*Nr zadania*

*31*

**SPRAWOZDANIE MERYTORYCZNE**

**z realizacji zadania na rzecz postępu biologicznego w produkcji roślinnej w 2016 roku**

**A. INFORMACJE OGÓLNE**

|  |
| --- |
| Tytuł zadania **Piramidyzacja genów odporności na rdzę koronową w genomie owsa oraz identyfikacja i lokalizacja markerów DNA dla tych genów** |
| Numer zadania *(w załączniku nr 8 do rozporządzenia Ministra Rolnictwa i Rozwoju Wsi z dnia 29 lipca 2015 r. w sprawie stawek dotacji przedmiotowych dla różnych podmiotów wykonujących zadania na rzecz rolnictwa (Dz. U. z 14 sierpnia 2015 r. poz. 1170))* **31** |
| Planowany okres realizacji zadania **12 miesięcy** |
| Planowane nakłady w zł **80 000** |
|

**B. DANE WNIOSKODAWCY**

|  |
| --- |
| Imię i nazwisko osoby reprezentującej jednostkę badawczą, tytuł lub stopień naukowy, stanowisko, nazwa i adres jednostki badawczej, telefon, fax)**Zbigniew Grądzki, Prof. dr hab., Prorektor ds. Nauki, Wdrożeń i Współpracy Międzynarodowej****Uniwersytet Przyrodniczy w Lublinie** **ul. Akademicka 13, 20-950 Lublin****Telefon: 81-445-60-66; Fax: 81-533-35-49, e-mail: biuro.rektora@up.lublin.pl** |

**C. INFORMACJA O WYKONAWCACH**

1. Zespół badawczy

|  |
| --- |
| kierownik zadania |
| imię i nazwisko | stopień i tytuł naukowy | miejsce zatrudnienia |
| **Edyta Paczos-Grzęda** | dr | **Uniwersytet Przyrodniczy w Lublinie****Instytut Genetyki, Hodowli i Biotechnologii Roślin** |
| wykonawcy zadania |
| imię i nazwisko | stopień i tytuł naukowy | miejsce zatrudnienia |
| **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 Kuzdraliński** | **dr inż.** | **Uniwersytet Przyrodniczy w Lublinie, Katedra Biotechnologii, Żywienia 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 /częściowo1) |
| 1 | Określenie patogeniczności izolatów *Puccinia coronata* skolekcjonowanych w roku 2015 w różnych obszarach kraju. | TAK |
| 2 | Wyprowadzenie izolatów z populacji rdzy koronowej skolekcjonowanych w roku 2016. | TAK |
| 3 | Identyfikacja markerów dla genu odporności *Pc*39 metodą SRAP. | TAK |
| 4 | Identyfikacja markerów dla genu *Pc*52 metodą DArTseq. | TAK |
| 5 | Próba konwersji na markery specyficzne sekwencji DArT sprzężonych z obecnością genu *Pc*39. | TAK |

2. Harmonogram realizacji zadania

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

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

|  |  |  |  |
| --- | --- | --- | --- |
| Lp. | **Nazwa tematu badawczego**  | Termin rozpoczęcia – zakończenia realizacji tematu badawczego w miesiącach od rozpoczęcia realizacji zadania | Przewidywane koszty realizacji tematubadawczego |
| 1 | Określenie spectrum patogeniczności izolatów *Puccinia coronata*. (obejmuje tematy badawcze 1 i 2 planu wieloletniego) | 1-12 | 14000 |
| 2 | Ocena segregacji genów odporności w populacjach mapujących F2 i F3. | 4-12 | 12000 |
| 3 | Piramidyzacja genów poprzez krzyżowanie form posiadających zdefiniowane geny odporności. | 4-9 | 11000 |
| 4 | Genotypowanie z wykorzystaniem metody SRAP. (obejmuje tematy badawcze 5 i 6 planu wieloletniego) | 1-10 | 22 000 |
| 5 | Genotypowanie populacji mapujących z wykorzystaniem całogenomowych analiz polimorfizmu. | 7-12 | 21000 |
| Razem | **80000** |

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

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

# 3. 1. Określenie spectrum patogeniczności izolatów *Puccinia coronata*.

### Cel tematu badawczego 1

* Utrzymanie kolekcji 45 linii izogenicznych dla genów odporności na rdzę koronową owsa.
* Określenie patogeniczności 40 izolatów *Puccinia coronata* wyprowadzonych z populacji skolekcjonowanych w roku 2015 w Czesławicach, Kopaszewie, Polanowicach i Strzelcach względem 45 linii referencyjnych
* Określenie patogeniczności 14 izolatów *Puccinia coronata* wyprowadzonych z populacji skolekcjonowanych w roku 2014 w różnych obszarach kraju względem 60 polskich odmian owsa zwyczajnego
* Ocena porażenia linii referencyjnych posiadających zdefiniowane geny odporności w warunkach naturalnej infekcji polowej.
* Poszerzanie kolekcji izolatów *Puccinia coronata*.

#### Materiały i metody

Rozmnożeniu w warunkach polowych, z zachowaniem izolacji, zostało poddanych 45 linii referencyjnych (Tab.1). Po 10 ziarniaków z każdej linii wysiano w rzędach długości 1m. W okresie poprzedzającym pylenie roślin na pojedyncze wiechy (3-5) nałożono izolatory z tomofanu. Po osiągnięciu pełnej dojrzałości wiechy omłócono (z każdego izolatora osobno). Uzyskane ziarniaki poszczególnych linii referencyjnych wykorzystano do określania patogeniczności testowanych izolatów.

W celu określenia patogeniczności:

- 40 izolatów *Puccinia coronata*, wyprowadzonych z populacji skolekcjonowanych w roku 2015 w Czesławicach, Kopaszewie, Polanowicach i Strzelcach względem 45 linii kontrolnych o zdefiniowanych genach odporności

- 14 izolatów *Puccinia coronata* skolekcjonowanych w roku 2014 względem 60 polskich odmian owsa zwyczajnego

na pierwszych liściach 10-dniowych siewek przeprowadzono testy żywiciel-patogen. Ziarniaki testowanych linii i odmian wysiano na paletach w fitotronie. Fragmenty liści 10-dniowych siewek wyłożono na szalki Petriego wypełnione do połowy 0,6% roztworem agaru z benzymidazolem (35 mg•dm-3). Każda z linii została przetestowana w trzykrotnym powtórzeniu. Na każdą szalkę zostały również wyłożone fragmenty liści formy kontrolnej: cv. Kasztan – forma podatna na porażenie wszystkimi testowanymi izolatami rdzy koronowej. Szalki z fragmentami liści inokulowano w wieży inokulacyjnej ok. 500-700 zarodnikami rdzy koronowej na 1 cm2. Następnie szalki umieszczono w fitotronie, w temperaturze ok. 18°C przy natężeniu światła ok. 4 kLx i wilgotności powietrza wynoszącej 70%. Po dziesięciu dniach od inokulacji określono porażenie liści w skali 5° wg Murphy (1935), gdzie 0 oznaczało brak kolonii z występującymi zmianami nekrotycznymi i chlorotycznymi, 1 - małe kolonie otoczone zmianami nekrotycznymi i chlorotycznymi, 2 – małe i średnie kolonie otoczone zmianami chlorotycznymi, 3 – średnie kolonie ze zmianami chlorotycznymi, 4 – duże kolonie bez zmian nekrotycznych i chlorotycznych.

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.

Siew wykonano na przełomie marca i kwietnia. Na poletka o długości 1m i szerokości 0,6 metra, wysiano po 50 ziarniaków każdej linii. Rozstaw rzędów wynosił 20 cm. W początkowym okresie wegetacji przeprowadzono oprysk pielęgnacyjny herbicydem, a w fazie strzelania w źdźbło - oprysk insektycydem. Ocenę porażenia przez rdzę koronową w warunkach naturalnej infekcji polowej przeprowadzono dwukrotnie w trakcie wegetacji. 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 Czesławicach, Polanowicach, Kopaszewie i Strzelcach z 10 losowo wybranych poletek zebrano populacje *Puccinia coronata*. W trakcie czterokrotnych pasaży pojedynczych kolonii grzybawyprowadzono po 10 izolatów *Puccinia coronata* z każdej lokalizacji. Wyprowadzanie izolatów polegało na zakażeniu wyłożonych na szalkę Petriego wypełnioną do połowy 0,6% roztworem agaru z benzymidazolem (35 mg•dm-3) liści odmiany ‘Kasztan’ zarodnikami pobranymi sterylną szklaną pipetką z pojedynczej kolonii grzyba. Czterokrotne rozmnożenie grzyba z pojedynczej kolonii gwarantowało jednorodność uzyskanego izolatu. Utrzymanie izolatu wymagało przeszczepiania izolatu na kolejne świeże liście rośliny żywicielskiej co 10 dni. W kolejnym roku badań uzyskane izolaty zostały ocenione pod względem spektrum patogeniczności.

1. Testowane linie owsa zawierające geny odporności na rdzę koronową.

| **Gen** | **Źródło genu** | **Linia** |
| --- | --- | --- |
| *Pc*14 | A. byzantina Ascencao |   |
| *Pc*35 | *A. sterilis* D-137 |   |
| *Pc*36 | *A. sterilis* CI 8081 |   |
| *Pc*38 | *A. sterilis* CW491-4 | Pendek × *Pc*38 |
| *Pc*39Kan | *A. sterilis* F-366 | Pendek × *Pc*39 |
| *Pc*39USA | *A. sterilis* F-366 |   |
| *Pc*40 Kan | *A. sterilis* F-83 | - |
| *Pc*40 USA | *A. sterilis* F-83 | Pendek × *Pc*40 |
| *Pc*45 | *A. sterilis* F-169 | Pendek × *Pc*45 |
| *Pc*46Kan | *A. sterilis* F-290 | Pendek × *Pc*46 |
| *Pc*46USA | *A. sterilis* F-290 | - |
| *Pc*48 Kan | *A. sterilis* F-158 | Pendek × *Pc*48 |
| *Pc*48USA | *A. sterilis* F-158 | - |
| *Pc*50Kan | *A. sterilis* CW-486 |   |
| *Pc*50USA | *A. sterilis* CW-486 |   |
| *Pc*51Kan | *A. sterilis* Wahl No. 8 |   |
| *Pc*51USA | *A. sterilis* Wahl No. 8 | Iowa isolines X270 & X434 |
| *Pc*52 | *A. sterilis* Wahl No. 2 | Iowa isoline X421 |
| *Pc*53 | *A. sterilis* 6-112-1-15 |   |
| *Pc*54 | *A. sterilis* CAV 1832 | Pendek × *Pc*54 |
| *Pc*55 | *A. sterilis* CAV 4963 | Pendek × *Pc*55 |
| *Pc*56 | *A. sterilis* CAV 1964 | Pendek × *Pc*56 |
| *Pc*57 | *A. sterilis* CI 8295 |   |
| *Pc*58 Kan | *A. sterilis* PI 295919 | - |
| *Pc*58 USA | *A. sterilis* PI 295919 | TAM-O-301 |
| *Pc*59Kan | *A. sterilis* PI 296244 | - |
| *Pc*59USA | *A. sterilis* PI 296244 | TAM-O-312 |
| *Pc*60 | *A. sterilis* PI 287211 | Coker 227 |
| *Pc*61USA | *A. sterilis* PI 287211 | Coker 234  |
| *Pc*62 | *A. sterilis* CAV 4274 | Fraser *Pc*62 |
| *Pc*63USA | *A. sterilis* CAV 4540 |   |
| *Pc*64 | *A. sterilis* CAV 4248 | Makuru//Sun II *Pc*64 |
| *Pc*68 | *A. sterilis* CAV 4904 | Makuru//Sun II *Pc*68 |
| *Pc*70 | *A. sterilis* PI318282 |   |
| *Pc*71 | *A. sterilis* IA B437 |   |
| *Pc*91 | *A. magna* | *A. magna x A.longiglumis* |
| *Pc*94 Kan | *A. strigosa* RL1697 |   |
| *Pc*94USA | *A. strigosa* RL1697 |  |
| *Pc*96Kan | *A. sativa* MG 85039 |  |
| *Pc*96USA | *A. sativa* MG 85039 |   |
| *Pc*97Kan | *A sterilis* CAV 1180 |   |
| *Pc*98Kan | *A sterilis* CAV 1979 |   |
| *Pc*101Kan | - |   |
| *Pc*103-1Kan | - |   |
| *Pc*104Kan | - |   |

#### Wyniki

W celu zobrazowania wirulencji populacji rdzy koronowej występującej w 2015 roku na terenie Polski materiał do badań pobierano z miejsc hodowli owsa, gdzie spodziewano się największej presji selekcyjnej na populację patogenu. Wyniki porażenia 45 linii referencyjnych z genami *Pc* przez izolaty wyprowadzone z populacji zebranych w Czesławicach, Kopaszewie, Polanowicach i Strzelcach przedstawiono za pomocą wartości procentowych (Tab.2). Izolaty wyprowadzone z populacji grzyba zebranej w Strzelcach wykazały całkowitą awirulencję względem największej liczby linii z genami *Pc* (17 linii)*,* populacja *P. coronata* z Kopaszewa była awirulentna wobec 16 testowanych linii, natomiast największą zmiennością charakteryzowały się populacje patogenu skolekcjonowane w Polanowicach i Czesławicach, gdzie odpowiednio 10 i 5 genów *Pc* pozostawało w pełni efektywnych względem izolatów zbieranych w tych miejscowościach

Wśród testowanych 45 linii referencyjnych z genami odporności (*Pc*) w stadium siewki najsilniej porażona była linia z genem *Pc*38*,* względem której wirulencję wykazało 100% izolatów z Kopaszewa i Strzelec (Wyk.2). Bardzo niskim poziomem odporności wykazały się również linie z genami *Pc*35*, Pc*40USA, *Pc*56*, Pc*62*, Pc*64 *Pc*97 Kan oraz *Pc*103-1Kan, których odporność przełamana została przez ponad 36% izolatów zbieranych w każdej z lokalizacji. Odporności warunkowanej genami *Pc*39USA, *Pc*39 Kan,  *Pc*51Kan, *Pc*55 i *Pc*61USA nie przełamał żaden z izolatów wyprowadzonych z populacji zebranej w Strzelcach, natomiast geny *Pc*36*,* *Pc*50 USA i *Pc*50Kan nadawały odporność względem wszystkich izolatów z Kopaszewa, a *Pc*52pozostał w pełni odporny tylko w Czesławicach. Geny *Pc*70*,* *Pc*98 Kan, *Pc*101 Kan oraz *Pc*104 Kan były efektywne wobec izolatów zbieranych w 2 lokalizacjach, z kolei geny *Pc*51USA, *Pc*71*, Pc*57*, Pc*68 i *Pc*60 były sporadycznie przełamywane tylko przez izolaty pochodzące z Czesławic. Pełną odporność w stadium siewki wykazały geny *Pc*53*, Pc*59Kan*, Pc*59 USA oraz *Pc*91, które nie zostały porażone przez żaden z testowanych izolatów.

 60 polskich odmian owsa zwyczajnego w stadium siewki oceniono z wykorzystaniem testów żywiciel-patogen. Odmiany te porażano 14 izolatami o zdefiniowanych profilach wirulencji zbieranymi w różnych miejscach Polski.

Spośród testowanych genotypów najwyższym poziomem odporności charakteryzowała się odmiana ‘Celer’, którą poraziło 5 z 14 izolatów *P. coronata.* Oprócz tego reakcją odporności na przynajmniej jeden izolat odpowiedziały 23 przetestowane odmiany, w tym ‘Borowiak’, ‘Nawigator’, ‘Sławko’ i ‘Sprinter’ były porażone przez 6 izolatów, natomiast ‘Arden’, ‘Bohun’, ‘Grajcar’, ‘Koneser’ i ‘Magda’ poraziło 7 izolatów rdzy koronowej. Odporność 6 z 60 testowanych odmian: ‘Chwat’, ‘Haker’, ‘Krezus’, ‘Pascal’ i ‘Skrzat’ została przełamana przez 8 izolatów, a odmianę ‘Stoper’ poraziło 9 izolatów *P. coronata.* Z kolei odmiany ‘Cacko’ i ‘Deresz’ były odporne na 2 izolaty, natomiast ‘Bajka’, ‘Furman’, ‘Rajtar’, ‘Szakal’ i ‘Zuch’, na 1 z 14 izolatów rdzy koronowej wykorzystanych w testach żywiciel-patogen.

W celu oceny porażenia linii referencyjnych z genami *Pc* w warunkach naturalnej infekcji polowej założono doświadczenia polowe w czterech lokalizacjach: Czesławicach, Strzelcach, Kopaszewie i Polanowicach. Ze względu na panującą w sezonie 2016 suszę rdza koronowa pojawiła się na roślinach pod koniec okresu wegetacyjnego roślin, co więcej, objawy tej choroby poprzedziło pojawienie się rdzy źdźbłowej, która stanowiła silną konkurencję dla tego patogenu, stąd na liniach wczesnych zaobserwowanie porażenia rdzą koronową nie było możliwe.

Ocenę porażenia przez rdzę koronową w warunkach naturalnej infekcji polowej przeprowadzono dwukrotnie w trakcie wegetacji. Spośród wszystkich odczytów zanotowano najwyższy stopień porażenia badanych linii owsa zwyczajnego. Typ infekcji „0” oznaczający całkowitą odporność i „1”- sporadyczne, pojedyncze kolonie oceniano jako odporność linii *Pc*.

Porażenie grzybem *P. coronata* we wszystkich czterech lokalizacjach wystąpiło z różnym nasileniem. Największe obserwowano w Czesławicach i Kopaszewie, gdzie porażonych było 21 spośród wszystkich testowanych linii referencyjnych, mniejsze w Polanowicach, gdzie przełamanych zostało 7 genów odporności, zaś najmniejsze w Strzelcach, gdzie porażeniu uległo 6 linii z różnymi genami *Pc* (Tab.5, Wyk.3)*.*

#### Mierniki dla tematu badawczego 1

|  |  |  |  |
| --- | --- | --- | --- |
| Lp. | miernik | wartość miernika podana w opisie zadania | wartość miernika zrealizowana |
| 1. | Liczba izolatów analizowanych pod kątem patogeniczności względem 45 linii referencyjnych. | 40 | 40 |
| 2. | Liczba izolatów analizowanych pod kątem patogeniczności względem 60 odmian. | 14 | 14 |
| 3. | Liczba linii referencyjnych ocenianych w warunkach naturalnej infekcji polowej w czterech lokalizacjach. | 45 | 45 |
| 4. | Liczba populacji, z których zostaną wyprowadzone nowe izolaty. | 4 | 4 |

# 3. 2. Ocena segregacji genów odporności w populacjach mapujących

### Cel tematu badawczego 2

* Fenotypowanie mieszańców F1 uzyskanych w roku poprzednim
* Ocena segregacji genów odporności w populacji mapującej F3 E552 (Bingo × *Pc*52) na podstawie testów żywiciel-patogen w warunkach laboratoryjnych i w warunkach naturalnej infekcji.
* Ocena segregacji genów odporności w 4 populacjach mieszańców F2.

#### Materiały i metody

Wszystkie formy przeznaczone do fenotypowania lub obserwacji wysiano na poletkach Gospodarstwa Doświadczalnego UP w Lublinie, w Czesławicach koło Nałęczowa.

Ziarniaki F1 reprezentujące 11 kombinacji mieszańcowych dla genów *Pc*51, *Pc*53, *Pc*57, *Pc*58, *Pc*70, *Pc*71, *Pc*97, *Pc*101, *Pc*103, *Pc*104, uzyskanych w roku poprzednim wysiano w celu uzyskania pokolenia F2. Wysiewane były po 2 ziarniaki z kombinacji, ewentualnie 1 jeśli w roku poprzednim nie uzyskano wystarczającej ilości nasion. 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 kłosków, liczba i masa ziarniaków z wiechy oraz masa ziarniaków z rośliny.

220 linii pokolenia F3 reprezentujących kombinację mieszańcową Bingo × *Pc*52 przeznaczonych do oceny segregacji genu odporności *Pc*52 wysiano na paletach w fitotronie. Z każdej linii F3 testowi żywiciel-patogen poddano min. 10 roślin w stadium 10-dniowej siewki. Metodyka i ocena testów zgodna z przedstawioną w temacie badawczym 1. Testy odporności wykonano dla 3 izolatów, które charakteryzują się zjadliwością w stosunku do odmiany ‘Bingo’, a nie przełamują odporności warunkowanej genem *Pc*52.

Ziarniaki wszystkich 220 linii F3 populacji Bingo × *Pc*52 zostały również wysiane na poletkach Gospodarstwa Doświadczalnego UP w Lublinie, w Czesławicach koło Nałęczowa. Z każdej linii wysiano 25 ziarniaków w rzędzie o długości 1m. W stadium rośliny dorosłej linie poddano ocenie odporności w warunkach naturalnej infekcji polowej.

Obecność lub brak infekcji stwierdzono poprzez dokonanie wizualnej oceny liści roślin na poletku reprezentującym pojedynczą linię w celu wytypowania linii homozygotycznych - odpornych (AA) i porażonych (aa). Określenie fenotypu linii F3 pozwoliło na określenie genotypu roślin F2, co pozwoliło na opracowanie markerów genetycznych dla tego genu.

Ziarniaki 4populacji mapujących F2uzyskanych w wyniku krzyżowania przeprowadzonego w roku 2014:

|  |  |
| --- | --- |
| Numer kombinacji | Pochodzenie |
| E635 | *Pc*51U × Kasztan |
| E640 | *Pc*52 × Kasztan |
| E656 | *Pc*59U × Kasztan |
| E660  | *Pc*60 × Kasztan |

poddano rozmnożeniu i jednokrotnej ocenie rozszczepień odporności na rdzę koronową w warunkach naturalnej infekcji w doświadczeniu polowym założonym w GD UP w Czesławicach. Liczebność każdej z populacji wyniosła ok. 120 osobników. W fazie dojrzałości pełnej ze wszystkich roślin zebrano ziarniaki reprezentujące pokolenie F3.

#### Wyniki

Mieszańce F1 reprezentujące 11 kombinacji poddano ocenie fenotypowej (Tab.6.). Wartość poszczególnych cech, w zależności od kombinacji, charakteryzowała się dużą zmiennością (Tab.6).

1. Ocena fenotypowa mieszańców reprezentujących 11 kombinacji krzyżówkowych form z genami *Pc51, Pc53, Pc57, Pc58, Pc70, Pc71, Pc101, Pc103* i *Pc104*.

| **Nr kombinacji** | **Forma mateczna** | **Forma ojcowska** | **Nr rośliny** | **Wysokość** | **Liczba pędów produkcyjnych** | **Liczba niedogonów** | **Długość wiechy** | **Liczba kłosków** | **Liczba ziarniaków** | **Masa ziarniaków** | **MTZ [g]** |
| --- | --- | --- | --- | --- | --- | --- | --- | --- | --- | --- | --- |
| 854 | S17 7A | Pc51U 1A | 1 | 96 | 3 | 2 | 18 | 30 | 63 | 2,37 | 37,62 |
| 855 | S17 2C | Pc53 3A | 1 | 107 | 3 | 8 | 18 | 25 | 59 | 2,08 | 35,25 |
| 857 | S17 2B | Pc57 1A | 1 | 97 | 3 | 7 | 18 | 33 | 62 | 2,71 | 43,71 |
| 857 | S17 2B | Pc57 1A | 2 | 95 | 4 | 2 | 19 | 30 | 74 | 2,90 | 39,19 |
| 859 | S17 1B | Pc58U 1A | 1 | 100 | 4 | 5 | 19 | 22 | 60 | 2,62 | 43,67 |
| 859 | S17 1B | Pc58U 1A | 2 | 102 | 4 | 4 | 20 | 38 | 90 | 3,51 | 39,00 |
| 842 | Pc70 2A | S17 6D | 1 | 115 | 6 | 7 | 16 | 26 | 73 | 2,44 | 33,42 |
| 842 | Pc70 2A | S17 6D | 2 | 115 | 5 | 5 | 20 | 36 | 86 | 2,63 | 30,58 |
| 846 | S1 1B | Pc70 5B | 1 | 91 | 5 | 7 | 18 | 44 | 85 | 3,72 | 43,76 |
| 861 | S17 1B | Pc70 5B | 1 | 123 | 5 | 6 | 20 | 16 | 42 | 1,75 | 41,67 |
| 861 | S17 1B | Pc70 5B | 2 | 129 | 5 | 5 | 21 | 40 | 94 | 3,22 | 34,26 |
| 845 | Pc71 3B | S17 1D | 1 | 95 | 5 | 2 | 17 | 30 | 63 | 2,48 | 39,37 |
| 845 | Pc71 3B | S17 1D | 2 | 91 | 4 | 5 | 17 | 28 | 62 | 2,64 | 42,58 |
| 850 | S17 5A | Pc101 1A | 1 | 105 | 4 | 1 | 17 | 12 | 42 | 1,63 | 38,81 |
| 850 | S17 5A | Pc101 1A | 2 | 110 | 3 | 6 | 18 | 21 | 58 | 2,08 | 35,86 |
| 852 | S17 6B | Pc103 1A | 1 | 113 | 6 | 8 | 22 | 28 | 56 | 2,04 | 36,43 |
| 852 | S17 6B | Pc103 1A | 2 | 112 | 4 | 6 | 19 | 25 | 31 | 1,08 | 34,84 |
| 849 | S17 6A | 104 1A | 1 | 98 | 4 | 5 | 18 | 36 | 64 | 3,73 | 58,28 |

Dla kombinacji mieszańcowej z genem *Pc97* wysiano 1 ziarniak uzyskany w poprzednim roku. Prawdopodobnie słaba kondycja ziarniaka uniemożliwiła wykiełkowanie rośliny, dlatego ocena fenotypowa tego mieszańca była niemożliwa.

220 linii pokolenia F3 reprezentujących kombinację mieszańcową Bingo × *Pc52* przeznaczonych do oceny segregacji genu odporności *Pc52* wysiano na paletach w fitotronie. Z każdej linii F3 testowi żywiciel-patogen poddano min. 10 roślin. Testy odporności wykonano dla 3 izolatów: 3.2, 94.2/3 oraz 230, które charakteryzowały się zjadliwością w stosunku do odmiany ‘Bingo’, a nie przełamywały odporności warunkowanej genem *Pc52*. Ocenę prowadzono osobno dla każdego liścia z danej linii F3 dla każdego z izolatów (Tab. 7). Następnie profil porażenia linii sprowadzono do formy graficznej: kolorem żółtym zaznaczono rośliny F2, które w pokoleniu F3 segregowały, a więc były heterozygotyczne, kolorem zielonym – homozygoty odporne, zaś czerwonym – homozygoty porażone.

Linie F3 poddano również ocenie odporności w warunkach polowych. Z uwagi na bardzo ograniczone porażenie w warunkach naturalnej infekcji, które objęło swoim zasięgiem tylko część badanej populacji oraz po stwierdzeniu, że dominujący w 2016 roku w populacji rdzy koronowej w Czesławicach izolat nie oddziaływał na analizowany gen główny *Pc*52 wyników porażenia linii F3 nie łączono z wynikami uzyskanymi w stadium siewki.

Rośliny pokolenia F24populacji mapujących E635, E640, E656 oraz E660 uzyskanych w wyniku krzyżowania przeprowadzonego w roku 2014 poddano próbie oceny rozszczepień odporności na rdzę koronową w warunkach naturalnej infekcji w doświadczeniu polowym założonym w GD UP w Czesławicach. Ze względu na panującą w sezonie 2016 suszę, rdza koronowa pojawiła się na roślinach pod koniec okresu wegetacyjnego owsa, co więcej, objawy tej choroby poprzedziło pojawienie się rdzy źdźbłowej, która stanowiła silną konkurencję dla tego patogenu, stąd zaobserwowanie porażenia grzybem *P. coronata* nie było możliwe.

W fazie dojrzałości pełnej ze wszystkich roślin zebrano ziarniaki reprezentujące pokolenie F3, które przeznaczone będą do dalszych badań.

#### Mierniki dla tematu badawczego 2

|  |  |  |  |
| --- | --- | --- | --- |
| Lp. | miernik | wartość miernika podana w opisie zadania | wartość miernika zrealizowana |
| 1. | Liczba fenotypowanych kombinacji mieszańcowych F1 | 11 | 11 |
| 2. | Liczba linii F3 ocenianych pod względem odporności na rdzę w warunkach laboratoryjnych. | 220 | 220 |
| 3. | Liczba linii F3 ocenianych pod względem odporności na rdzę w warunkach naturalnej infekcji polowej. | 220 | 220 |
| 4. | Liczba populacji mapujących F2 poddanych rozmnożeniu i wstępnej ocenie rozszczepień w warunkach polowych. | 4 | 4 |

# 3. 3. Piramidyzacja genów poprzez krzyżowanie form posiadających zdefiniowane geny odporności .

### Cel tematu badawczego 3

* Przeprowadzenie krzyżowań mających na celu uzyskanie mieszańców pomiędzy formami ze zdefiniowanymi genami odporności

#### Materiały i metody

Wszystkie formy przeznaczone do krzyżowań wysiano na poletkach Gospodarstwa Doświadczalnego Uniwersytetu Przyrodniczego w Lublinie, w Czesławicach koło Nałęczowa. Krzyżowania prowadzono w celu uzyskania mieszańców pomiędzy roślinami reprezentującymi:

5 homozygotycznych, odpornych linii F5 populacji Celer (*Pc*39) × STH 9210

5 homozygotycznych, odpornych linii F3 populacji Bingo × *Pc*52

Przeprowadzono również krzyżowania pomiędzy odmianą Celer, a 4 liniami referencyjnymi z wysoce efektywnymi genami odporności wybranymi w oparciu o wyniki uzyskane w temacie 4.1.

Kastrowanie roślin rozpoczęło się na początku fazy kwitnienia. W wiechach form matecznych kastrowano kilkanaście szczytowych kłosków, fragmenty wiech zaizolowano izolatorami z tomofanu do czasu zapylenia. Po 3-4 dniach od usunięcia pylników na dojrzałe znamiona naniesiono pyłek z pylników zebranych wcześniej z roślin ojcowskich. Izolatory pozostały na roślinach aż do zbioru, który miał miejsce po osiągnięciu dojrzałości woskowej. Na podstawie liczby wykastrowanych kwiatków oraz liczby zawiązanych ziarniaków została określona efektywność krzyżowania.

#### Wyniki

Krzyżowania prowadzono w celu uzyskania ziarniaków F1 kombinacji mieszańcowych, w których jednym z komponentów rodzicielskich była homozygotyczna, odporna linia F5 populacji E310 Celer (*Pc*39) × STH 9210, a drugim, homozygotyczna, odporna linia F3 populacji 552 Bingo × *Pc*52. W sumie wykastrowano i zapylono 567 kwiatków w 52 wiechach i otrzymano 23 ziarniaki. Ilość wykształconych ziarniaków wahała się od 1 do 5.

W przypadku krzyżowań, gdy formą mateczną była roślina populacji E310 uzyskano tylko jeden ziarniak, natomiast, gdy formę mateczną stanowiła roślina populacji 552, efektywność wynosiła ok 7% (Tab.8.).

1. Opracowanie statystyczne prowadzonych krzyżowań.

| **Forma mateczna** | **Nr rośliny** | **Forma ojcowska** | **Nr rośliny** | **Liczba wykastro-wanych kwiatków** | **Liczba zawiązanych ziarniaków** | **Efektywność krzyżowania** |
| --- | --- | --- | --- | --- | --- | --- |
| E310/798 | 2 | 552/240 | 1 | 3 | 0 |  |
| E310/798 | 2 | 552/192 | 1 | 5 | 0 |
| E310/798 | 1 | 552/192 | 1 | 2 | 0 |
| E310/818 | 1 | 552/240 | 1 | 14 | 0 |
| E310/818 | 1 | 552/105 | 1 | 10 | 0 |
| E310/822 | 1 | 522/114 | 2 | 13 | 1 |
| E310/822 | 1 | 552/192 | 1 | 10 | 0 |
| E310/822 | 1 | 552/192 | 1 | 11 | 0 |
| E310/822 | 2 | 552/100 | 1 | 14 | 0 |
| E310/825 | 1 | 552/38 | 2 | 13 | 0 |
| E310/825 | 2 | 552/155 | 1 | 12 | 0 |
| E310/836 | 3 | 552/105 | 1 | 6 | 0 |
| E310/836 | 2 | 552/240 | 1 | 6 | 0 |
| E310/836 | 1 | 552/240 | 1 | 9 | 0 |
| E310/838 | 1 | 552/105 | 1 | 10 | 0 |
| E310/838 | 2 | 552/105 | 1 | 11 | 0 |
| E310/844 | 2 | 552/240 | 1 | 9 | 0 |
| E310/844 | 2 | 552/38 | 2 | 14 | 0 |
| E310/844 | 3 | 552/100 | 1 | 11 | 0 |
| E310/844 | 3 | 552/38 | 1 | 10 | 0 |
| E310/844 | 1 | 552/192 | 2 | 10 | 0 |
| E310/844 | 1 | 552/114 | 2 | 11 | 0 |
| E310/847 | 2 | 552/240 | 1 | 12 | 0 |
| E310/847 | 1 | 552/155 | 1 | 12 | 0 |
| E310/868 | 1 | 552/240 | 1 | 10 | 0 |
| E310/869 | 1 | 552/105 | 1 | 11 | 0 |
| **SUMA** | **259** | **1** | **0,39%** |
|  |
| 552/100 | 2 | 310/838 | 2 | 15 | 0 |  |
| 552/100 | 1 | 310/836 | 2 | 9 | 0 |
| 552/100 | 1 | 310/798 | 1 | 13 | 5 |
| 552/105 | 1 | 310/838 | 2 | 14 | 0 |
| 552/105 | 1 | 310/838 | 2 | 13 | 1 |
| 552/114 | 2 | 310/836 | 2 | 4 | 0 |
| 552/114 | 2 | 310/838 | 1 | 14 | 0 |
| 552/114 | 1 | 310/822 | 1 | 11 | 1 |
| 552/114 | 1 | 310/798 | 1 | 11 | 0 |
| 552/155 | 3 | 310/869 | 1 | 12 | 0 |
| 552/155 | 3 | 310/818 | 1 | 11 | 0 |
| 552/155 | 2 | 310/838 | 1 | 10 | 1 |
| 552/155 | 1 | 310/838 | 1 | 11 | 2 |
| 552/192 | 1 | 310/836 | 3 | 12 | 0 |
| 552/192 | 1 | 310/836 | 2 | 11 | 2 |
| 552/236 | 2 | 310/869 | 2 | 14 | 0 |
| 552/236 | 1 | 310/838 | 1 | 14 | 1 |
| 552/240 | 2 | 310/836 | 3 | 12 | 2 |
| 552/240 | 1 | 210/798 | 2 | 14 | 3 |
| 552/241 | 1 | 310/798 | 1 | 12 | 0 |
| 552/241 | 2 | 310/798 | 1 | 13 | 1 |
| 552/38 | 1 | 310/798 | 2 | 11 | 2 |
| 552/38 | 2 | 310/868 | 1 | 11 | 1 |
| 552/48 | 1 | 310/836 | 2 | 11 | 0 |
| 552/48 | 1 | 310/838 | 1 | 12 | 0 |
| 552/48 | 2 | 310/838 | 1 | 13 | 0 |
| **SUMA** | **308** | **22** | **7,14%** |

Przeprowadzono również krzyżowania pomiędzy odmianą ‘Celer’ posiadającą gen *Pc39* lub roślinami homozygotycznymi populacji E310, której komponent rodzicielski stanowi odmiana ‘Celer’ a 4 liniami referencyjnymi z wysoce efektywnymi genami odporności lub odmianami, czy mieszańcami posiadającymi efektywne geny odporności *Pc* (Tab.9). Uzyskano mieszańce linii z genem Pc39 lub odmian z Pc39 z geneami odporności: *Pc*52, *Pc* 59, *Pc*60 i *Pc*71. Efektywność krzyżowania była bardzo niska i wyniosła zaledwie 1,1%. Po zapyleniu 450 kwiatków zawiązało się zaledwie 5 ziarniaków.

1. Opracowanie statystyczne prowadzonych krzyżowań.

| **Forma mateczna** | **Nr rośliny** | **Forma ojcowska** | **Nr rośliny** | **Liczba wykastrowanych kwiatków** | **Liczba zawiązanych ziarniaków** | **Efektywność krzyżowania** |
| --- | --- | --- | --- | --- | --- | --- |
| Celer | 1b | 552/100 | 1 | 14 | 0 |  |
| Celer | 4b | 552/100 | 1 | 12 | 0 |
| Celer | 2B | Leggett | 2 | 12 | 0 |
| Celer | 3b | Leggett | 2 | 12 | 0 |
| Celer | 6b | Pc50USA | 1b | 8 | 0 |
| Celer | 4b | Pc50USA | 1a | 10 | 0 |
| Celer | 2a | Pc50USA | 1a | 7 | 0 |
| Celer | 2a | Pc51USA | 3 | 9 | 0 |
| Celer | 4a | Pc51USA | 2a | 10 | 0 |
| Celer | 1a | Pc51USA | 3a | 10 | 0 |
| Celer | 5a | Pc51USA | 2a | 12 | 0 |
| Celer | 5b | Pc53 | 2b | 8 | 0 |
| Celer | 5b | Pc53 | 2b | 10 | 0 |
| Celer | 5b | Pc53 | 2b | 6 | 0 |
| Celer | 5a | Pc53 | 1a | 7 | 0 |
| Celer | 6a | Pc53 | 1a | 7 | 0 |
| Celer | 4a | Pc53 | 1a | 11 | 0 |
| Celer | 1b | Pc59K | 1a | 7 | 0 |
| Celer | 1b | **Pc59K** | 1a | 7 | 1 |
| Celer | 3b | Pc59USA | 1 | 9 | 0 |
| Celer | 1b | Pc59USA | 4a | 12 | 0 |
| Celer | 4a | Pc59USA | 1a | 8 | 0 |
| Celer | 4a | Pc59USA | 1a | 9 | 0 |
| Celer | 2B | Pc60 | 1B | 9 | 0 |
| Celer | 2B | Pc60 | 1B | 8 | 0 |
| Celer | 2b | Pc60 | 1a | 12 | 0 |
| Celer | 1b | Pc60 | 1a | 12 | 0 |
| Celer | 2a | Pc60 | 2a | 8 | 0 |
| Celer | 1a | Pc60 | 2a | 7 | 0 |
| Celer | 2b | **Pc60** | 1b | 10 | 1 |
| Celer | 1a | Pc70 | 1a | 8 | 0 |
| Celer | 3a | Pc71 | 2 | 12 | 0 |
| Celer | 6a | Pc71 | 1a | 13 | 0 |
| Celer | 7a | **Pc71** | 1a | 12 | 1 |
| Leggett | 1 | Celer | 1a | 10 | 0 |
| Leggett | 1 | Celer | 1a | 10 | 0 |
| Pc51USA | 1a | Celer | 5a | 11 | 0 |
| **Pc52** | 1 | 310/838 | 3 | 8 | 1 |
| Pc59USA | 1a | Celer | 5a | 10 | 0 |
| Pc60 | 2a | Celer | 7a | 10 | 0 |
| Pc60 | 1a | Celer | 7a | 11 | 0 |
| **Pc71** | 1A | 310/818 | 2 | 9 | 1 |
| Pc71 | 2 | 310/818 | 2 | 12 | 0 |
| 850 | 1 | 310/818 | 1 | 8 | 0 |
| 855 | 1 | 310/818 | 1 | 8 | 0 |
| 859 | 1 | 310/818 | 1 | 10 | 0 |
| **SUMA** | **450** | **5** | **1,1%** |

#### Mierniki dla tematu badawczego 3

|  |  |  |  |
| --- | --- | --- | --- |
| Lp. | miernik | wartość miernika podana w opisie zadania | wartość miernika zrealizowana |
| 1. | Liczba skumulowanych genów odporności | 2 | 2 |
| 2. | Liczba kombinacji mieszańcowych z odmianą Celer jako jedną z form rodzicielskich | 4 | 4 |

# 3. 4. Genotypowanie z wykorzystaniem metody SRAP

### Cel tematu badawczego 4

* Genotypowanie mieszańców F2 homozygotycznych pod względem odporności na rdzę koronową w celu identyfikacji potencjalnych markerów dla genu odporności *Pc39* z wykorzystaniem metody SRAP.

**Materiały i metody**

Do analiz wykorzystano DNA wyizolowane w roku poprzednim z roślin F2 homozygotycznych pod względem odporności wynikającej z obecności genu *Pc*39. Analizy molekularne przeprowadzono z wykorzystaniem metody SRAP na próbach zbiorczych DNA odpornych i nieodpornych roślin F2. Próbki zbiorcze przygotowano zgodnie z metodą BSA (*Bulk Segregant Analysis*) (Michelmore i in. 1991). W tym celu DNA wyizolowane z roślin o przeciwstawnych genotypach połączono ze sobą w jednakowych objętościach. Reakcje przeprowadzono dla 960 kombinacji 24 starterów F i 40 starterów R. W skład mieszaniny reakcyjnej o objętości 20 μL weszły: 1 x bufor do PCR; 160 µM dNTP; 5 pM startera F i 5 pM startera R; 1,5 mM MgCl2; 20 ng genomowego DNA; 1 U polimerazy DNA *Taq* (Fermentas). Amplifikacja była prowadzona na termocyklerze T Professional Basic (Biometra) z zastosowaniem profilu termicznego: 95°C 2’30”; 5x (94°C 45”, 35°C 45”, 72°C 1’); 30x (94°C 45”, 50°C 45”, 72°C 1’); 72°C 10’. Rozdział elektroforetyczny produktów amplifikacji był prowadzony w 1,5% żelu agarozowym z 0,01% EtBr w buforze TBE przez 4 godziny przy napięciu 120V.

W celu weryfikacji czy potencjalne markery identyfikowane metodą SRAP są sprzężone z genem odporności przeprowadzono reakcje dla wytypowanych par starterów z DNA pojedynczych homozygotycznych roślin F2.

**Wyniki**

Spośród 960 testowanych par starterów na podstawie zdjęć rozdziałów elektroforetycznych wyselekcjonowano 34 (Tab.10), z udziałem których reakcję powtórzono na losowo wybranym zestawie DNA 3 homozygot odpornych i 3 wrażliwych pokolenia F2 populacjiE310. Po przeprowadzeniu reakcji PCR produkty rozdzielono elektroforetycznie (Fot.1) i po zweryfikowaniu powtarzalności pojawiających się wzorów prążkowych wybrano 5 par starterów (Tab.9) dających powtarzalny produkt i dla nich nastawiono reakcje na matrycach DNA 6 odpornych i 6 wrażliwych osobników populacji E310 (Fot.2).

Potencjalnie różnicujący produkt uzyskany przy użyciu pary starterów SRAP nr 22 (Me2\_ep2+Em28) okazał się być niestabilny i niepowtarzalny, dlatego zaniechano jego dalszych analiz.

Produkt amplifikowany przy użyciu pary starterów SRAP nr 6 (Me23+Em14) o wielkości ok 230 pz oznaczony strzałką na Fot. 4 pojawił się u wszystkich przetestowanych form odpornych i heterozygot populacji E310. Reakcja była powtarzalna, a produkt różnicujący stabilny, niezależnie od warunków. Dalsza konwersja uzyskanego markera może umożliwić uzyskanie wysokiej specyficzności amplifikacji potwierdzonej jednoprążkowym obrazem rozdziału produktów reakcji PCR na żelu.

**Mierniki dla tematu badawczego 4**

|  |  |  |  |
| --- | --- | --- | --- |
| Lp. | miernik | wartość miernika podana w opisie zadania | wartość miernika zrealizowana |
| 1.  | Liczba testowanych par starterów SRAP | 960 | 960 |

# 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 *Pc52* z wykorzystaniem całogenomowej analizy polimorfizmu metodą DArTseq
* Próba konwersji na markery specyficzne sekwencji DArT sprzężonych z obecnością genu *Pc*39.

**Materiały i metody**

Ekstrakcja, a następnie ocena parametrów fizycznych preparatów DNA przeznaczonych do analiz molekularnych została przeprowadzona z form rodzicielskich oraz 220 roślin F2 populacji Bingo × *Pc*52. 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 na 1% żelu agarozowym w buforze TBE. Wszystkie preparaty doprowadzono do stężenia 100 ng/µl i przeznaczono do dalszych analiz.

Analizy DArTseq przeprowadzono dla form rodzicielskich oraz 46 homozygotycznych pod względem genu odporności *Pc52* roślin F2 populacji ‘Bingo’ × *Pc52*. 500 ng genomowego DNA reprezentującego wytypowane genotypy zostało wysłane w celu identyfikacji polimorfizmu. Analizy zostały zrealizowane w Diversity Arrays Technology, Uniwersytetu w Canberrze w Australii wg opracowanej i opatentowanej metodyki. Jest to jedyny ośrodek prowadzący takie analizy. Wyniki uzyskano w postaci macierzy binarnych i poddano wstępnej ocenie polimorfizmu.

Potencjalne markery DArTseq i silicoDArT dla genu *Pc*52 zidentyfikowane wśród fragmentów silicoDArT i DArTseq uzyskanych w toku genotypowania zostaną w roku kolejnym przekonwertowane na markery specyficzne.

W oparciu o sekwencje DArT sprzężone z obecnością genu *Pc39* zidentyfikowane w roku poprzednim zaprojektowano startery specyficzne. Po uzyskaniu amplifikacji pojedynczych fragmentów startery poddano weryfikacji na populacji Celer × STH9210.

**Wyniki**

Izolację DNA przeprowadzono z liści 220 roślin F2 populacji Bingo × *Pc52* DNA pobranych w roku poprzednim. Analizy DArTseq przeprowadzono dla form rodzicielskich oraz 46 homozygotycznych pod względem genu odporności *Pc52* roślin F2. Wyniki uzyskano w postaci macierzy binarnych i poddano wstępnej ocenie polimorfizmu i wytypowano sekwencje, które mogą zostać konwertowane na markery specyficzne dla genu *Pc52*.

Tylko dla pary starterów 3F+3R uzyskano prążek różnicujący osobniki odporne i porażone. Fragment o wielkości ok. 430 pz zidentyfikowano u form porażonych w całym zakresie testowanych temperatur, co wskazywało na stabilność tego produktu i powtarzalny charakter amplifikacji (Fot.6). Z uwagi na zupełny brak amplifikacji u form odpornych w temperaturach powyżej 60°C początkowo wstępną ocenę segregacji markera prowadzono w 62°C, a następnie w 65°C.

**Mierniki dla tematu badawczego 5**

|  |  |  |  |
| --- | --- | --- | --- |
| Lp. | miernik | wartość miernika podana w opisie zadania | wartość miernika zrealizowana |
| 1.  | Liczba homozygotycznych roślin F2 genotypowanych metodą DArT*seq* | 46 | 46 |
| 2. | Liczba sekwencji DArT konwertowanych do warunków specyficznego PCR | 2 | 2 |

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 | liczba prezentacji podana w opisie zadania | liczba prezentacji zrealizowana |
| 1 | Konferencja Naukowa Katedr Jednoimiennych „Nowe osiągnięcia polskich zespołów badawczych w dziedzinie genetyki, hodowli i biotechnologii roślin” Międzyzdroje 8-10.06.2016 – 1 osoba(*Temat badawczy 3.1/2016 str. 12-13*) | wystąpienie | 1 | 1 |
| 2 | X International Oat Conference, 11 - 15 lipca 2016, St. Petersburg, Rosja – 1 osoba(*Temat badawczy 3.2/2014, 15-19, 3.1/2015 str 4-14, 3.1/2016 str.6-10* ) | poster | 1 | 1 |
| Publikacje w monografiach/czasopismach recenzowanych |
| lp. | monografia/czasopismo | miernik | wartość miernika podana w opisie zadania | wartość miernika zrealizowana |
|  | Folia Pomeranae Universitatis Technologiae Stetinensis Agricultura Alimentaria Piscaria et Zoot.; Sowa S., Paczos-Grzęda E. 2016. *Puccinia coronata* f.sp. *avenae* virulence in South Eastern Poland (przyjęta do druku)*(Temat badawczy 3.1/2015, str. 4-9)* | praca oryginalna | 1 | 1 |

*Jeśli któryś z mierników nie został zrealizowany należy podać przyczyny.*

Załączniki:

1. Sowa S., Paczos-Grzęda E., Ostrowska A., 2016. Virulence of *Puccinia coronata* f.sp. *avenae* in Poland during 2013-2015; X International Oat Conference, 11 - 15 lipca 2016, St. Petersburg, Rosja. – poster.
2. Sowa S., Paczos-Grzęda E., Ostrowska A., 2016. Ocena odporności na rdzę koronową polskich odmian owsa zwyczajnego. „Nowe osiągnięcia polskich zespołów badawczych w dziedzinie genetyki, hodowli i biotechnologii roślin”, Konferencja Naukowa Katedr Jednoimiennych, Międzyzdroje 8-10 czerwiec 2016, str. 70. – streszczenie wystąpienia.

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

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

6. Miernik zadania - stopień realizacji.

|  |  |  |  |  |
| --- | --- | --- | --- | --- |
| **lp.** | **miernik** | **wartość miernika podana w opisie zadania** | **wartość miernika zrealizowana** | **stopień realizacji zadania** |
| 1 | 2 | 3 | 4 | 5 |
| **temat badawczy 1** |
| 1.1 | Liczba izolatów analizowanych pod kątem patogeniczności względem 45 linii referencyjnych. | 40 | 40 | 1,00 |
| 1.2 | Liczba izolatów analizowanych pod kątem patogeniczności względem 60 odmian. | 14 | 14 | 1,00 |
| 1.3 | Liczba linii referencyjnych ocenianych w warunkach naturalnej infekcji polowej w czterech lokalizacjach. | 45 | 45 | 1,00 |
| 1.4 | Liczba populacji, z których zostaną wyprowadzone nowe izolaty. | 4 | 4 | 1,00 |
| **temat badawczy 2** |
| 2.1 | Liczba fenotypowanych kombinacji mieszańcowych F1 | 11 | 11 | 1,00 |
| 2.2 | Liczba linii F3 ocenianych pod względem odporności na rdzę w warunkach laboratoryjnych. | 220 | 220 | 1,00 |
| 2.3 | Liczba linii F3 ocenianych pod względem odporności na rdzę w warunkach naturalnej infekcji polowej. | 220 | 220 | 1,00 |
| 2.4 | Liczba populacji mapujących F2 poddanych rozmnożeniu i wstępnej ocenie rozszczepień w warunkach polowych. | 4 | 4 | 1,00 |
| **temat badawczy 3** |
| 3.1 | Liczba skumulowanych genów odporności | 2 | 2 | 1,00 |
| 3.2 | Liczba kombinacji mieszańcowych z odmianą Celer jako jedną z form rodzicielskich | 4 | 4 | 1,00 |
| **temat badawczy 4** |
| 4.1  | Liczba testowanych par starterów SRAP | 960 | 960 | 1,00 |
| **temat badawczy 5** |
| 5.1 | Liczba homozygotycznych roślin F2 genotypowanych metodą DArT*seq* | 46 | 46 | 1,00 |
| 5.2 | Liczba sekwencji DArT konwertowanych do warunków specyficznego PCR | 2 | 2 | 1,00 |
|  |  |  | **ŚREDNIA** | 1,00 |
|  |  |  | **% REALIZACJI ZADANIA** | 100% |

Sporządzono:

Lublin 10.01.2016r.

|  |  |  |
| --- | --- | --- |
| Pieczęć jednostki | Osoba reprezentująca jednostkę | Kierownik zadania |
|  |  |  |
| data | podpis i pieczęć | podpis  |