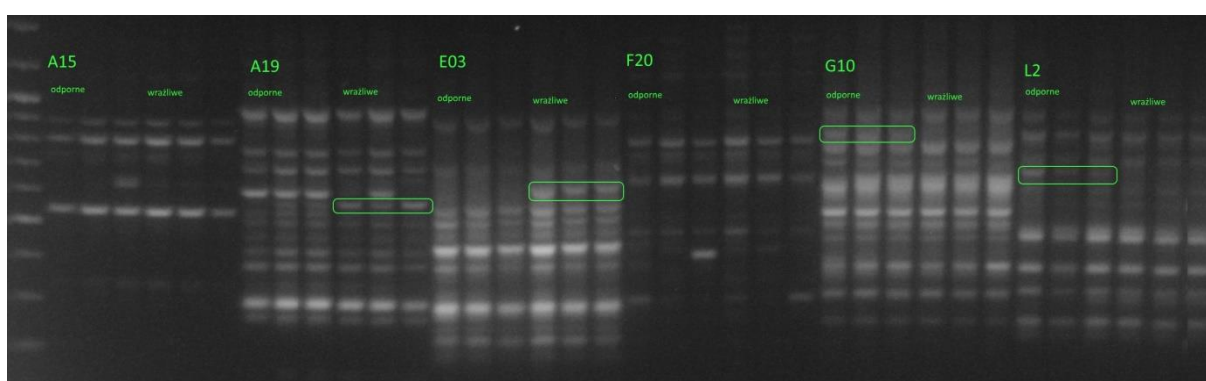
Tabela 21. Markery RAPD potencjalnie sprzężone z genem Pm4 odporności na mączniaka prawdziwego w owsie

Lp	Starter	wielkość produktu	Fenotyp
1	A15	600	W
2	A19	600	W
3	E03	600	W
4	F20	800	O
5	G10	800	O
6	L2	700	O



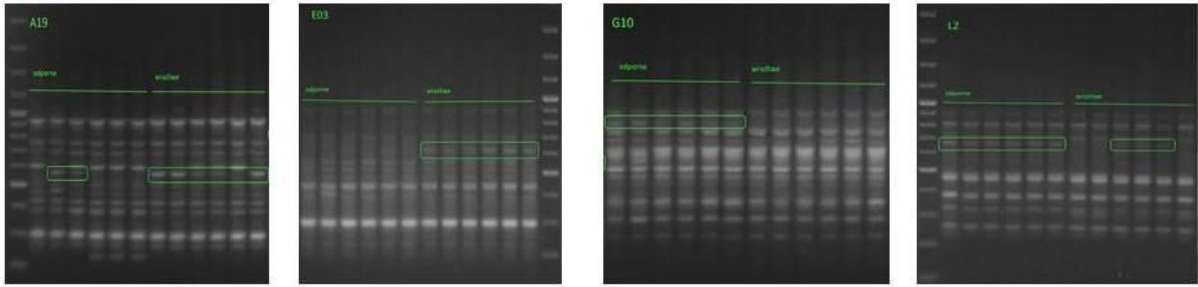
Fot.1. markery RAPD potencjalnie sprzężone z genem Pm4 wyselekcjonowane w 1 etapie analiz.

W celu weryfikacji powtarzalności uzyskanych wzorów prążkowych powtórzono reakcje, w której wykorzystano DNA pochodzące z pul roślin odpornych i wrażliwych na porażenie mączniakiem prawdziwym. W wyniku przeprowadzonych reakcji obecność produktów specyficznych dla pul roślin wrażliwych potwierdzono dla starterów A19 i E03. W reakcji ze starterem A15 uzyskano bardzo słabe produkty amplifikacji, starter wyłączono z dalszych analiz. Obecność produktów specyficznych dla pul roślin odpornych potwierdzono dla starterów G10 i L2. W wyniku reakcji ze starterem F20 nie uzyskano produktów różnicujących, starter wyłączono z dalszych analiz (Fot 2).



Fot. 2. Markery RAPD specyficzne dla pul roślin odpornych i wrażliwych po powtórzeniu na bulkach

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. W pierwszym etapie reakcje przeprowadzono dla 6 losowo wybranych homozygot odpornych i wrażliwych. Po włączeniu do reakcji startera A19 oczekiwany produkt obserwowano dla 5 homozygot wrażliwych i 2 odpornych. W wyniku reakcji ze starterem E03 oczekiwany produkt obserwowano u wszystkich homozygot wrażliwych. W wyniku reakcji ze starterem G10 oczekiwany produkt obecny był u wszystkich homozygot odpornych. Zaś w przypadku reakcji ze starterem L2 oczekiwany produkt obserwowano u wszystkich homozygot odpornych i u 3 wrażliwych (Fot.3). Na podstawie uzyskanych wzorów prążkowych do dalszych analiz związanych z konwersją markerów wybrano produkty amplifikowane w obecności starterów E03 i G10. W dalszym etapie sprzężenie markera zostanie ocenione na całej populacji Av1860 x Fuchs i wybrane zostaną produkty przeznaczone do konwersji w markery specyficzne.



Fot. 3 wzory prążkowe uzyskane dla wyselekcjonowanych starterów RAPD w reakcji, w której matryce stanowił DNA wyizolowany z homozygot odpornych i wrażliwych

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 ⁷	Liczba prezentacji podana w opisie zadania	Liczba prezentacji zrealizowana
1	Konferencja Naukowa NAUKA DLA HODOWLI I NASIENNICTWA ROŚLIN UPRAWNYCH. Zakopane 30.01.2017-03.02.2017	poster	1	1
Publikacje w monografiach/czasopismach recenzowanych				
Lp.	Monografia/Czasopismo	publikacja ⁸	Liczba publikacji podana w opisie zadania	Liczba publikacji zrealizowana
1	Virulence structure of the <i>Blumeria graminis</i> DC.f. sp. <i>avenae</i> populations occurring in Poland across 2010- 2013. <i>European Journal of Plant Pathology</i> 149:711–718	Publikacja oryginalna	1	1

Jeśli któryś z mierników nie został zrealizowany należy podać przyczyny.

Załączniki⁹:

- Ocena poziomu wirulencji populacji mączniaka prawdziwego (*Blumeria graminis* f. sp. *avenae*) na terenie Polski w latach 2014- 2015. Tomasz Ociepa, Sylwia Okoń, Aleksandra Nucia. NAUKA DLA HODOWLI I NASIENNICTWA ROŚLIN UPRAWNYCH. Zakopane 30.01.2017-03.02.2017 str 185-186. Prezentowane wyniki zostały uzyskane w 2016 roku w ramach tematu badawczego 1 (strony 6-8 w sprawozdaniu za 2016 rok)
- Virulence structure of the *Blumeria graminis* DC.f. sp. *avenae* populations occurring in Poland across 2010- 2013. Sylwia Okoń, Tomasz Ociepa. *European Journal of Plant Pathology* 149:711–718. Wyniki zostały uzyskane w 2016 roku w ramach tematu badawczego 1 (strony 6-8 w sprawozdaniu za 2016 rok)

5. Adres, pod którym wyniki badań są dostępne na stronie internetowej wnioskodawcy

<http://www.up.lublin.pl/badania-gen/>

⁷ Podać, czy chodzi o wykład plenarny, doniesienie konferencyjne czy poster.

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

⁹ Podać listę oraz dołączyć do sprawozdania kopie posterów/wyciągi z materiałów konferencyjnych/publikacje etc. W nawiasie podać, na której stronie sprawozdania znajdują się prezentowane wyniki.

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
Temat badawczy 1				
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	30	40	1,33
1.3	Liczba starterów RAPD użyta do analizy zróżnicowania genetycznego mączniaka prawdziwego	50	50	1,00
Temat badawczy 2				
2.1	Liczba przetestowanych populacji F ₂ (300osobników z każdej populacji)	2	2	1,00
2.2	Liczba izolatów mączniaka prawdziwego wybranych do oceny każdej z analizowanych populacji F ₂	3	3	1,00
Temat badawczy 3				
3.1	Liczba wykonanych kombinacji krzyżówkowych	100	100	1,00
Temat badawczy 4				
4.1	Liczba osobników wybranych do analiz molekularnych z każdej populacji	62	62	1,00
4.2	Liczba przetestowanych starterów RAPD dla populacji APR122 x Fuchs	400	400	1,00
4.3	Liczba przetestowanych starterów RAPD dla populacji AV1860 x Fuchs	600	600	1,00
4.4	Liczba przetestowanych kombinacji starterów SRAP dla każdej z analizowanych populacji	200	200	1,00
Temat badawczy 5				
5.1	Liczba osobników poddanych analizie typu DArTseq z populacji Av1860 x Fuchs	160	160	1,00
Temat badawczy 6				
6.1	Liczba przeanalizowanych wzorów prążkowych dla populacji Av1860 x Fuchs	200	200	1,00
			średnia	1,02
			% realizacji zadania	102%

Sporządzono: 11.01.2018 r.

Pieczęć jednostki

Osoba reprezentująca jednostkę

Kierownik zadania

data

podpis i pieczęć

podpis