UNIWERSYTET RZESZOWSKI
WYDZIAŁ BIOLOGICZNO-ROLNICZY

Ewa Ciszkowicz

Mapowanie genów odporności na mączniaka prawdziwego u odmian pszenżyta ozimego ‘Lamberto’ i ‘Grenado’

ROZPRAWA DOKTORSKA

Promotor
dr hab. inż. Mirosław Tyrka, prof. PRz

Praca zrealizowana
w Katedrze Biochemii i Biotechnologii
Wydziału Chemicznego
Politechniki Rzeszowskiej

Rzeszów 2014

Składam serdeczne podziękowania
Panu dr hab. inż. Mirosławowi Tyrce
za opiekę naukową, pomoc oraz życzliwość
w trakcie realizacji niniejszej pracy.

Pragnę także podziękować mgr inż. Dorocie Tyrce
za cenne wskazówki praktyczne oraz wsparcie
na początkowym etapie realizacji prac laboratoryjnych.

Dziękuję również:
swoim Bliskim, w szczególności Tacie i Mężowi,
za pomoc, cierpliwość i wyrozumiałość,
a także Gosi i Justynie
za radość w chwilach sukcesu i wsparcie w czasie zwątpienia.

Pracę dedykuję osobie,
która najbardziej na świecie pragnęłaby ją zobaczyć,
mojej Mamie.

WYKAZ SKRÓTÓW STOSOWANYCH W PRACY

AFLP	–	*amplified fragment length polymorphism*	–	polimorfizm długości powielonych fragmentów DNA
AGT	–	*appressorial germ tube*	–	wtórna strzępka kiełkowa
APR	–	*adult plant resistance*	–	odporność rośliny dojrzałej
AUDPC	–	*area under disease progress curve*	–	powierzchnia pod krzywą rozwoju choroby
BSA	–	*bulked segregant analysis*	–	analiza skrajnych segregantów
CIM	–	*composite interval mapping*	–	złożone mapowanie interwałowe
CIMMYT	–	*International Maize and Wheat Improvement Center*	–	Międzynarodowe Centrum Doskonalenia Odmian Kukurydzy i Pszenicy
COBORU	–		–	Centralny Ośrodek Badania Odmian Roślin Uprawnych
CWA	–	*cell wall apossition*	–	apozycja elementów ściany komórkowej
DArT	–	*diversity arrays technology*	–	technologia zróżnicowania mikromacierzy
DNA	–	*deoxyribonucleic acid*	–	kwas deoksyrybonukleinowy
DH	–	*doubled haploid*	–	linie podwojonych haploidów
EDTA	–	*ethylenediaminetetraacetic acid*	–	kwas etylenodiaminotetraoctowy
EHM	–	*extrahaustorial membrane*	–	błona zewnątrzhaustorialna
EHMAT	–	*extrahaustorial matrix*	–	matriks zewnątrzhaustorialna
EMS	–	*etyl methanesulfonate*	–	metanosulfonian etylu
EST	–	*expressed sequence taq*	–	znaczniki sekwencji ulegających ekspresji
FISH	–	*fluorescence in situ hybridization*	–	fluorescencyjna hybrydyzacja *in situ*
geny PR	–	*pathogenesis-related genes*	–	geny związane z patogenezą
HR	–	*hypersensitive reaction*	–	reakcja nadwrażliwości
ICIM-ADD	–	*inclusive composite interval mapping of QTL with additive (and dominance) effects*	–	złożone mapowanie interwałowe QTL z efektami addytywnymi lub dominującymi
ICIM-EPI	–	*inclusive composite interval mapping of digenic epistatic QTL*	–	złożone mapowanie interwałowe QTL o charakterze epistatycznym
IHAR	–		–	Instytut Hodowli i Aklimatyzacji Roślin
IM	–	*interval mapping*	–	mapowanie interwałowe

IM-ADD	–	*interval Mapping of QTL with additive (and dominance) effects*	–	mapowanie interwałowe QTL z efektami addytywnymi lub dominującymi
IM-EPI	–	*interval mapping of digenic epistatic QTL*	–	mapowanie interwałowe QTL o charakterze epistatycznym
LOD	–	*logarithm of odds*	–	logarytm szans
Lr	–	*leaf rust*	–	rdza brunatna
MAP	–	*mitogen-activated protein*	–	białko aktywowane mitogenem
PAMPS	–	*pathogenesis-associated molecular patterns*	–	wzorce molekularne związane z patogenezą
PCR	–	*polymerase chain reaction*	–	reakcja łańcuchowej polimerazy
PCD	–	*programmed cell death*	–	zaprogramowana śmierć komórki
PGT	–	*primary germ tube*	–	podstawowa strzępka kiełkowa
Pm	–	*powdery mildew*	–	mączniak prawdziwy
PRRs	–	*pattern recognition receptors*	–	receptory rozpoznające wzorce
QTL	–	*quantitative trait loci*	–	loci cech ilościowych
RAMP	–	*random amplified microsatellite polymorphism*	–	polimorfizm losowo amplifikowanych mikrosatelit
RAPD	–	*random amplified polymorphic DNA*	–	losowo amplifikowany polimorficzny DNA
RFLP	–	*restriction fragment length polymorphism*	–	polimorfizm długości fragmentów restrykcyjnych
RIL	–	*recombinant inbred lines*	–	rekombinacyjne linie wsobne
RNA	–	*ribonucleic acid*	–	kwas rybonukleinowy
ROS	–	*reactive oxygen species*	–	reaktywne formy tlenu
SCAR	–	*sequence characterized amplified region*	–	polimorfizm sekwencyjnie charakteryzowanych regionów DNA
SMA	–	*single marker analysis*	–	analiza pojedynczych markerów
SNP	–	*single nucleotide polimorphism*	–	polimorfizm pojedynczego nukleotydu
SSR	–	*simple sequence repeats*	–	powtórzenia prostych sekwencji (mikrosatelity)
STS	–	*sequence tagged sites*	–	miejsca znaczone sekwencyjnie
TEMED	–	*N,N,N′,N′-tetramethylethylenediamine*	–	N,N,N′,N′- tetrametyletylenodiamina
TRAP	–	*target region amplification polimorphism*	–	polimorfizm amplifikowanych regionów docelowych
UPGMA	–	*unweighted pair group method with arithmetic mean*	–	metoda średnich połączeń

SPIS TREŚCI

WSTĘP **7**
1. PRZEGLĄD PIŚMIENNICTWA **8**
1.1. Charakterystyka genetyczna oraz historia pszenżyta na świecie i w Polsce 8
1.2. *Blumeria graminis* – patogen grzybowy pszenżyta 14
1.2.1. Charakterystyka *Blumeria graminis* 14
1.2.2. Przebieg procesu chorobowego wywołanego przez *Blumeria graminis* 14
1.3. Odporność roślin 19
1.3.1. Odporność roślin warunkowana czynnikami genetycznymi 19
1.4. Podłoże genetyczne odporności na mączniaka prawdziwego 23
1.5. Mapy genetyczne 35
1.5.1. Konstrukcja map genetycznych 35
1.5.2. Populacja mapująca 36
1.5.3. Genetyczne zróżnicowanie populacji mapującej 36
1.5.4. Markery molekularne 36
1.5.5. Lokalizacja loci cech ilościowych (QTL) 38
2. CEL PRACY **41**
3. MATERIAŁ I METODY **42**
3.1. Materiał badawczy 42
3.2. Analiza genotypowa 43
3.2.1. Izolacja dna roślin 43
3.2.2. Analiza systemami markerowymi 44
3.2.3. Badanie struktury populacji 48
3.2.4. Konstrukcja mapy genetycznej 48
3.3. Analiza fenotypowa 49
3.4. Analiza QTL 51
3.5. Cytologia 52
4. WYNIKI **53**
4.1. Analiza genetyczna 53
4.1.1. Analizy DArT 53
4.1.2. Badanie polimorfizmu markerów SSR u form rodzicielskich i w populacji mapującej 56
4.1.3. Konstrukcja mapy genetycznej 57
4.1.6. Analiza strukturalna mapy genetyczej 62
4.2. Analiza fenotypowa 67
4.3. Identyfikacja markerów sprzężonych z reakcją odporności i analiza QTL 70
4.4. Cytologia 78
5. DYSKUSJA **80**

6. WNIOSKI KOŃCOWE **91**

7. BIBLIOGRAFIA **93**

8. STRESZCZENIE **115**

9. SUMMARY **116**

10. ANEKS **117**

Załącznik nr 1. Charakterystyka markerów molekularnych DArT oraz SSR w populacji F_2 'Lamberto' i 'Grenado'. 117

Załącznik nr 2. Mapa genetyczna genomu A dwukierunkowej populacji F_2 pszenżyta 'Lamberto' i 'Grenado' w porównaniu z mapami referencyjnymi: konsensusową CIMMYT pszenicy oraz konsensusową genomu A i B pszenicy twardej – Marone i in. (2012). 135

Załącznik nr 3. Mapa genetyczna genomu B dwukierunkowej populacji F_2 pszenżyta 'Lamberto' i 'Grenado' w porównaniu z mapami referencyjnymi: konsensusową pszenicy - CIMMYT oraz mapą konsensusową genomu A i B pszenicy twardej autorstwa Marone i in. (2012). 139

Załącznik nr 4. Mapa genetyczna genomu R dwukierunkowej populacji F_2 pszenżyta 'Lamberto' i 'Grenado' w porównaniu z mapami referencyjnymi: mapą żyta ozimego L318×L9 [BOLIBOK-BRĄGOSZEWKA i in. 2009] oraz mapą pszenżyta 'Saka3006'×'Modus' – S×M [TYRKA i in. 2011]. 143

WSTĘP

Odporność została zdefiniowana jako zdolność organizmu do przeciwstawienia się lub zmniejszenia działania skutków czynnika szkodliwego lub chorobotwórczego [MANNERS 1993]. Do rozpoznania i przezwyciężenia podstawowej odporności rośliny-gospodarza wymagana jest zasadnicza zgodność czynników patogeniczności pomiędzy rośliną a patogenem [ELLINGBOE 1976]. Patogen wywołujący chorobę wykazuje wirulencję w stosunku do rośliny-gospodarza, natomiast roślina jest wrażliwa w odniesieniu do danej populacji patogena. Niezdolność patogena do wywołania choroby nazywa się awirulencją [HEITEFUSS 1997].

W warunkach klimatycznych sprzyjających rozwojowi patogenów rośliny poddawane są działaniu dużej ilości materiału infekcyjnego pasożytniczych mikroorganizmów. Mechanizmy odpornościowe roślin mogą mieć charakter bierny i/lub czynny. Do odporności biernej zaliczyć można bariery fizyczne utrudniające lub uniemożliwiające inicjację infekcji, oraz bariery chemiczne w postaci metabolitów o właściwościach toksycznych hamujących penetrację i rozwój patogena. Odporność czynna, zwana aktywną lub indukowaną, jest wyzwalana w następstwie kontaktu rośliny z czynnikiem chorobotwórczym.

Przez wiele lat pszenżyto było uważane za zboże mało podatne na choroby, jednak w ostatnim 10-leciu nasilenie chorób na pszenżycie zwiększało się. Występowanie rdzy brunatnej obserwuje się obecnie w 80% przeprowadzanych doświadczeń, septoriozy liści w 90% doświadczeń, natomiast septoriozy plew w 60%. W 2003 roku pszenżyto było porażane przez mączniaka prawdziwego jedynie w 10% doświadczeń. W 2004 roku doszło jednak do załamania odporności pszenżyta na mączniaka prawdziwego, szczególnie u odmiany ‘Lamberto’. Powszechne stosowanie upraw tej odmiany w Polsce i w Niemczech doprowadziło do rozprzestrzenienia się szczepów wirulentnych patogena w stosunku do tej odmiany i do epifitozy.

Jednym z najlepszych sposobów ochrony pszenżyta przed chorobami powodowanymi przez grzyby patogeniczne, a zarazem najbardziej celowym i ekonomicznym jest uprawa odmian odpornych. Niezbędnym elementem nowoczesnego procesu hodowli odmian są markery molekularne. Są to fragmenty DNA (o wielkości od kilkudziesięciu do kilkuset par zasad), wykazujące zmienność strukturalną w obrębie danego locus. Umożliwiają one identyfikację genotypu danego organizmu [NOWAKOWSKA 2006]. Stosowanie markerów daje możliwość prowadzenia selekcji negatywnej lub pozytywnej we wczesnych pokoleniach i stadiach rozwoju roślin. Markery DNA są szczególnie przydatne w selekcji takich cech, które trudno identyfikować na podstawie fenotypu, i których ekspresja jest uzależniona od warunków środowiskowych, jak to ma miejsce w przypadku odporności na choroby wywoływane przez patogeniczne grzyby.

1. PRZEGLĄD PIŚMIENNICTWA

1.1. Charakterystyka genetyczna oraz historia pszenżyta na świecie i w Polsce

Ważnym procesem odpowiedzialnym za specjację organizmów roślinnych jest allopoliploidyzacja. Występuje ona naturalnie przez połączenie dwóch lub więcej odmiennych genomów w jednym jądrze komórkowym wskutek hybrydyzacji różnych gatunków. Nadmiar materiału genetycznego może prowadzić do większej zmienności genomu w porównaniu do form rodzicielskich, a także stwarza nowe możliwości generowania zróżnicowania funkcjonalnego między homeologicznymi genami i genomami. Jednakże duplikacja genów i genomów często powoduje niestabilność genomową, niezrównoważenie chromosomów, zaburzenia regulacji oraz problemy reprodukcyjne [MA i GUSTAFSON, 2008]. Liczne prace badawcze wskazują, iż proces hybrydyzacji i/lub podwojenia genomu może prowadzić do niestabilności w jego funkcjonowaniu, indukując rozległe zmiany o charakterze genetycznym oraz epigenetycznym [BENTO i wsp. 2011; CHEN 2007; HAN i wsp. 2003; MA i GUSTAFSON, 2008]. Modyfikacje genetyczne obejmują translokacje, transpozycje, a także delecje i insercje, natomiast zmiany epigenetyczne dotyczą regulacji genów, transkrypcji transpozonów, wyciszania genów homeologicznych, czy też zmiany kondensacji chromatyny [CHEN i NI, 2006; FELDMAN i LEVY, 2005; VIEGAS i wsp. 2002]. Allopoliploidy przechodzą zmiany zarówno rewolucyjne (natychmiastowe), jak i ewolucyjne (kumulujące się), prowadzące do ustalenia równowagi pomiędzy obcą cytoplazmą i jądrami komórkowymi odmiennych genomów [FELDMAN i LEVY, 2005]. Dotychczasowe badania nad hybrydami *Triticum sp.* i *Aegilops* spp. wskazują, iż zaistniałe zmiany genetyczne i epigenetyczne nie są przypadkowe, ale raczej ukierunkowane i powtarzalne [BENTO i wsp. 2008].

Genom allopoliploidalego pszenżyta charakteryzuje duża złożoność, różne poziomy ploidalności gatunków rodzicielskich oraz hybrydyzacja dwóch odległych genetycznie gatunków. Cechy te powodują, iż zmiany genetyczne u pszenżyta są rozleglejsze niż u jakiegokolwiek innego syntetycznie wytworzonego allopoliploidu, np. *Triticum sp.* i *Brassica sp.* [BENTO i wsp. 2011; SONG i wsp. 1995]. Liczne badania wskazują na fakt, iż u pszenżyta genom żytni podlega dużo większym modyfikacjom i wykazuje wyższy stopień dopasowania. Genom pszenicy jest bardziej dostosowany do stanu poliploidalnego, ponieważ „doświadczył" już zmian genetycznych i epigenetycznych w trakcie ewolucji [MA i GUSTAFSON, 2008]. Takich modyfikacji nie przechodził diploidalny genom żytni. Poliploidyzacja prowadzi do znacznej eliminacji sekwencji DNA pochodzących od żyta [BENTO i wsp. 2008; MA i GUSTAFSON, 2006] oraz w różnym stopniu wpływa na rearanżacje sekwencji powtarzających się, niekodujących oraz sekwencji kodujących [BENTO i wsp. 2008; TANG i wsp. 2008]. U pszenżyta utrata sekwencji specyficznych dla pszenicy była najwyższa dla sekwencji powtarzających się, a najniższa w przypadku sekwencji kodujących, niezależnie od formy rodzicielskiej pszenicy (tetraploidalna lub heksaploidalna) [BENTO i wsp. 2011; MA i GUSTAFSON, 2008]. U żyta stopień eliminowanych sekwencji był podobny, niezależnie od ana-

lizowanej sekwencji (powtarzające się, niekodujące lub kodujące), lecz zawsze wyższy w porównaniu do utraconych sekwencji specyficznych dla pszenicy. Pomimo, iż stopień eliminacji sekwencji specyficznych dla żyta jest podobny dla obu form pszenżyta, utrata sekwencji specyficznych dla pszenicy była znacznie większa dla form heksaploidalnych [BENTO i wsp. 2011]. Wyższą, ogólną zmienność genomu obserwowano u form heksaploidalnych w porównaniu do form oktoploidalnych pszenżyta [BOYKO i wsp. 1984; MA i GUSTAFSON, 2008]. Oznaczać może to większą zdolność buforową genomu pszenicy heksaploidalnej do uniknięcia licznych rearanżacji u pszenżyta [BENTO i wsp. 2011].

Cytoplazma jest zasadniczym komponentem żywej komórki, umożliwiającym działanie genów jądrowych oraz sprawne działanie procesów rozwojowych. Różnice we wpływie cytoplazmy na analizowane genotypy i fenotypy mogą być tłumaczone hipotezą genów wrażliwych na plazmon [RENNER i KUPPER, 1921], według której cytoplazma mateczna stanowi podłoże dla genów ojcowskich i może modyfikować ekspresję, prowadząc do powstania odmiennego fenotypu. Song i wsp. (1995) opisali ukierunkowane zmiany komponentów genomu oraz wpływ cytoplazmy u syntetycznych poliploidów *Brassica*. U poliploidów AB zawierających genom cytoplazmatyczny A, ojcowski genom jądrowy (genom B) wykazał istotne zmiany, podczas gdy mateczny genom jądrowy A nie uległ znaczącym modyfikacjom. U poliploidów BA zaobserwowano zmiany analogiczne, ale utracone zostały większe ilości fragmentów genomu formy A. W obu przypadkach rozleglejsze zmiany dotyczyły genomów ojcowskich. Song i wsp. (1995) nie zaobserwowali zmian u poliploidów AC oraz CA ze względu na bliskie pokrewieństwo ich genomów cytoplazmatycznych. Duża wariancja genomu żytniego u pszenżyta tłumaczona jest także właśnie poprzez interakcje jądro-cytoplazma [GILL 1999]. Hybrydy żyto-pszenica (żyto jako forma mateczna) są niezwykle rzadkie i niestabilne. Ponadto wszystkie istniejące odmiany pszenżyta zostały wytworzone poprzez hybrydyzację pszenica-żyto (pszenica jako forma mateczna), zawierają więc cytoplazmę pochodzenia pszenicznego. Genom ojcowski może być bardziej wrażliwy na zmiany w nowotworzonej hybrydzie, ponieważ jest wystawiany na niezgodne środowisko matecznej cytoplazmy [MA i GUSTAFSON, 2008]. Zatem kierunek krzyżowania odmian jest istotny ze względu na wpływ cytoplazmy matecznej. Pszenżyto, jako sztucznie wytworzony poliploid, charakteryzują także ukierunkowane zmiany dotyczące genomów rodzicielskich.

U pszenżyta wykryty został wysoki stopień rearanżacji sekwencji retrotranspozonów. Ze względu na dużą dynamikę i mobilność retrotranspozonów generują one zmienność molekularną genomu, a co za tym idzie odgrywają znaczącą rolę w jego ewolucji i specjacji. Transpozony mogą być aktywowane pod wpływem różnych czynników stresu biotycznego i abiotycznego [MCCLINTOCK 1984], co może doprowadzić do zmian o charakterze epigenetycznym oraz zmian funkcjonowania mechanizmów regulatorowych [SLOTKIN i MARTIENSSEN, 2007]. Pierwszym zidentyfikowanym retrotranspozonem u pszenicy był WIS 2-1A. Bonchev i wsp. (2010) badali zmienność genetyczną pszenicy i pszenżyta po traktowaniu ich związkiem mutagennym EMS. Zaobserwowano zwiększoną ilość transkryptów WIS 2-1A

u pszenżyta, pomimo iż analizy PCR wykazały większą liczbę kopii WIS 2-1A u pszenicy. W porównaniu do formy matecznej u pszenżyta obserwowano redukcję liczby sekwencji retrotranspozonów. Autorzy sugerują, iż zwiększona ilość transkryptów WIS 2-1A u pszenżyta wywołana jest aktywacją wyciszonych kopii retrotranspozonu [BONCHEV i wsp. 2010]. Aktywacja roślinnych transpozonów jest zatem efektem hybrydyzacji ewolucyjnie odległych genomów. Analizy FISH ukazały najliczniejsze występowanie retrotranspozonu Nikita w rejonach heterochromatyny chromosomów genomu R pszenżyta [BENTO i wsp. 2008]. U pszenżyta zmniejszenie zawartości DNA w wyniku poliploidyzacji skutkuje znaczną utratą sekwencji retrotranspozonów, głównie pochodzenia ojcowskiego – żytniego. Obserwowana delecja żytniej heterochromatyny z rejonów telomerowych [MERKER 1976] wywołuje zaburzenia koniugacji chromosomów w trakcie mejozy oraz niestabilność cytologiczną pszenżyta [BENNET 1974].

Badania nad identyfikacją zmian strukturalnych w obrębie genomu pszenżyta wykazały występowanie substytucji 2R/2D u odmiany ‘Rosner’ [APPELS i wsp. 1982] oraz 1R/1D u odmiany ‘Presto’ [LUKASZEWSKI 2006]. Substytucje te nie są niezbędne do prawidłowego funkcjonowania pszenżyta, gdyż u wielu innych odmian odnotowano występowanie siedmiu chromosomów żytnich [APPELS i wsp. 1982]. Preferencyjna utrata chromosomu żyta 2R o największej zawartości DNA prowadzi do powstania bardziej stabilnego pszenżyta, o korzystniejszych cechach agronomicznych [GUSTAFSON i BENNETT, 1976]. Zhou i wsp. (2012) zidentyfikowali u odmiany ‘ZH-1’ pszenżyta translokację 2DS.2DL-?R, wykazującą występowanie chromosomu 2D z niewielkim fragmentem pochodzenia żytniego na dystalnym końcu 2DL. Odmiana ta wykazywała odporność w stosunku do mączniaka prawdziwego oraz rdzy źdźbłowej [ZHOU i wsp. 2012].

W temeraturze 20°C podział mejotyczny u *Secale cereale* trwa ok. 51 godzin, u *Triticum durum* – ok. 31 godzin, a u hybrydy tych dwóch gatunków – *Triticosecale* ok. 36h [BENNET 1974]. Różnice w czasie trwania mejozy u form rodzicielskich oraz wspomniane wyżej zmiany strukturalne chromosomów rodzicielskich oraz modyfikacje genomowe mogą prowadzić do anormalnych zmian w funkcjonowaniu jądra w trakcie mejozy u pszenżyta. Wynikiem tego może być przedwczesne rozłączanie się biwalentów, występowanie uniwalentów oraz powstawanie aneuploidalnych gamet [RUPERT i wsp. 1973; SILKOVA i wsp. 2012], co prowadzi do sterylności nasion pszenżyta.

Prowadzone są liczne prace nad udoskonalaniem cech agronomicznych pszenżyta, a także nad zwiększaniem odporności na czynniki biotyczne i abiotyczne. Pomimo wysokiego plonowania i niskich wymagań odżywczych i glebowych, pszenżyto jest głównie stosowane jako zboże paszowe. Obecnie w Polsce jedyną odmianą stosowaną do wypieku chleba jest ‘Pawo’, lecz jej zastosowanie jest ograniczone do rynku lokalnego [KORBAS i MRÓWCZYŃSKI, 2011]. Przyczyną tego jest słaba jakość wypiekowa pszenżyta w stosunku do pszenicy. Prowadzone są jednak liczne badania nad doskonaleniem cech użytkowych pszenżyta, w tym nad zwiększeniem wartości wypiekowej zboża [DIVASHUK i wsp. 2010]. W

tym celu Łukaszewski [LUKASZEWSKI 2006] za pomocą wielopunktowej translokacji wprowadził loci genów kodujących zapasowe białka ziaren zbóż – *Gli-1* i *Glu-1*, zlokalizowane na chromosomie 1D, na miejsce genów kodujących sekaliny *Sec-1* i *Sec-3*, zlokalizowane na chromosomie 1R. Opisane manipulacje były możliwe, ponieważ chromosomy 1R i 1D (lub 1B) wykazują homeologię. Dużo prostszą manipulacją byłoby zastosowanie substytucji całego chromosomu 1R na 1D [LUKASZEWSKI 2006]. Jednak krótkie ramię chromosomu 1R wpływa na zwiększenie biomasy korzeniowej [EHDAIE i wsp. 2003], a także niesie geny odporności na wiele chorób [WANG i wsp. 2009], stanowiąc istotną część genomu pszenżyta. Substytucje i translokacje występujące u pszenżyta są także wykorzystywane do tworzenia biotestów opartych na zjawisku allelopatii. Substytucje 1R oraz 2R chromosomami pszenicznymi były identyfikowane u roślin o wysokiej aktywności allelopatii. Fakt ten może być wykorzystany do zwiększenia zdolności hamowania rozwoju chwastów przez rośliny uprawne [BERTHOLDSSON i wsp. 2012]. Do heksaploidalnego pszenżyta (AABBRR) wprowadzano chromosomy genomu D pszenicy poprzez substytucje 1A/1D oraz 3A/3D. Spowodowało to uzyskanie przez badane linie pszenżyta odporności na patogennego grzyba *Puccinia triticina* oraz odporności na porastanie, odzwierciedlające się w zwiększonej zdolności spoczynkowej nasion, wysokiej liczbie opadania oraz niskiej aktywności α-amylazy w ziarnie [SODKIEWICZ i wsp. 2011].

Podejmowane są próby transferu użytecznych agronomicznie cech do pszenżyta poprzez krzyżowanie z gatunkami oddalonymi taksonomicznie, np. z *Aegilops* spp. [GRUSZECKA i KOWALCZYK, 2002; KWIATEK i wsp. 2012], z *Agrotriticum sp.* czy też *Dasypyrum sp.* [ARSENIUK i wsp. 1998]. U pszenżyta typu ozimego wykorzystywano także międzygenomową translokację T5AL.5RL, dzięki której doszło do eliminacji dominującego genu jarości (*Vrn1*) z chromosomu 5A [ŁAPIŃSKI 2003].

Pierwsze próby wytworzenia nowego zboża – pszenżyta, łączącego genomy gatunków rodzicielskich pszenicy (*Triticum* sp.) i żyta (*Secale* sp.) miały miejsce w latach 70-tych XIX wieku. Zgodnie z wizją pierwszych naukowców pracujących nad hybrydą, pszenżyto powinno łączyć najlepsze cechy obu gatunków rodzicielskich, pszenicy – wysokoplenność, wysoką wartość ziarna (dużą zawartość skrobi oraz białka o korzystnym składzie aminokwasowym) i możliwość wielorakiego zastosowania do produkcji artykułów spożywczych, oraz żyta – zdolność adaptacji do trudnych warunków glebowych, mrozoodporność, odporność na choroby, tolerancję na suszę oraz niskie nakłady w produkcji żyta [MERGOUM i GOMÉZ-MCPHERSONS, 2004].

Genetycznie pszenżyto (X *Triticosecale* Wittmack) jest stabilnym amfiploidem niosącym genomy pszenicy zwyczajnej (*Triticum aestivum* L., 2n=42=AABBDD) lub pszenicy durum (*Tritiicum durum*, 2n=28=AABB), jako formy matecznej oraz diploidalnego żyta (*Secale cereale* L., 2n=14=RR), jako formy ojcowskiej. Większość dzisiejszych upraw stanowi pszenżyto typu heksaploidalnego [MERGOUM i GOMÉZ-MCPHERSONS, 2004]. Pierwotne prace prowadzone były na pszenżycie oktoploidalnym (2n=56=AABBDDRR) [MEISTER

1928; TIUMIAKOV 1930]. Pierwsze doniesienie o hybrydzie pszenica-żyto pochodzi z 1875 roku [MERGOUM i GOMÉZ-MCPHERSONS, 2004]. Wilson (1974) w Edynburgu otrzymał rośliny o cechach pośrednich pomiędzy dwoma gatunkami rodzicielskimi, jednak uzyskane rośliny były sterylne, wytwarzające całkowicie dysfunkcyjne ziarna pyłku.

Z definicji, pierwotne pszenżyto jest płodnym potomkiem, powstałym w wyniku międzyrodzajowej hybrydyzacji, po której następuje podwojenie chromosomów, formy mateczne gatunku *Triticum* oraz formy ojcowskiej gatunku *Secale* [TARKOWSKI 1989]. Pierwsze płodne pszenżyto pierwotne uzyskał niemiecki hodowca Rimpau w 1888 roku [RIMPAU 1891]. Rośliny te zawierały 56 chromosomów [LINSCHAU i OEHLER, 1935], a więc były formami oktoploidalnymi, a analizy serologiczne potwierdziły występowanie składników białkowych pochodzących od obu gatunków rodzicielskich [MORITZ 1933]. Hybrydy te zostały uznane za pierwsze stabilne pszenżyto. Mieszaniec ten był ponad 40 lat hodowany na Uniwersytecie Rolniczym w Wiedniu [TSCHERMAK-SEYSENEGG 1936], gdzie prowadzono również liczne badania nad pszenżytem typu oktoploidalnego. W latach 30-tych Müntzing przeprowadził krzyżowanie pszenżyta oktoploidalnego z pszenicą zwyczajną, w celu poprawy cech agronomicznych pszenżyta [MŰNTZING 1955]. W wyniku tego krzyżowania powstało potomstwo przewyższające plennością pierwotną formę pszenżyta, jednak nadal ustępujące pszenicy pod względem plonu, głównie ze względu na częściową sterylność, tendencję do wylegania oraz słabego wypełniania ziarna [MERGOUM i GOMÉZ-MCPHERSONS, 2004]. Müntzing stwierdził, iż ze względu na niekorzystne cechy i trudności w pracy nad oktoploidami, dalsze prace nad nowym gatunkiem zboża uprawnego muszą skupić się na formach heksaploidalych.

Duże znaczenie zwłaszcza w tworzeniu form heksaploidalnych pszenżyta odegrało wprowadzenie metody podwajania chromosomów roślinnych przy użyciu kolchicyny, substancji chemicznej wyizolowanej z nasion zimowita jesiennego (*Colchicum autumnale*) [BLAKESLEE i AVERY, 1937]. Mieszańce pszenżyta odgrywające ważniejszą rolę w programach hodowlanych w Północnej Ameryce i Europie pochodziły z krzyżowań pomiędzy uprawnymi odmianami tetraploidalnej pszenicy oraz żyta. Ich uzyskiwanie było ułatwione poprzez wykorzystane kolchicyny oraz rozwój technik kultur zarodkowych na sztucznym podłożu [MERGOUM i GOMÉZ-MCPHERSONS, 2004]. Druga połowa XX wieku obfitowała w prace nad nowym ewolucyjnie rodzajem zboża w różnych krajach. W 1948 roku O'Mara uzyskał mieszańce pierwotne heksaploidalnego pszenżyta na Uniwersytecie w Missouri, Stany Zjednoczone, inne hybrydy zostały wyprodukowane w Japonii przez Nakajima [NAKAJIMA 1950], w Hiszpanii przez Sànchez-Monge [SÀNCHEZ-MONGE 1959], na Węgrzech przez Kiss [KISS 1971] oraz w Związku Radzieckim przez Pissarev [PISSAREV 1966]. Prowadzone od 1959 roku programy hodowlane i cytogenetyczne obejmujące selekcję udoskonalonych rekombinantów, a także uzyskiwanie nowych form pierwotnych pszenżyta prowadzone na Uniwersytecie w Manitoba, Kanada, doprowadziły do stworzenia kolekcji oryginalnych mieszańców pszenżyta z całego świata. W latach 50-tych XX wieku zespoły

naukowców prowadzone przez Kiss oraz Pissrev prowadziły krzyżowania pomiędzy oktoploidalnymi i heksaploidalnymi formami pszenżyta, uzyskując potomstwo mieszańców wtórnych z udoskonalonymi cechami agronomicznymi w porównaniu do swoich form rodzicielskich [KISS 1971; PISSAREV 1966]. Mieszańce wtórne cechowały się stabilną mejozą, wysoką płodnością, dobrą jakością ziaren, niższą aktywnością amylazy oraz wyższą zawartością lizyny [ZILLINSKY 1974]. Kiss uzyskał dwie, pierwsze odmiany pszenżyta: 'Triticale No.57' oraz 'Triticale No.64', które zostały włączone w program National Yield Trials w 1965 roku, a następnie po trzech latach zostały dopuszczone do komercyjnej produkcji i rok później zajmowały już 40 000 ha uprawnych na Węgrzech. W 1969 roku dwie inne odmiany: kanadyjska 'Rosner' oraz hiszpańska 'Cachurulu' [SÀNCHEZ-MONGE 1973] zostały wprowadzone do produkcji towarowej, a w 1970 roku Kiss opatentował niemiecką odmianę 'Bökölö' [ARSENIUK 2002]. W 1966 roku rozpoczęto prace nad pszenżytem w ośrodku CIMMYT pod kierownictwem N.E. Borlaug, a następnie Zillinsky (od 1968 roku). Celem CIMMYT było stworzenie zboża, które byłoby konkurencyjne w stosunku do innych zbóż uprawnych, szczególnie w zakresie poprawy żywienia ludzi w krajach rozwijających się [ZILLINSKY 1974]. Pierwsze prace dotyczyły głównie wykorzystania kolekcji genotypów pszenżyta z Uniwersytetu Manitoba w celu ich skrzyżowania z meksykańską, niewrażliwą na fotoperiod, pszenicą karłową oraz selekcję potomstwa w skrajnie różnych środowiskach. Wynikiem tych doświadczeń było uzyskanie w roku 1968 odmiany 'Armadillo' o wyższej płodności, jakości ziarna oraz niewrażliwości na fotoperiod [ZILLINSKY i BORLAUG, 1971]. Do końca roku 1970 'Armadillo' znajdowało się w rodowodach właściwie każdej linii pszenżyta [MERGOUM i GOMÉZ-MCPHERSONS, 2004]. Kolejne prace dotyczyły wprowadzania dodatkowych cech do pszenżyta, takich jak odporność na wyleganie poprzez skróconą słomę, wysokoplenność oraz szersza adaptacja. Przeprowadzono krzyżowania pomiędzy podstawowym oktoploidem 'Maya 2' (opartym na częściowo karłowatej pszenicy 'INIA 66') a odmianą 'Armadillo'. W wyniku tych krzyżowań uzyskano odmianę 'M2A' stanowiącą formę rodzicielską dla wielu odmian (np. 'Mapache'), których średni plon w latach 1977-1978 był wyższy od plonów każdej z 50 najlepszych pszenic CIMMYT [ZILLINSKY 1985]. Po 15 latach od uzyskania pierwszej hybrydy pszenica-żyto (po 30 cyklach selekcji) w Meksyku pszenżyto uznano za globalnie skomercjalizowaną roślinę uprawną. Do 2000 roku w wyniku działalności CIMMYT stworzonych zostało 146 odmian pszenicy jarej w 23 krajach na pięciu kontynentach.

W Polsce zainteresowanie pszenżytem było związane z występowaniem dużej ilości gleb lekkich i zakwaszonych w puli gruntów ornych, a co za tym idzie dużym udziałem żyta w produkcji zbożowej. Pszenżyto wydawało się być alternatywą dla żyta [ARSENIUK 2002]. W Polsce w 1982 roku T. Wolski zarejestrował pierwszą odmianę pszenżyta – 'Lasko'. [ARSENIUK 2002]. Mimo, iż odmiana ta charakteryzowała się niską mrozoodpornością i praktycznie nie była uprawiana w Polsce, to weszła do rejestrów wielu innych państw, w tym Niemiec czy Francji. Obecnie 'Lasko' znajduje się w rodowodach większości współcześnie uprawianych odmian [ARSENIUK i OLEKSIAK, 2009]. Do znaczących polskich odmian

pszenżyta należą zarejestrowane w 2000 roku odmiany ‘Tornado’, ‘Kitaro’ i ‘Kazo’, wykazujące się wysokim potencjałem plonowania, oraz mrozoodporna odmiana ‘Janko’. Odmiany o skróconych słomach, wykazujące podwyższoną odporność na wyleganie to ‘Bogo’ (1993 rok), ‘Fidelio’ i ‘Woltario’ (1997 rok) [ARSENIUK 2002]. W 1998 roku firma DANKO Hodowla Roślin Sp. z o.o zarejestrowała odmianę pszenżyta ozimego ‘Lamberto’ [http://www.coboru.pl/Polska/odm_szczegoly.aspx?nrodm=1828]. W wyniku prac prowadzonych w licznych ośrodkach naukowych (dawnego Zjednoczenia Hodowli Roślin Uprawnych, Instytutu Hodowli i Aklimatyzacji Roślin, Akademii Rolniczej w Lublinie przez Cz. Tarkowskiego) Polska stała się wiodącym krajem w uprawie pszenżyta. W 2011 roku obszar upraw pszenżyta w Polsce wynosił blisko 1.3 mln ha, natomiast zbiory wynosiły 4.2 mln ton. Dla porównania obszar uprawy pszenicy stanowił 2.3 mln ha, a zbiory wyniosły 9.3 mln ton, dla żyta były to wartości odpowiednio 1.1 mln ha oraz 2.6 mln ton [CYPELT 2011].

Największymi producentami pszenżyta na świecie są: Polska (około 1.3–1.5 mln ha), Niemcy, Białoruś i Rosja (0.5 mln ha) oraz Francja (0.4 mln ha). Wzrost powierzchni zasiewów pszenżyta w Polsce nastąpił kosztem zmniejszenia uprawy przede wszystkim żyta i pszenicy. Polskie odmiany uważa się powszechnie za najwydajniejsze na świecie i dlatego są zarejestrowane w większości krajów europejskich, gdzie stanowią do 70–80% odmian uprawy pszenżyta [KORBAS i MRÓWCZYŃSKI, 2011].

1.2. *Blumeria graminis* – patogen grzybowy pszenżyta

1.2.1. Charakterystyka *Blumeria graminis*

Mączniak prawdziwy to pospolita choroba zbóż, traw i innych roślin uprawnych, wywoływana przez patogennego grzyba - *Blumeria graminis* DC. (synonim *Erysiphe graminis* DC.). Ze zbóż najczęściej poraża pszenicę i jęczmień, w nieco mniejszym stopniu żyto i owies. Znaczenie choroby od niedawna jest także podkreślane w hodowli pszenżyta – zboża, które na tle gatunków rodzicielskich przez wiele lat wyróżniało się zdecydowanie wyższą zdrowotnością lub wręcz całkowitą odpornością na porażenie przez *Blumeria graminis* [KOWALCZYK 2005]. Zboża są porażane przez cztery spośród ośmiu rozpoznanych w gatunku *B. graminis* form specjalnych. Wszystkie gatunki z rodzajów *Hordeum*, *Secale* i *Triticum* porażane są odpowiednio przez *B. graminis* f. sp. *hordei*, *B. graminis* f. sp. *secalis* i *B. graminis* f. sp. *tritici.* Gatunki *Avena* spp. i *Arrhenaterum* spp. poraża natomiast *B. graminis* f. sp. *avenae*. Pszenżyto jest także porażane przez formę specjalną f. sp. *tritici*, jednakże Wakuliński i wsp. (2007) oraz Strzembicka (2007) wskazują na występowanie na tym gospodarzu wyspecjalizowanego biotypu patogena.

1.2.2. Przebieg procesu chorobowego wywołanego przez *Blumeria graminis*

Wszystkie gatunki grzybów rodzaju *Erysiphales*, w tym *Blumeria graminis*, to pasożyty obligatoryjne, wymagające żywej rośliny-gospodarza do wzrostu i rozmnażania. Jest to

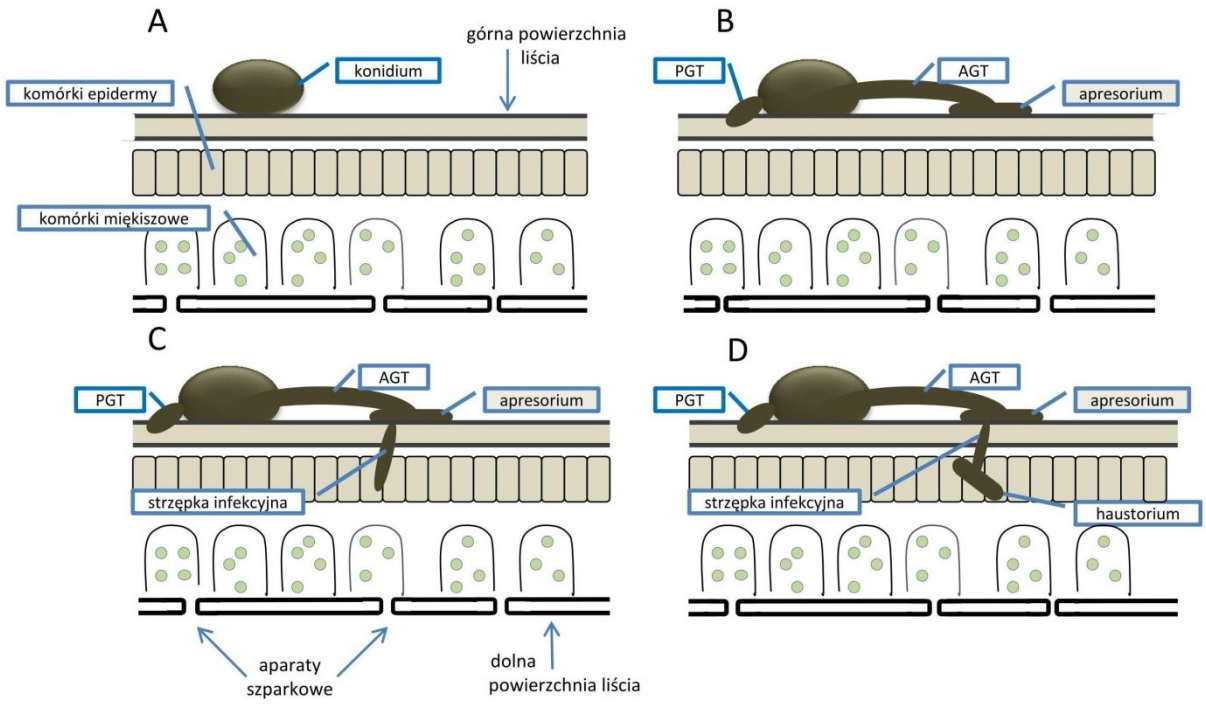
spore utrudnienie w prowadzeniu prac doświadczalnych, gdyż gatunek ten nie możne być hodowany na podłożach odżywczych w warunkach sterylnych, bez kontaktu z rośliną gospodarza [AGRIOS 2004]. Patogeneza rośliny jest złożonym procesem biologicznym, który zależy od trzech elementów: patogenu, czyli czynnika chorobotwórczego; rośliny gospodarza oraz sprzyjających warunków środowiska. Te elementy muszą działać na siebie w określonym czasie, aby mogło dojść do wystąpienia choroby, brak któregokolwiek z nich spowoduje zahamowanie lub niewystąpienie patogenezy. Choroba rozpoczyna się w momencie zetknięcia patogena z rośliną, może się natomiast skończyć śmiercią rośliny lub jej wyzdrowieniem [FIEDOROW i wsp. 2006]. Jednak mączniaki prawdziwe rzadko powodują nekrozę tkanek swojego gospodarza. Wykorzystują raczej jego substancje odżywcze, zmniejszając fotosyntezę, zwiększając respirację, transpirację oraz upośledzając wzrost rośliny [AGRIOS 2004].

Pierwszym etapem patogenezy jest infekcja (zakażenie), kiedy to dochodzi do nawiązania kontaktu patogenu z rośliną; w przypadku grzybów ma ona charakter bierny. Patogen nie dokonuje wtargnięcia do komórek rośliny, lecz wzrasta na jego powierzchni, a substancje odżywcze czerpie z komórek epidermalnych za pomocą specjalnego organu zwanego haustorium. Infekcję można podzielić na 4 fazy (Ryc. 1.1): inokulacja, pobudzenie i kiełkowanie zarodników, penetracja oraz nawiązanie pasożytniczego kontaktu z rośliną-gospodarzem. Dwie pierwsze fazy: inokulacja (moment wylądowania zarodnika konidialnego na powierzchni rośliny gospodarza – Ryc. 1.1A) oraz kiełkowanie zarodników wymagają optymalnych warunków środowiskowych, w szczególności wysokiej wilgotności oraz umiarkowanej temperatury [FIEDOROW i wsp. 2006]. Najdogodniejszą porą roku dla wzrostu i rozwoju mączniaków jest pora wiosenna, kiedy to wzrasta temperatura oraz występuje wysoka wilgotność powietrza. Mączniaki prawdziwe wykazują największą wydajność kiełkowania przy relatywnie wysokiej wilgotności wynoszącej >95% oraz w zakresie temperatur powietrza od 10 do 22°C. Rozwój choroby zostaje jednak szybko spowolniony przy temperaturze przekraczającej 25°C [TE BEEST i wsp. 2008]. Mniejszą rolę w przebiegu infekcji odgrywa światło, gdyż większość zarodników grzybów, w tym mączniak prawdziwy może kiełkować równie dobrze przy świetle, jak i w ciemności [FIEDOROW i wsp. 2006].

Z badań Te Beest i wsp. (2008) wynika, że także wiatr występujący we wczesnej porze wiosennej jest czynnikiem pogodowym wpływającym na występowanie niszczących epidemii mączniaków, a duża siła wiatru wykazuje negatywny wpływ na prawdopodobieństwo wystąpienia infekcji. Wiat odgrywa ważną rolę w procesie rozprzestrzeniania inokulum mączniaków prawdziwych, jednak jego rola jest bardziej istotna przy utrzymywaniu wysokiej wilgotności powietrza [TE BEEST i wsp. 2008].

W drugiej fazie infekcji zarodniki mączniaka prawdziwego kiełkują i po upływie 0.5-2 godzin, formują krótką, podstawową strzępkę kiełkową (PGT) o długości ok. 10 μm, a następnie, po 4-8 godzinach, „wtórną" strzępkę kiełkową (AGT) [OPALSKI i wsp. 2006] (Ryc. 1.1 B). Po 9-12 godzinach w wyniku wydłużania strzępki kiełkowej do ok. 30-40 μm, a następnie jej pęcznienia powstaje zasadniczy organ penetracyjny – ang. *appressorium*, zwany

przycistką [OPALSKI i wsp. 2006; ZHANG i wsp. 2005]. Dzięki specjalnej wydzielinie organ ten przykleja się do powierzchni rośliny, w ten sposób utrzymuje patogena na roślinie, chroniąc nawet przed silnym deszczem [HÜCKELHOVEN 2005; FIEDOROW i wsp. 2006]. Z apresorium, w wyniku jego pęcznienia, w ciągu 12 godzin wyrasta strzępka infekcyjna (ang. *infection peg*), która ma za zadanie zniszczyć błonę epidermalną gospodarza i dokonać penetracji w głąb komórki (Ryc. 1.1 C).



Ryc. 1.1. Przebieg patogenezy wywoływanej przez *Blumeria graminis*. A. Inokulacja – wylądowanie konidiospory na powierzchni rośliny gospodarza; B. Pobudzenie i kiełkowanie konidium; C. Penetracja – przedostawanie się patogenu do wnętrza rośliny; D. Nawiązanie pasożytniczego kontaktu z rośliną-gospodarzem. Objaśnienia skrótów w tekście.

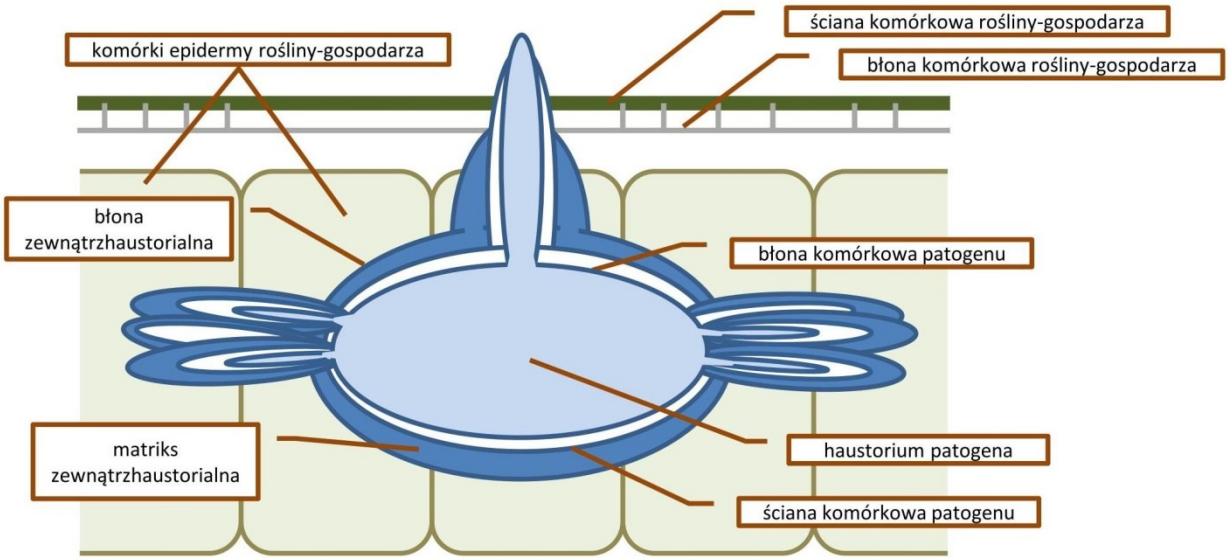
Moment wytworzenia strzępki infekcyjnej jest początkiem trzeciej fazy infekcji – penetracji. W przypadku grzybów powodujących mączniaki prawdziwe (rząd *Erysiphales*) do penetracji dochodzi najczęściej bezpośrednio przez nieuszkodzoną tkankę okrywającą pokrytą kutykulą. Penetracja zachodzi zarówno dzięki reakcjom enzymatycznym, jak i mechanicznemu uszkodzeniu tkanki przez klinowatą kształtem strzępkę infekcyjną, która wywiera silny nacisk na ścianę komórki roślinnej (około 686 kPa). Reakcje enzymatyczne polegają na wydzielaniu przez patogen odpowiednich enzymów np. kutynaz, rozkładających kutykulę oraz celulaz i pektynaz, rozkładających ścianę komórkową. Dzięki synchronizacji tych dwóch czynników wytwarzany jest w ścianie komórkowej rośliny kanalik o średnicy 0.2-2 µm, przez który przeciska się strzępka infekcyjna, dostając się do środka komórki epidermalnej. Tam powstaje palczasty organ – haustorium, którego zadaniem jest absorbowanie wody oraz substancji odżywczych z wnętrza komórki gospodarza. Organ ten jako jedyny dokonuje wtar-

gnięcia do wnętrza komórki rośliny (Ryc. 1.1 D). Powstanie haustorium kończy fazę penetracji i rozpoczyna fazę nawiązania kontaktu pasożytniczego z rośliną. Polega ona na pobieraniu przez patogen wody i substancji odżywczych, dzięki funkcjonowaniu enzymów i toksyn patogena w komórkach rośliny-gospodarza [FIEDOROW i wsp. 2006; ZHANG i wsp. 2005]. Mimo, iż haustorium to organ, który penetruje w głąb komórki gospodarza, to nie jest on zlokalizowany całkowicie wewnątrzkomórkowo. Haustorium jest bowiem oddzielone od cytoplazmy gospodarza przez specyficzną błonę komórkową wytworzoną przez zainfekowaną komórkę gospodarza, nazywaną błoną zewnątrzhaustorialną (EHM, Ryc. 1.2). Pomiędzy EHM oraz ścianą komórkową haustorium znajduje się żelowa, amorficzna, bogata w węglowodany warstwa nazywana matriks zewnątrzhaustorialną (EHMAT) [PANSTRUGA 2003]. Na przykładzie jęczmienia stwierdzono, iż pobór metabolitów w obrębie haustorium przez patogena, w tym aminokwasów i węglowodanów, najprawdopodobniej odbywa się na drodze symportu napędzanego gradientem protonów generowanym przez aktywność H^+-ATPazy występującej w błonie komórkowej haustorium [GODFREY i wsp. 2009], co może sugerować podobny mechanizm u pszenżyta.

W wyniku zasilania substancjami odżywczymi pochodzenia roślinnego patogen może wzrastać i rozwijać się, co prowadzi do formowania dodatkowej sieci grzybni oraz powstania dodatkowych apresoriów. Prowadzi to do penetracji sąsiednich komórek epidermalnych gospodarza i wytworzenia w nich kolejnych haustoriów [OPALSKI i wsp. 2006; RINGELMANN i wsp. 2009]. W ciągu roku grzyby wywołujące mączniaka prawdziwego przechodzą przez dwa wyraźne stadia, różniące się sposobem rozmnażania. Wiosną i latem wytwarzają one organy rozmnażania wegetatywnego – konidia, jesienią lub późnym latem – organy rozmnażania płciowego [SZWEYKOWSKA i SZWEYKOWSKI, 1998]. Ze względu na fakt, iż niniejsza praca dotyczy odporności pszenżyta na *Blumeria graminis* ocenianej w porze letniej, dalsze etapy przebiegu procesu chorobowego opisane są dla form wegetatywnych, wytwarzanych w okresie wiosenno-letnim.

Drugim etapem procesu chorobowego powodującego mączniaka prawdziwego jest inkubacja patogenu, czyli jego wylęganie. Podobnie jak infekcja, jest to okres bezobjawowy, trwa od czasu zakończenia etapu pierwszego – infekcji, do wystąpienia pierwszych objawów chorobowych, czyli trzeciego etapu – symptomacji (choroby właściwej). W okresie wylęgania patogen pobiera pokarm z komórek gospodarza za pomocą rozgałęzionych haustoriów, zwanych niekiedy ssawkami, będącymi wypustkami strzępek grzybniowych [FIEDOROW i wsp. 2006; ZHANG i wsp. 2005]. W przypadku mączniaków prawdziwych haustoria wytwarzane są tylko w komórkach epidermalnych rośliny, natomiast grzyby z rzędu *Uredinales* (rdzawnikowce, do których należy np. grzyb wywołujący rdzę brunatną żyta) zapuszczają ssawki, aż do komórek miękiszowych gospodarza. Etap inkubacji w okresie między majem a wrześniem trwa od 5 do 8 dni [JENKYN 1973], a więc znacznie dłużej niż infekcja. Długość trwania inkubacji zależy przede wszystkim od temperatury oraz odporności rośliny-gospodarza – u odmian bardziej odpornych wylęganie trwa dłużej, niż u mniej odpornych.

Z chwilą wystąpienia pierwszych objawów chorobowych rozpoczyna się etap choroby właściwej, symptomacji. W wyniku zmian, jakie spowodowało wtargnięcie patogenicznego grzyba do komórek gospodarza następuje zmiana przebiegu procesów fizjologicznych rośliny, a także powstają widoczne zmiany wewnątrz i na powierzchni rośliny [FIEDOROW i wsp. 2006]. W wyniku skutecznej penetracji komórki gospodarza dochodzi do proliferacji grzybni na powierzchni liścia. Po upływie około 3-5 dni od inokulacji powstają konidiospory produkujące bezpłciowe zarodniki, zwane konidiami, które mogą być rozprzestrzeniane poprzez wiatr na inne rośliny-gospodarze [FIEDOROW i wsp. 2006]. Konidia mączniaka prawdziwego to obłe, szkliste spory o średnicy od 10 do 40 µm, produkowane przez konidiofory w formie łańcuchów, z których szczytowe konidia występują w stanie najbardziej dojrzałym. Produkcja konidiów jest bardzo wydajna, pojedyncza kolonia konidioforów może formować do 200 tyś. konidiów.



Ryc. 1.2. Schematyczna budowa haustorium na podstawie Panstruga i wsp. (2003) oraz Zhang i wsp. (2005).

Patogeny grzybowe mogą zasiedlać wszystkie tkanki rośliny lub tylko niektóre z nich. Przykładem grzyba, który atakuje wszystkie organy i tkanki rośliny-gospodarza jest *Botrytis cinerea*, który powoduje chorobę zwaną szarą pleśnią. Do bardziej wyspecjalizowanych grzybów należą te z rzędu *Erysiphales*, zasiedlające tylko niektóre miejsca w roślinie. Jak już wspomniano wcześniej *Blumeria graminis* penetruje tylko do komórek epidermalnych, nie infekując komórek i głębiej położonych tkanek. Grzyb ten rozwija swoją grzybnię na powierzchni porażonych organów: liści, pędów, a nawet kwiatów. Porażone organy mają ograniczoną asymilację i zwiększoną transpirację, w związku z czym wysychają i przedwcześnie zamierają, a cała roślina jest niedożywiona [FIEDOROW i wsp. 2006]. Charakterystyczną cechą wszystkich mączniaków prawdziwych jest powstawanie mączystego, aksamitnego nalotu na różnych nadziemnych częściach roślin: liściach, łodydze, a nawet na płatkach kwiatów

zainfekowanych roślin. Nalot ten stanowią skupienia grzybni (rozwijającej się wtórnie ze strzępki kiełkującej), trzonków i zarodników konidialnych, w których po pewnym czasie powstają kleistotecja (owocniki) w postaci brunatnych ziarenek o średnicy około 0.1-0.5mm. Kształt strzępek, liczba worków w kleistotecjach oraz typ zarodnikowania konidialnego są podstawą do wyróżnienia szeregu rodzajów: *Blumeria*, *Erysiphe*, *Sphaerotheca*, *Podosphaera*, *Microsphaera*, *Uncinula*, *Phylloactina* i *Leveillula*, które występują na wielu gatunkach roślin uprawnych i dziko rosnących [EICHMANN i HÜCKELHOVEN, 2008; FIEDOROW i wsp. 2006].

1.3. Odporność roślin

Liczne czynniki stresowe, w tym patogenny grzybowe, działają na rośliny w ciągle zmieniającym się środowisku naturalnym. Jedynie patogeny, które są zdolne do uniknięcia rozpoznania i/lub zahamowania mechanizmów odpowiedzi rośliny-gospodarza, mają możliwość wywołania zmian chorobotwórczych. Odporność roślin jest więc zjawiskiem powszechnym, które jest rezultatem adaptacji ewolucyjnej roślin do warunków środowiska, zarówno pod względem czynników biotycznych, jak i abiotycznych. Odporność określana jest właściwościami rośliny, które chronią ją przed atakiem patogenu potencjalnie zdolnego do wywołania choroby [FIEDOROW i wsp. 2006]. Odporność roślin jest w rzeczywistości sumą oddziaływania trzech elementów: czynnika chorobotwórczego – patogenu, predyspozycji rośliny-gospodarza oraz wpływu środowiska. Odporność jest definiowana jako zdolność rośliny do powstrzymania rozwoju patogena (lub szkodnika). Pewnym rodzajem odporności jest tzw. tolerancja, której występowanie nie prowadzi do osłabienia plonowania. W przypadku występowania tolerancji rośliny, mimo nawiązania kontaktu pasożytniczego, patogen nie jest zdolny do zakłócenia jej funkcji fizjologicznych [KOZŁOWSKA i KONIECZNY, 2003]. Mało specyficznym i efektywnym rodzajem odporności jest tzw. odporność powszechna, inaczej niegospodarza (ang. *non-host resistance*). Jest ona definiowana jako niezdolność organizmu patogena do przełamania barier obronnych rośliny, dzięki mechanizmom ograniczającym lub uniemożliwiającym rozwój choroby. Odporność specyficzna, zwana odpornością gospodarza (ang. *host resistance*) występuje tylko wtedy, gdy określony gatunek rośliny może pełnić rolę gospodarza dla wyspecjalizowanych patogenów. Jest ona związania z współoddziaływaniem organizmu chorobotwórczego z rośliną i może być warunkowana oligo- lub poligenowo, a także wykazywać charakter pionowy lub poziomy [KOZŁOWSKA i KONIECZNY, 2003].

1.3.1. Odporność roślin warunkowana czynnikami genetycznymi

Odporność uwarunkowana genetycznie poprzez obecność jednego, kilku lub wielu genów u roślin jest nazywana odpornością właściwą. W tym rodzaju odporności gospodarz i patogen są mniej lub bardziej niekompatybilne (niezgodne) w stosunku do siebie, przy czym niezgodność ta może być warunkowana właściwościami anatomiczno-strukturalnymi, biochemicznymi (np. brak wzajemnego rozpoznania chemicznego) czy też możliwością wywo-

łania reakcji obronnych przez roślinę, aktywowanych w odpowiedzi na infekcję patogena [AGRIOS 2004; KOZŁOWSKA i KONIECZNY, 2003]. Odporność właściwa jest charakterystyczna dla określonego genotypu, często także dla odmiany rośliny, oraz dla konkretnego czynnika chorobotwórczego. Cechami tego rodzaju odporności jest relatywność oraz stopniowanie, co oznacza, że różnice w obserwowanych objawach chorobowych są względne. W kategoriach genetycznych wyróżnione zostały dwa rodzaje odporności właściwej: pozioma oraz pionowa [KOZŁOWSKA i KONIECZNY, 2003].

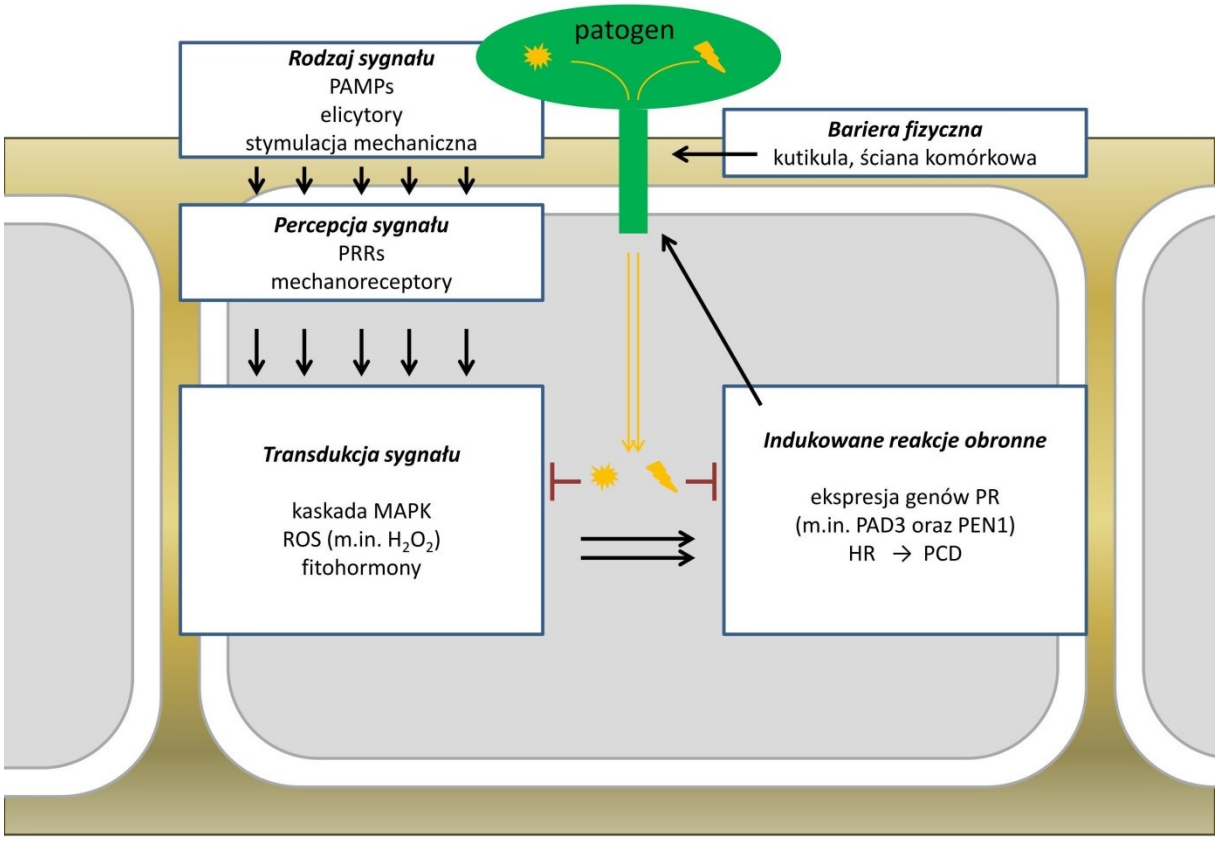
Odporność pozioma (polowa, względna, ilościowa) jest warunkowana przez geny w liczbie od kilku do kilkuset [AGRIOS 2004]. Aktywność jednego genu odporności poziomej odgrywa zwykle nieznaczną rolę. Dopiero współdziałanie kilku genów prowadzi do indukcji mechanizmów obronnych rośliny i/lub występowania procesów fizjologicznych prowadzących do wytwarzania struktur ochronnych roślin. Odporność pozioma charakteryzuje się niespecyficznością rasową, czyli jest skuteczna względem różnych ras patogenu; względną trwałością, może ulegać zmianom w zależności od warunków środowiska; oraz trudnością do przełamania, patogen potrzebuje dużo więcej czasu (w stosunku do odporności pionowej), aby ją przełamać. Nie chroni jednak całkowicie roślin przed infekcją danym patogen, ale poprzez ograniczenie jego zarodnikowania i rozprzestrzeniania, hamuje rozwój patogenu na roślinie [AGRIOS 2004; FIEDOROW i wsp. 2006; KOZŁOWSKA i KONIECZNY, 2003]. W zależności od stopnia odporności rośliny, przy niższym poziomie odporności poziomej, odpowiedź rośliny na wirulentne patogeny jest aktywowana znacznie wolniej oraz jest mniej efektywna, co w rezultacie prowadzi do rozwoju infekcji [ZHOU i wsp. 1999].

W aspekcie odporności poziomej obrona rośliny przed infekcją *Blumeria graminis* zależy od stopnia zaawansowania mechanizmów penetracji patogena. Przed wtargnięciem do komórki epidermalnej gospodarza indukowana jest obrona „przed penetracyjna", natomiast po utworzeniu strzępki infekcyjnej można mówić o obronie „po penetracyjnej" (Ryc. 1.3). Pierwsza z nich rozpoczyna się od wewnątrzkomórkowych zmian składu i struktury ściany komórkowej kształtowanych poprzez apozycję i tworzenie tzw. CWAs. CWAs tworzą papillae, charakterystyczne struktury zlokalizowane w komórkach epidermalnych zaatakowanej rośliny, przylegających do apresorium i strzępki infekcyjnej [EICHMANN i HÜCKELHOVEN, 2008; VON RÖPENACK i wsp. 1998]. CWAs mogą stanowić barierę mechaniczną i chemiczną dla czynników hydrolitycznych i osmotycznych wytwarzanych przez apresorium patogena. CWAs składają się głównie z kalozy, związków krzemu, fenoli, związków guanidyny [THORDAL-CHRISTENSEN i wsp. 1997] oraz różnorodnych białek ściany komórkowej [HÜCKELHOVEN 2005; THORDAL-CHRISTENSEN i wsp. 1997]. Do uformowania CWAs dodatkowo wymagana jest reorganizacja cytoszkieletu. U jęczmienia po ataku *B. graminis* obserwowano polaryzację cytoszkieletu aktynowego w kierunku miejsca penetracji patogena [TAKEMOTO i HARDHAM, 2004]. Stwierdzono, iż ważną rolę w reakcji obronnej rośliny odgrywają reaktywne formy tlenu, ROS. W trakcie tworzenia papillae dochodzi do nagromadzenia nadtleneku wodoru (H_2O_2), który wraz z peroksydazami, jest bezpośrednio

zaangażowany w modyfikacje ściany komórkowej poprzez lignifikację (obecnie wiadomo, iż *B.graminis* nie jest zdolny do rozpuszczania ligniny oraz katalizowaną peroksydazą polimeryzację molekuł, np. białek [HÜCKELHOVEN 2005]). Prowadzi to do wzmocnienia struktury ściany komórkowej i utrudnienia penetracji przez patogena [THORDAL-CHRISTENSEN i wsp. 1997].

Dodatkową linię defensywy przed infekcją patogenem stanowi obrona „po penetracyjna", powodująca zakłócenie zdolności do pobierania substancji odżywczych przez haustorium. Następuje indukcja reakcji nadwrażliwości (HR) i związana z nią zaprogramowana śmierć komórki (PCD), zaatakowanej i/lub kilku otaczających komórek. W tej fazie także dochodzi do akumulacji nadtlenku wodoru, który może działać na dwa sposoby. Po pierwsze stanowi cząstkę sygnałową zapoczątkowującą PCD, a po drugie jest czynnikiem grzybobójczym, niedopuszczającym do supresji śmierci komórki przez patogena [TRUJILLO i wsp. 2004]. Akumulacja jonów Fe^{3+} stymuluje także wystąpienie tzw. wybuchu oksydacyjnego w miejscu penetracji patogenu. Wybuch oksydacyjny aktywuje wiele reakcji obronnych roślin prowadzących w konsekwencji do wystąpienia HR oraz PCD [EICHMANN i HÜCKELHOVEN, 2008].

Podstawowe mechanizmy obronne rośliny mogą zostać zainicjowane, ponieważ wszystkie patogeny infekujące roślinę niosą ze sobą wzorce molekularne związane z patogenezą tzw. PAMPs [THORDAL-CHRISTENSEN i wsp. 1997]. Te wzorce są powszechnie rozpoznawane przez roślinę jako obce molekuły, w sposób porównywalny do wrodzonego układu odpornościowego u ssaków. PAMPs stanowią np. polisacharydy ściany komórkowej grzybów [NÜRNBERGER i BRUNNER, 2002] i są identyfikowane przez rozpoznające wzorce receptory tzw. PRRs znajdujące się w błonie komórkowej roślin [EICHMANN i HÜCKELHOVEN, 2008]. Dalsze etapy rozpoznania PAMPs stanowi kaskada sygnałowa kinaz MAP, produkcja ROS, przepływ jonów, indukcja genów związanych z patogenezą tzw. genów PR oraz fosforylacja białek [LIPKA i wsp. 2008]. Produktami genów PR są białka indukowane patogenezą, a należą do nich m.in. geny *PEN1* oraz *PAD3*. Produkty ekspresji genu *PEN1* ograniczają możliwość penetracji *B.graminis* [NÜRNBERGER i LIPKA, 2005]. Jednym z nich jest roślinna syntaksyna, która występuje w miejscu ataku patogenu oraz jest odpowiedzialna za czasową depozycję kalozy oraz elementów błony zewnątrzkomórkowej rośliny [NIELSEN i THORDAL-CHRISTENSEN, 2012]. Ekspresja genu *PAD3* związana jest z produkcją kamaleksyny, niskocząsteczkowej fitoaleksyny, będącej metabolitem wtórnym syntetyzowanym *de novo* w odpowiedzi na infekcję patogenu. Kamaleksyna jest gromadzona w miejscu penetracji patogenu w stężeniach hamujących jego rozwój. Według Zhou i wsp. (1999) mutanty *Arabidopsis* z niedoborem fitoaleksyny – *pad3*, (ang. *phytoalexin deficient 3)* wykazywały ograniczoną odporność na infekcję *B.graminis*.



Ryc. 1.3. Złożony schemat rozpoznania patogena przez roślinę niegospodarza i indukcji reakcji obronnych. Objaśnienia skrótów w tekście. W oparciu o pracę Nürnberger i Lipka (2005).

Odporność pionowa (wertykalna, główna, jakościowa), związana z genami R, jest rasowo specyficzna. Geny odporności na choroby u roślin – geny R, kodują białka rozpoznające patogena. Mechanizm tej odporności oparty jest na hipotezie ‘gen na gen’ [STASKAWICZ 2001]. Podstawą tej teorii jest fakt, iż rośliny posiadają pojedyncze geny odporności, które specyficznie rozpoznają patogeny, posiadające komplementarne geny awirulencji. Geny awirulencji są definiowane jako geny patogena, kodujące odpowiednie produkty białkowe, które mogą być rozpoznane bezpośrednio lub pośrednio tylko przez te rośliny, które posiadają komplementarne geny R (teoria komplementarności genów) [BORRÁS-HIDALGO 2004; EICHMANN i HÜCKELHOVEN, 2008]. Odporność ‘gen-na-gen’ nie jest wyzwalana przez wirulentne patogeny [ZHOU i wsp. 1999]. Odporność rośliny może być zapewniona przez pojedynczy gen odporności, jak w przypadku jęczmienia, gdzie całkowita odporność jest warunkowana występowaniem dwóch recesywnych alleli genu *Mlo* [PANSTRUGA 2005]. U pszenicy zidentyfikowano liczne geny podobne do *Mlo*. Obecnie poznanych jest 48 loci genów odporności na mączniaka prawdziwego [GAO i wsp. 2012]. Odmiany z odpornością monogeniczną charakteryzują się zdolnością do efektywnej obrony przed infekcją patogena w każdych warunkach środowiskowych, jednak tylko do czasu, gdy odmiana ta nie zetknie się z nową rasą patogenu, zdolną do przełamania odporności warunkowanej genami R danej rośli-

ny [PANSTRUGA 2005]. Odporność pionowa nie jest więc cechą stałą. W wyniku mutacji lub rekombinacji genetycznej pojawiają się nowe rasy patogena posiadające zdolność do przełamania mechanizmów obronnych rośliny warunkowanych przez geny R. Dochodzi wtedy do tzw. „załamania się odporności". W przypadku zetknięcia się patogena z genem awirulencji z rośliną posiadającą komplementarny gen R, najczęściej dochodzi do inicjacji reakcji obronnych w postaci reakcji nadwrażliwości, prowadzącej do śmierci komórki przez PCD [EICHMANN i HÜCKELHOVEN, 2008]. W takim przypadku odpowiedź rośliny jest bardzo szybka i nie dochodzi do rozwoju choroby.

Odporność specyficzna rasowo jest zwykle wykrywana w stadium siewki i jest aktywna we wszystkich etapach rozwoju rośliny. Odporność niespecyficzna rasowo, czyli pozioma, jest wykrywana tylko w stadium rośliny dojrzałej i dlatego jest niekiedy nazywana odpornością rośliny dojrzałej – APR [HEITEFUSS 1997; VAN DER PLANK 1963], *slow rusting* lub *mildewing* [MATYSIK i NITA 2008].

Zjawisko częściowej odporności (ang. *partial resistance*) [PARLEVLIET 1979], w przypadku mączniaka prawdziwego nazywane *slow mildewing* [SHANER 1973], charakteryzuje się zredukowanymi objawami chorobowymi oraz zmniejszonym rozprzestrzenieniem infekcji, pomimo reakcji wrażliwości. Choroba rozwija się powoli i nie następuje indukcja reakcji nadwrażliwości. Pojedyncze geny *slow mildewing* warunkują niewielką redukcję postępów choroby, ale kombinacja kilku tych genów wywołuje efekt addytywności i znacznie zwiększa odporność rośliny [OHM i SHANER, 1976]. Wskazuje to na fakt, iż odporność na *Blumeria graminis* ma charakter ilościowy, gdyż w przebiegu infekcji pojawiają się fenotypy o zróżnicowanym porażeniu [RUBIALES i wsp. 2001]. Badania wskazują, iż częściowa odporność warunkowana przez wiele genów jest bardziej trwała niż rasowo specyficzna. Przełamanie przez patogena odporności poziomej wymaga posiadania przez niego kilku genów wirulencji. Kombinacja genów warunkujących odporność poziomą i pionową zwiększyłaby efektywność obrony przed infekcją [LIU i wsp. 2000; WANG i wsp. 2005].

1.4. Podłoże genetyczne odporności na mączniaka prawdziwego

Odporność pszenżyta na mączniaka prawdziwego może mieć charakter ilościowy lub jakościowy. Scharakteryzowanych zostało wiele genów, których kumulacja u danej odmiany (tzw. piramidyzacja) może w znaczący sposób poprawić zdrowotność roślin. Geny odporności na mączniaka prawdziwego wywoływanego przez patogena grzybowego *Blumeria graminis* są oznaczane jako *Pm* (ang. *powdery mildew*), z odpowiednim indeksem cyfrowym lub literowym. Obecnie u pszenicy zidentyfikowanych jest 48 loci genów odporności na mączniaka prawdziwego, zlokalizowanych na 18 różnych chromosomach [MCINTOSH i wsp. 2010]. Geny te są rozróżniane na podstawie reakcji roślin na zestawy izolatów w stadium siewki, jednak wykazują one aktywność również w późniejszych stadiach rozwojowych rośliny [MOHLER i wsp. 2011]. Geny odporności na mącznika prawdziwego są nierównomiernie rozmieszczone w genomie pszenicy i tworzą klastry w regionach bogatych w geny.

W Tabeli 1.1 zebrano informacje o lokalizacji chromosomowej, pochodzeniu oraz dostępnych markerach genetycznych znanych 70 genów/alleli odporności na mączniaka. U pszenicy, dziewięć loci genów *Pm* zostało zidentyfikowanych w 1 grupie homeologicznej, a tylko jeden gen (*Pm16*) znaleziono w 4 grupie homeologicznej [READER i MILLER, 1991]. Odporność na mączniaka może być warunkowana w loci, dla których poznano serie alleli wielokrotnych. Wyróżniono osiemnaście różnych alleli locus *Pm3* zlokalizowanego na krótkim ramieniu chromosomu 1A [BHULLAR i wsp. 2009; SRICHUMPA i wsp. 2005; YAHIAOUI i wsp. 2009; ZELLER i wsp. 1993]. Zidentyfikowano także pięć alleli odporności genu *Pm1* na chromosomie 7AL [HSAM i wsp. 1998; SINGRŰN i wsp. 2003], cztery allele genu *Pm4* na chromosomie 2AL [HAO i wsp. 2008; THE i wsp. 1979] oraz pięć alleli genu *Pm5* na chromosomie 7BL [HSAM i wsp. 2001; HUANG i wsp. 2003]. Obecnie, dla pozostałych 37 loci znane są pojedyncze allele determinujące odporność.

Numeracja genów *Pm* zmieniała się w miarę pojawiania się wyników analiz z wykorzystaniem markerów genetycznych. Przeniesione z żytniego chromosomu 1RS geny *Pm8* oraz *Pm17* zostały zlokalizowane odpowiednio na chromosomach 1BL.1RS oraz 1AL.1RS [HEUN i wsp. 1990]. Prace prowadzone przez Hsam i Zeller (1997) wskazują na fakt, iż geny *Pm8* i *Pm17* są formami allelicznymi. Podobnie, geny *Pm18* i *Pm22* zostały nazwane odpowiednio *Pm1c* i *Pm1e* [HSAM i wsp. 1998; SINGRŰN i wsp. 2003], a gen *Pm23* uznano za allel *Pm4c* [HAO i wsp. 2008].

Wiele genów *Pm* pochodzi z form dzikich spokrewnionych z pszenicą [SHI i wsp. 1998]. Pszenica *Triticum turgidum* var. *dicoccoides* (2n=4x=28, AABB) jest przodkiem odmian pszenicy tetraploidalnej i heksaploidalnej. Jest więc ważnym źródłem genów do wspomagania hodowli pszenicy zwyczajnej, a pośrednio również pszenżyta. Z *Triticum turgidum* var. *dicoccoides* do heksaploidalnej pszenicy *Triticum aestivum* zostały przeniesione geny odporności na *B. graminis* – *Pm16*, *Pm26* i *Pm30* [READER i MILLER, 1991; RONG i wsp. 2000; LIU i wsp. 2002], natomiast gen *Pm36* został przeniesiony do *Triticum durum* [BLANCO i wsp. 2008]. Z *Aegilops squarrosa* (2n=2x=14, DD) do pszenicy zostało przeniesionych 7 genów, w tym *Pm2*, *Pm12*, *Pm13*, *Pm19*, *Pm32*, *Pm34* oraz *Pm35* [CEOLONI i wsp. 1992; HSAM i wsp. 2003; JIA i wsp. 1996; LUTZ i wsp. 1994; MA i wsp. 1994; MIRANDA i wsp. 2006; MIRANDA i wsp. 2007], natomiast z *Aegilops ovata* do pszenicy przeniesiony został gen *Pm 29* [ZELLER i wsp. 2002]. U żyta zidentyfikowano 9 genów odporności na mączniaka prawdziwego na każdym chromosomie oprócz 7R. Z *Secale cereale*, poprzez wykorzystanie linii translokacyjnych dokonano transferu 4 genów odporności na mącznika prawdziwego do pszenicy [FRIEBE i wsp. 1994; HEUN i wsp. 1990; HSAM i ZELLER, 1997].

Najczęściej odporność pszenicy w stadium siewki ma przełożenie na odporność polową roślin. Ponadto, w fazie rośliny dorosłej (APR) istnieje możliwość wystąpienia odporności, której nie da się wykryć testami inokulacyjnymi prowadzonymi w stadium siewek. APR obejmuje działanie wszystkich genów odporności zarówno specyficznych, jak i niespecyficz-

nych rasowo. Do znanych genów zapewniających odporność zarówno w fazie siewki, jaki i rośliny dorosłej należą: *Pm12*, *Pm16*, *Pm20* i *Pm21* [MATYSIK i NITA, 2008]. Większość genów *Pm* wykazuje charakter dominujący, jednak 12 z nich należy do genów recesywnych (*Pm5a-Pm5e*, *Pm9*, *Pm26*, *mlRD30*, *pmY212*, *pm2026*, *pm42*, *mlxbd*, *PmLK906*) [FU i wsp. 2013]. Wskazuje to na zróżnicowany mechanizm odporności na mączniaka prawdziwego.

Jednym ze sposobów lokalizacji genów odporności jest mapowanie genomu przy wykorzystaniu markerów molekularnych opartych na DNA. Markery DNA identyfikują różnice w sekwencji fragmentów DNA. Identyfikacja specyficznych sekwencji DNA może być wykorzystywana do wykrywania genów *Pm* u danej odmiany, wskazywania i/lub weryfikacji ich lokalizacji chromosomowej, badania alleliczności genów oraz sposobu przekazywania genów potomstwu [CHEN i CHEŁKOWSKI, 1999]. Mapowanie genów odporności u roślin umożliwia badanie mechanizmów molekularnych, ewolucji odporności na choroby oraz służy opracowaniu markerów do selekcji wspomaganej markerami – MAS. MAS ułatwia tworzenie odmian o zwiększonej odporności na mączniaka prawdziwego.

Tabela 1.1. Lokalizacja chromosomowa i pochodzenie genów odporności na *Blumeria graminis* u pszenicy oraz żyta wraz ze sprzężonymi markerami molekularnymi.

Lp.	Gen	Lokalizacja	Odmiana/ linia	Źródło	Referencje	Rodzaj markera	Nazwa markera	Referencje
1	2	3	4	5	6	7	8	9
1	*Pm1a*	7A	Axminster	*T. aestivum*	Hsam i wsp. 1998	AFLP STS SSR sonda DNA AFLP	*E39M58-77* *E34M53-439* *sts638* *gwm344* *CDO347* *18M2*	Stępień i wsp. 2004 Singrün i wsp. 2003 Stępień i wsp. 2004 Ma i wsp. 1994 Hartl i wsp. 1999
2	*Pm1b*	7A	MocZlatka	*T. aestivum*	Hsam i wsp. 1998			
3	*Pm1c*	7A	Weihenstephan Stamm M1N	*T. aestivum*	Hsam i wsp. 1998			
4	*Pm1d*	7A	*T.spelta* var *duhamelianum*	*T. spelta*	Hsam i wsp. 1998			
5	*Pm1e*	7A	Virest	*T. aestivum*	Singrun i wsp. 2003			
6	*Pm2*	5DS	Braunschweig	*Aegilops squarrosa*	Ma i wsp. 1994	RFLP	*BCD1871, whs350*	Ma i wsp. 1994 Mohler i Jahoor, 1996
7	*Pm3a*	1AS	Asosan	*T. aestivum*	Zeller i wsp. 1993	RFLP SSR STS	*whs179, bcd1434* *psp2999, gwm905* *Starter (UP3B, UP1A)*	Hartl i wsp. 1993 Ma i wsp. 1994 Bougot i wsp. 2002 Yahiaoui i wsp. 2006
8	*Pm3b*	1AS	Chul	*T. aestivum*	Zeller i wsp. 1993			
9	*Pm3c*	1AS	Sonora	*T. aestivum*	Zeller i wsp. 1993			

1	2	3	4	5	6	7	8	9
10	*Pm3d*	1AS	Kolibri	*T. aestivum*	Zeller i wsp. 1993			
11	*Pm3e*	1AS	W150	*T. aestivum*	Zeller i wsp. 1993			
12	*Pm3f*	1AS	Michigan Amber	*T. aestivum*	Zeller i wsp. 1993			
13	*Pm3g*	1AS	Aristide	*T. aestivum*	Zeller i wsp. 1993			
14	*Pm3h*	1AS	Abessi	*T. aestivum*	Srichumpa i wsp. 2005			
15	*Pm3i*	1AS	N324	*T. aestivum*	Srichumpa i wsp. 2005			
16	*Pm3j*	1AS	GUS122	*T. aestivum*	Srichumpa i wsp. 2005			
17	*Pm3k*	1AS	H22	*T. dicoccoides*	Yahiaoui i wsp. 2009			
18	*Pm3l*	1AS	IG 42431	*T. aestivum*	Bhullar i wsp. 2009			
19	*Pm3m*	1AS	IG 42453	*T. aestivum*	Bhullar i wsp. 2009			
20	*Pm3n*	1AS	VIR 23728	*T. aestivum*	Bhullar i wsp. 2009			
21	*Pm3o*	1AS	AUS 10963	*T. aestivum*	Bhullar i wsp. 2009			
22	*Pm3p*	1AS	VIR 20918	*T. aestivum*	Bhullar i wsp. 2009			
23	*Pm3q*	1AS	IG 43026	*T. aestivum*	Bhullar i wsp. 2009			
24	*Pm3r*	1AS	IG 42868	*T .aestivum*	Bhullar i wsp. 2009			
25	*Pm4a*	2AL	Khapli	*T. dicoccum*	The i wsp. 1979	RFLP SSR	*bcd1231, cdo678* *bcd292* *gwm356, gbx3119b*	Ma i wsp. 1994

1	2	3	4	5	6	7	8	9
26	*Pm4b*	2AL	Armada	*T .carthlicum*	The i wsp. 1979			
27	*Pm4c*	2AL	Line 81-7241	*T. aestivum*	Hao i wsp. 2008			
28	*Pm4d*	2AL	Tm27d2	*T. monococcum*	Schmolke i wsp. 2012			
29	*Pm5a*	7BL	Hope/Selpek	*T. dicoccum*	Hsam i wsp. 2001	SSR	*gwm1267, gwm783*	Huang i wsp. 2003
30	*Pm5b*	7BL	Ibis/Kormoran	*T. aestivum*	Hsam i wsp. 2001			
31	*Pm5c*	7BL	Kolandi	*T. sphaerococcum*	Hsam i wsp. 2001			
32	*Pm5d*	7BL	IGV 1-455	*T. aestivum*	Hsam i wsp. 2001			
33	*Pm5e*	7BL	Fuzhuang 30	*T. aestivum*	Huang i wsp. 2003			
34	*Pm6*	2BL	TP 114	*T. timopheevi*	Jørgensen 1973	RFLP RAPD	*bcd135, bcd307* *bcd266* *OPV20*	Wang i wsp. 2000
35	*Pm7*	4BS.4BL-2RL	Transec	*Secale cereale*	Friebe i wsp. 1994			
36	*Pm8*	1RS.1BL	Disponent	*Secale cereale*	Hsam i Zeller, 1997			
37	*Pm9*	7AL	Normandie	*T. aestivum*	Hsam i wsp. 1998			
38	*Pm10*	1D	Norin 26	*T .aestivum*	Tosa i wsp. 1987			
39	*Pm11*	6BS	Chinese Spring	*T. aestivum*	Tosa i wsp. 1988			
40	*Pm12*	6BS-6SS.6SL	Line #31	*Aegilops speltoides*	Jia i wsp. 1996	RFLP SSR	*psr551* *wmc105, cau127*	Jia i wsp. 1996 Song i wsp. 2007
41	*Pm13*	3B, 3D	CS Trans. line	*Aegilops longissima*	Ceoloni i wsp. 1992	RFLP	*cdo460, utv135*	Cenci i wsp. 1999

1	2	3	4	5	6	7	8	9
42	*Pm14*	6BS	Norin 10	*T. aestivum*	Tosa i Sakai, 1990			
43	*Pm15*	7DS	No. 44	*T. compactum*	Tosa i Sakai, 1990			
44	*Pm16*	4A	Maris Nimrod, Norman	*T. turgidum* var. *dicoccoides*	Reader i Miller, 1991	SSR	*gwm159*	Chen i wsp. 2005
45	*Pm17*	1RS.1AL	Amigo	*Secale cereale*	Heun i wsp. 1990 Hsam i Zeller, 1997	RFLP AFLP	*IAG95, CA/CT-355* *mwg68*	Hsam i wsp. 2000 Mater i wsp. 2004
	Pm18	forma alleliczna *Pm1* (*Pm1c*) pierwotnie opisany u *T. aestivum* (Weihenstephan Stamm M1N) (Zeller i wsp. 1993)						
46	*Pm19*	7D	Gaterslaben	*Aegilops squar-rosa*	Lutz i wsp. 1994			
47	*Pm20*	6BS.6RL	KS93WGRC28	*Secale cereale*	Friebe i wsp. 1994			
48	*Pm21*	6VS.6AL	Sub. line 6V(6A)	*Haynaldia villosa*	Chen i wsp. 1995	RAPD STS SCAR	$OPH17_{1900}$ *NAU/ibao15902* $SCAR_{1265}$, $SCAR_{1400}$	Qi i wsp. 1996 Cao i wsp. 2006 Liu i wsp. 1999
	Pm22	forma alleliczna *Pm1* (*Pm1e*) pierwotnie opisany u *T. aestivum* (Virest) (Peusha i wsp. 1996)						
	Pm23	forma alleliczna *Pm4* (*Pm4c*) pierwotnie opisany u *T. aestivum* (Line 81-7241) (McIntosh i wsp. 1998)						
49	*Pm24*	1DS	Chiyacao	*T. aestivum*	Huang i wsp. 1997	AFLP SSR	*E34/M51-407, ACA/CCG-420* *gwm106, gwm337, gwm458*	Huang i wsp. 2000

1	2	3	4	5	6	7	8	9
50	*Pm24b*	1DS	Baihulu/Shaanyou 225	*T. aestivum*	Xue i wsp. 2012	SSR	*gwm603, gwm789 barc229*	Xue i wsp. 2012
51	*Pm25*	1A	NC96BGTA5	*T. monococcum* var. *boeoticum*	Shi i wsp. 1998	RAPD	$OPX06_{1050}$ $OPAG04_{950}$ $OPAI14_{600}$	Shi i wsp. 1998
52	*Pm26*	2BS	TTD140	*T. turgidum* var. *dicoccoides*	Rong i wsp. 2000	STS	*cau516*	Rong in in. 2000
53	*Pm27*	6B	146-155-T	*T. timopheevii*	Järve i wsp. 2000	SSR RFLP	*psp3131* *psr8, psr964* *psr154, psr546*	Järve i wsp. 2000
54	*Pm28*	1B	Meri	*T. aestivum*	Peusha i wsp. 2000			
55	*Pm29*	7DL	Pova	*Aegilops ovata*	Zeller i wsp. 2002	AFLP RFLP	*S17M25-226* *S23M16-246* *S26M26-261* *mwg341*	Zeller i wsp. 2002
56	*Pm30*	5BS	C20	*T. turgidum* var. *dicoccoides*	Liu i wsp. 2002	SSR	*gwm159*	Liu i wsp. 2002
57	*Pm32*	1BL·1SS	L501	*Aegilops speltoi-des*	Hsam i wsp. 2003			
58	*Pm33*	2BL	PS5	*T. carthlicum*	Zhu i wsp. 2005	SSR	*wmc317, gwm111* *gwm382, gwm526*	Zhu i wsp. 2005
59	*Pm34*	5DL	NC97BGTD7	*Aegilops tauschii*	Miranda i wsp. 2006	SSR	*barc177, barc144* *gwm272*	Miranda i wsp. 2006
60	*Pm35*	5DL	NC96BGTD3	*Aegilops tauschii*	Miranda i wsp. 2007	SSR	*cfd7, gdm43* *cfd26*	Miranda i wsp. 2007

1	2	3	4	5	6	7	8	9
61	*Pm36*	5BL	MG29896	*T. turgidum* var. *dicoccoides*	Blanco i wsp. 2008	AFLP SSR EST-SSR	*P43M32, P46M31, P41M37, P41M39, P39M32* *cfd07, wmc75 gwm408* *BJ261635*	Blanco i wsp. 2008
62	*Pm37*	7AL	NC99BGTAG11	*T. timopheevii*	Perugini i wsp. 2008	SSR	*gwm33 wmc790*	Perugini i wsp. 2008
63	*Pm38*	7DS	RL6058	*T. aestivum*	Spielmeyer i wsp. 2005	SSR	*gwm1220 gwm295*	Spielmeyer i wsp. 2005
64	*Pm39*	1BL	Saar	*T. aestivum*	Lillemo i wsp. 2008	SSR	*wmc719 hbe248*	Lillemo i wsp. 2008
65	*Pm40*	7BS	GRY19	*T. aestivum*	Luo i wsp. 2009	SSR	*gwm29, wmc335 wmc364, wmc426 wmc476*	Luo i wsp. 2009
66	*Pm41*	3BL	IW2	*T. turgidum* var. *dicoccoides*	Li i wsp. 2009	SSR EST-STS	*barc84, wmc68 wmc326, barc77 wmc236, gwm114* *BE489472*	Li i wsp. 2009
67	*Pm42*	2BS	G-303-1M	*T. turgidum* var. *dicoccoides*	Hua i wsp. 2009	SSR AFLP EST–STS RFLP	*barc7, barc55, gwm148, gwm257, wmc35, wmc15* *wmc257, wmc382, wmc477* *cauG3, cauG6 cauG10, cauG20, cauG22* *BQ160080* *BQ160588, BF146221* *cau516*	Hua i wsp. 2009

1	2	3	4	5	6	7	8	9
68	*Pm43*	2DL	CH5025	*Thinopyrum intermedium*	He i wsp. 2009	SSR	*cfd233, wmc41, barc11, gwm539, wmc175*	He i wsp. 2009
69	*Pm44*	3AS	Hombar	*T. aestivum*	Chen i wsp. 2011			
70	*Pm45*	6DS	D57	*T. aestivum*	Ma i wsp. 2011	SSR	*mag6176*	Ma i wsp. 2011
71	*Pm46*	5DS	Tabasco	*T. aestivum*	Gao i wsp. 2012	SSR	*gwm205, cfd81*	Gao i wsp. 2012
72	*Pm47*	7BS	Hongyanglazi	*T. aestivum*	Xiao i wsp.2013	EST SSR	*BE606897* *gwm46*	Xiao i wsp. 2013
73	*Pm50*	2AL	K2	*T. aestivum*	Mohler i wsp. 2011	SSR	*gwm294*	Mohler i wsp. 2011
74	*Pm*	1RS		*Secale cereale*	Schlegel i Korzun, 2013			
75	*Pm1*	1RS						
76	*Pm2*	2RL						
77	*Pm3*	3RS						
78	*Pm4*	5RL						
79	*Pm5*	6RL	Prolific					
80	*Pm6*	4R						
81	*Pm7*	1R						
82	*Pm8*	2RL						

Obecnie za pomocą różnych systemów markerowych zmapowano 32 geny odporności na *B.graminis* (Tabela 1.1). Brak kompletnej bazy izolatów *B. graminis* do wykrywania poszczególnych genów *Pm* oraz brak specyficznej reakcji u roślin posiadających większą ilość genów odporności są czynnikami ograniczającymi kombinację wysoko efektywnych genów *Pm* u danej odmiany przy wykorzystaniu testów inokulacyjnych. Markery DNA związane z odpornością na *B. graminis* ułatwiają transfer oraz piramidyzację genów *Pm*.

Do powszechnie stosowanych systemów markerowych w badaniach genów *Pm* należą: AFLP, SSR, RAPD, RFLP, STS i SCAR. Badania z wykorzystaniem tych systemów przyczyniły się do właściwego skatalogowania genów *Pm*. Singrün i wsp. (2003) przy użyciu markera molekularnego *Xsts638* stwierdził, iż gen *Pm22* [PENSHUA i wsp. 1996] jest formą alleliczną genu *Pm1*. Marker AFLP *XS11M20-134* sprzężony z genem *Pm1* w odległości 0.9cM, był wykorzystany do identyfikacji allela *Pm1c.* Pozostałe allele *Pm1* nie były wykrywane przez ten marker [HARTL i wsp. 1999]. Na mapach sprzężeń, odległości markera SSR *Xgwm905* do alleli *Pm3h*, *Pm3i* oraz *Pm3j* wynoszą odpowiednio 3.7 cM, 7.2 cM i 1.2 cM. Ze względu na możliwość rekombinacji, marker ten nie powinien być stosowany w celu odróżnienia tych alleli [HUANG i wsp. 2004]. Testy markerem SSR – *Xgwm356*, pozwoliły na przydzielenie genu *PmPS5A* do grupy genów *Pm4* [ZHU i wsp. 2005]. Xie i wsp. (2011) udowodnili błędne oznaczenie nowego genu jako *Pm31* u *T. turgidum* var. *dicoccoides*, uznając jego lokalizację za identyczną z *Pm21* pochodzącym od *Haynaldia villosa*. Obecnie dla 15 genów *Pm* nie ma zlokalizowanych markerów.

W bazie danych Wheat Genetic Resources Database (www.shigen.nig.ac.jp) znajduje się 23 genów *Pm* oznaczonych jako geny tymczasowe. Analizy molekularne są niezbędne do charakterystyki tymczasowych i nowych genów *Pm*. Przykładowo, Chhuneja i wsp. (2012) zidentyfikowali na chromosomie 7A *Triticum boeoticum* L. nowe geny odporności na mączniaka prawdziwego wstępnie nazwane *PmTb7A.1* oraz *PmTb7A.2*. Sprzężenie genu *PmTb7A.2* z markerami STS - *MAG2185* i *MAG1759,* wykorzystywanymi do identyfikacji genu *Pm1* wskazuje na fakt, iż gen *PmTb7A.2* może być formą alleliczną *Pm1*. Z kolei gen *PmTb7A.1* flankowany przez markery DArT – *wPt4553* oraz SSR – *Xcfa2019*, jest przypuszczalnie niezależnym genem odporności na mączniaka prawdziwego.

Geny tymczasowe mogą stanowić efektywne źródło odporności na mączniaka prawdziwego. Gen *PmG3M* obecny na chromosomie 6BL w linii 'G-305-3M' *Triticum turgidum* ssp. *dicoccoides* zapewniał odporność na 47 badanych izolatów *Blumeria graminis* pochodzących z Izraela i Szwajcarii [XIE i wsp. 2012]. Tylko niektóre z genów warunkujących odporność na mączniaka prawdziwego mają przypisaną lokalizację chromosomową oraz zidentyfikowane markery DNA. W przypadku dostępu do linii referencyjnych, markery genetyczne opracowane dla genów *Pm* z oznaczeniami tymczasowymi mogą być wykorzystane do MAS. Markery te dostępne są dla genów *PmHNK* (3BL), *MlIw72* (7AL) i *Pm-M53* (5D) [LI i wsp. 2011; NIU i wsp. 2008; XU i wsp. 2010]. Pozostałe geny tymczasowe nie mają markerów i zlokalizowane są na chromosomach 2AL, 5AL, 6AL, 7AL, 2B, 4B, 5BL i 7B [FU i wsp.

2013; HUANG i wsp. 2002; HUANG i wsp. 2003; MAXWELLA i wsp. 2010; NIU i wsp. 2010; SINGRÜN i wsp. 2004; SUN i wsp. 2006; XU i wsp. 2008; YAO i wsp. 2007; ZHANG i wsp. 2010].

W bazie danych Genes, Markers and Linkage Data of Rye [SCHLEGEL i KORZUN, 2013] opisanych jest 9 genów odporności na *Blumeria graminis*. Posiadają one odrębną numerację, która nie nie jest związana z genami obecnymi u pszenicy. Wiele współczesnych odmian pszenicy posiada chromosom translokacyjny 1RS.1BL w miejsce chromosomu 1B [BRAUN i wsp. 1998], który został celowo zachowany ze względu na obecność na krótkim ramieniu chromosomu 1R genów odporności na choroby grzybowe. Na 1RS zidentyfikowany został gen *Pm8* oraz *Pm17*, odpowiednio u odmian niosących translokację 1RS.1BL oraz 1RS.1AL, przy czym gen *Pm17* wykazuje szersze spektrum odporności [HSAM i wsp. 2000]. Jedynie dla genu *Pm17* zlokalizowane zostały sprzężone z genem markery RFLP oraz AFLP (Tabela 1.1). Geny *Pm8* oraz *Pm17* okazały się być formami allelicznymi [HSAM i ZELLER, 1997], dlatego też w bazie genów żytnich Schlegel i Korzun (2013) znajdują się pod jedną nazwą *Pm1*.

Do charakterystyki nowych genów *Pm* wykorzystywane są techniki skanowania genomów jak np. DArT. Przy wykorzystaniu markerów DArT oraz SSR na chromosomie 7AL *Triticum turgidum* ssp. *dicoccoides* zidentyfikowany został gen odporności, tymczasowo nazwany *PmG16.* Ben-David i wsp. (2010) stwierdzili, iż dwa markery DArT, *wPt-1424* oraz *wPt-6019*, kosegregują z *PmG16* i mogą być wykorzystane w genomice porównawczej.

Obecnie jedynym zsekwencjonowanym genem odporności na *Blumeria graminis* jest *Pm3*. Dla odmiany ‘Kolibri’ *Triticum aestivum* opisano mRNA złożone z 759 par zasad i kodujące białko złożone ze 118 aminokwasów [SRICHUMPA i wsp. 2005].

Piramidyzacja genów odporności u jednego genotypu, w znacznym stopniu przyczynia się do otrzymywania odmian o trwalszej odporności na szerokie spectrum ras patogena lub różnych patogenów. Kumulacja efektywnych genów odporności jest metodą powszechnie stosowaną w programach hodowlanych. U pszenicy badania nad gromadzeniem efektywnych genów odporności dotyczą głównie połączenia genu *Pm21* oraz genu odporności na rdzę brunatną *Lr41* [PIETRUSIŃSKA 2010]. W piramidyzacji należy również rozważyć wykorzystanie genu *Pm4b* [HEUN i FISCHBECK, 1987], który należał do najbardziej efektywnych genów, zapewniając odporność na wszystkie populacje *Blumeria graminis* f. sp. *tritici* w środkowej Europie w latach 1989-1992 [ŠVEC i MIKLOVICOVA, 1998].

Pszenżyto jest w ostatnich latach silnie porażane przez liczne patogeny, nie tylko *Blumeria graminis*, ale także *Puccinia triticina* i *Puccinia striiformis* powodujące odpowiednio rdzę brunatną i rdzę żółtą. Istotne jest więc poznanie genów, które mogą zapewnić odporność nowotworzonym odmianom pszenżyta. U pszenżyta funkcjonują geny z genomów A i B pszenicy, a także geny odporności żyta z genomu R. Dotychczas w genomie R pszenżyta zidentyfikowano tylko nieliczne geny *Pm*. Funkcjonalny gen *Pm20*, z genomu R żyta, został zidentyfikowany w linii heksaploidalnego pszenżyta ‘8Pin-17’ i za jej pośrednictwem wpro-

wadzony do pszenicy [ZHANG i wsp. 2001]. Krzyżowanie pszenżyta z pszenicą jest główną metodą otrzymywania linii pszenżytnich odpornych na mączniaka prawdziwego. Występowanie transgresji pod względem odporności na mączniaka prawdziwego stwierdzono w pokoleniach F_1 i F_2 uzyskanych z krzyżowania pszenżyta (odmiany 'Fidelio', 'Magnat', 'Lamberto') z odmianami pszenicy 'Meridien' i 'Novalis', niosącymi gen *Pm4b* oraz odmianami 'Clever', 'Finezja' i 'Tonacja', z kombinacją genów *Pm2* i *Pm6* [KOWALCZYK i wsp. 2011].

1.5. Mapy genetyczne

Poznanie organizacji, budowy i funkcjonowania chromosomów jest możliwie dzięki opracowaniu map genetycznych danego gatunku organizmu. Konstrukcja map genetycznych w oparciu o markery molekularne umożliwia poznanie ilościowych i jakościowych podstaw genetycznej kontroli istotnych cech, takich jak odporność na patogeny grzybowe. Mapy genetyczne przyczyniają się także do identyfikacji nowych genów warunkujących zróżnicowanie fenotypowe, pozwalają na lokalizację genów o znanych funkcjach, identyfikację markerów sprzężonych z konkretnymi genami, a także badanie ewolucji genomów.

1.5.1. Konstrukcja map genetycznych

Pierwsze prace nad konstrukcją map genetycznych, opartych na markerach molekularnych, były prowadzone pod koniec lat 80-tych XX wieku i obecnie mapy opracowano dla większości gatunków roślin uprawnych [MALEPSZY 2009]. Postępowanie przy mapowaniu genetycznym polega na: identyfikacji genotypów na podstawie obserwowanej segregacji markerów, sprawdzeniu testem chi^2 (χ^2) zgodności segregacji z dziedziczeniem jednogenowym i utworzeniu matrycy zakodowanych danych o genotypach osobników populacji mapującej. W kolejnym etapie, przy pomocy programów mapujących typu MAPMAKER [LANDER i wsp. 1987], JOINMAP [STAM 1993] czy MAPMANAGER [MANLY i ELLIOT, 1991], obliczona zostaje częstość rekombinacji między markerami. Zastosowanie funkcji mapującej umożliwia przekształcenie częstość rekombinacji z wartości ułamkowej (0-0.5) w odległość mapową, wyrażaną w centymorganach – cM. Jedną z metod określania odległości genetycznych jest funkcja Kosambi, uwzględniająca prawdopodobieństwo podwójnego crossing-over oraz interferencję, czyli zmniejszenie prawdopodobieństwa zajścia drugiego crossing-over w sąsiedztwie pierwszego. Analiza sprzężeń jest poprzedzana wyborem poziomu istotności, poniżej którego hipoteza o sprzężeniu dwóch loci jest odrzucana. Rolę testu istotności spełnia funkcja LOD, będąca logarytmem ilorazu prawdopodobieństwa występowania sprzężenia przez prawdopodobieństwo niezależnego dziedziczenia dwóch loci, czyli braku sprzężenia między markerami. Za krytyczny poziom LOD przyjmuje się wartość 3.0, która oznacza że prawdopodobieństwo sprzężenia markerów jest 1000-krotnie większe niż ich dziedziczenie niezależne [MALEPSZY 2009]. W większości przypadków wartość LOD rów-

na 3.0 odpowiada poziomowi 5% istotności w typowych testach statystycznych [PRIMROSE 1995].

1.5.2. Populacja mapująca

Formami rodzicielskimi populacji mapującej są najczęściej wysoce homozygotyczne linie o niskim stopniu pokrewieństwa, co zabezpiecza wysoki poziom polimorfizmu w potomstwie. Populację mapującą stanowi rozszczepiające się potomstwo otrzymane z krzyżowania odpowiednio dobranych linii rodzicielskich. Najczęściej, jako populacje mapujące wykorzystywane są pokolenia F_2, BC_1, RIL lub DH. Liczebność populacji mapującej nie powinna być niższa niż 100 osobników w przypadku populacji F_2, i 50 osobników dla linii RIL i DH [MALEPSZY 2009].

1.5.3. Genetyczne zróżnicowanie populacji mapującej

Etapem uzupełniającym analizę podłoża genetycznego jest badanie zróżnicowania genetycznego populacji. Określane jest ono jako prawdopodobieństwo występowania identycznego genotypu między losowo wybranymi osobnikami w populacji. Analiza podobieństwa genetycznego oraz filogenezy opartej na odległościach genetycznych umożliwia wstępną ocenę zróżnicowania osobników w obrębie populacji. W celu obliczenia podobieństwa, uzyskany na podstawie rozdziału elektroforetycznego obraz powielonych fragmentów DNA, czyli elektroforegram, jest przetwarzany na dane liczbowe. Przykładowe programy wykorzystywane do statystycznego obliczania zmienności genetycznej na poziomie DNA, to PAST [HAMMER i wsp. 2001], GenePop v.3.4 [RAYMOND i ROUSSET, 1995], Arlequin [EXCOFFIER i LISCHER, 2010], czy PHYLIP v.3.6b [FELSENSTEIN 1989]. Programy te umożliwiają obliczenia podstawowych parametrów genetycznych, jak np. średnia liczba alleli w locus (obserwowana i efektywna), indeks zmienności genetycznej Shannon'a (LEWONTIN 1972), heterozygotyczność danego locus, średnia zmienność wewnątrzpopulacyjna, całkowita zmienność międzypopulacyjna [NOWAKOWSKA 2006].

1.5.4. Markery molekularne

Markery molekularne oparte na DNA powinny charakteryzować się dużym polimorfizmem (obecne liczne formy alleliczne), wysoką częstotliwością występowania i równomiernym rozłożeniem w genomie. Dobry marker powinien wykazywać neutralność selekcyjną (brak sprzężenia z genami plejotropowymi) oraz charakteryzować się ekspresją niezależną od wpływu czynników zewnętrznych. Ponadto, marker genetyczny powinien być wykrywalny prostą i szybką metodą, zarówno u homo- jak i heterozygoty [NOWAKOWSKA 2006]. Obecnie w bazie GrainGenes umieszczone są 82 mapy pszenic di-, tetra- i heksaploidalnych oraz 11 map dla żyta. Są to mapy zarówno pojedynczych chromosomów [LIU i ANDERSON, 2003], jak i całych genomów [CROSSA i wsp. 2007]. Opracowanych jest także kilka map dla pszenżyta [GONZÁLEZ i wsp. 2005; TYRKA i wsp. 2011]. Mapy pszeniczne wysycone są

markerami: AFLP, DArT, EST, RFLP, SNP, SSR, STS, TRAP. Na mapach żyta zlokalizowanych zostało 3 rodzaje markerów: RFLP, RAPD oraz SSR. Natomiast opracowane mapy pszenżyta są wysycone markerami: AFLP, DArT, SSR [ALHEIT i wsp. 2011; TYRKA i wsp. 2011], a także RAPD i RAMP. W niniejszej pracy zastosowano systemy markerowe DArT oraz SSR.

Markery SSR to rodzaj powtarzalnych sekwencji DNA obecnych w genomach wszystkich organizmów eukariotycznych i prokariotycznych. Składają się z tandemowo powtarzającego się motywu (2-6 nukleotydów), tworząc sekwencję do 100 par zasad i są flankowane przez wysoko konserwatywne sekwencje [RAKOCZY-TROJANOWSKA i BOLIBOK, 2004]. Najbardziej charakterystycznymi powtórzeniami w genomie roślin są $(AT)_n$ oraz $(TAT)_n$ [MORGANTE i wsp. 2002]. Mikrosatelity są obecne zarówno w regionach kodujących, jak i niekodujących, ale częstotliwość ich występowania jest wyższa w regionach ulegających transkrypcji. Zróżnicowanie markerów SSR może być generowane poprzez dwa mechanizmy: poślizg replikacji DNA (nić matrycowa i jej kopia przesuwają się względem siebie, przez co część matrycy jest powielana lub opuszczana) oraz nadzwyczajne tempo mutacji (10^{-6}-10^{-2} na pokolenie) [RAKOCZY-TROJANOWSKA i BOLIBOK, 2004].

W ostatnich latach opracowano nowy system markerowy – DArT, który wykorzystuje hybrydyzację DNA do płytek mikromacierzowych, pozwalając na równoczesną analizę kilku tysięcy loci rozproszonych po całym genomie [JACCOUD i wsp. 2001]. System genotypowania DArT uwzględnia trawienie genomowego DNA przy zastosowaniu enzymów restrykcyjnych wrażliwych na metylację. Próbki DNA pojedynków populacji mapującej oraz rodziców są hybrydyzowane do płytki mikromacierzowej z immobilizowanymi, znanymi klonami DNA tego samego gatunku. Polimorfizm fragmentów restrykcyjnych populacji mapującej jest identyfikowany poprzez różnice w hybrydyzacji do mikromacierzy [FRANCKI i wsp. 2009]. System DArT nie wymaga wcześniejszej znajomości sekwencji DNA, jest w dużym stopniu zautomatyzowany oraz daję wysoko powtarzalne wyniki [MILCZARSKI i wsp. 2011]. Analizy polimorfizmu markerów DArT do tej pory były prowadzone dla 64 gatunków roślin, w tym dla pszenicy, żyta, ryżu i jęczmienia. Dla 95 odmian pszenicy jarej i ozimej opracowane zostały 6042 markery DArT [BADEA i wsp. 2011]. Pod kątem identyfikacji markerów DArT, przeanalizowano około 66.5 tysiąca genotypów pszenicy, w porównaniu do około 5.6 tysiąca genotypów pszenżyta [http://www.diversityarrays.com/genotypingserv.html]. Technologia DArT ma coraz szersze zastosowanie w tworzeniu wysoko zagęszczonych map genetycznych [WENZL i wsp. 2006].

Ze względu na złożoność i niestabilność genomu pszenżyta dostępne są na razie dwie mapy genetyczne tej hybrydy. Na podstawie markerów molekularnych powstała mapa genetyczna pszenżyta w oparciu o populację mapującą powstałą przez skrzyżowanie odmian ‘Saka3006’×‘Modus’ (90 osobników linii DH). Na mapie umieszczono 1385 markerów DArT, 155 markerów SSR oraz 28 markerów AFLP [TYRKA i wsp. 2011]. Badając 911 osobników

z 6 populacji mapujących pszenżyta (w tym 5 populacji DH i jednej populacji F_2) uzyskano mapę genetyczną zawierającą 2555 markerów DArT [ALHEIT i wsp. 2011].

1.5.5. Lokalizacja loci cech ilościowych (QTL)

Analiza loci cech ilościowych (QTL) umożliwia oszacowanie ilości genów/rejonów warunkujących daną cechę rośliny oraz ich rozmieszczenie w genomie. Mapowanie QTL wykorzystuje zjawisko sprzężenia pomiędzy cechami ilościowymi uwarunkowanymi poligenicznie a markerami molekularnymi. Tradycyjne mapowanie QTL składa się z kilku etapów: (1) utworzenia populacji mapującej segregującej pod względem danej cechy (przykładowo odporności na *Blumeria graminis*); (2) identyfikacji markerów polimorficznych; (3) genotypowania populacji mapującej przy wykorzystaniu polimorficznych markerów; (4) konstrukcji mapy genetycznej; (5) fenotypowania pod względem danej cechy oraz (6) mapowania QTL na podstawie uzyskanych danych analizy genotypowej i fenotypowej [REYAZUL i wsp. 2012]. Najczęściej stosowanymi programami do mapowania loci cech ilościowych są: QTL IciMapping v3.1 [WANG i wsp. 2012a], MapQTL [VAN OOIJEN 2009] oraz Windows QTL Cartographer 2.5 [WANG i wsp. 2012b].

Do parametrów opisujących wykrywane QTL należą: (1) LOD - test logarytmiczny określający prawdopodobieństwo lokalizacji QTL w danym miejscu na chromosomie; (2) efekt addytywny lub dominujący jednego z alleli rodzicielskich; oraz (3) R^2 – współczynnik determinacji, będący miarą dopasowania wybranego modelu do danych empirycznych, wskazujący, jaki procent zmienności jest wyjaśniany przez dany QTL. Krzywa wartości LOD wyznacza przedział największego prawdopodobieństwa wystąpienia locus cechy mierzalnej. Do identyfikacji QTL stosuje się marker lub dwa markery, które ograniczają interwał chromosomu, wewnątrz którego lokalizowane jest QTL [SZYP-BORKOWSKA 2005].

Mapowanie QTL przeprowadzać można kilkoma różnymi metodami w zależności od warunków przeprowadzonych badań oraz rodzaju uzyskiwanych wyników. Najprostszą z metod jest SMA, czyli analiza pojedynczych markerów. Umożliwia ona wykrycie zależności pomiędzy pojedynczym markerem a fenotypem poprzez zastosowanie regresji liniowej (inaczej metody najmniejszych kwadratów). Metoda analizy pojedynczych markerów umożliwia lokalizację segmentu chromosomu, w którym zawarty jest QTL [WĄSEK i wsp. 2013]. Porównywane są średnie wartości cech dla dwóch grup genotypów. Jeśli jest istotna różnica pomiędzy tymi wartościami uznaje się, że w bliskiej lokalizacji z analizowanym markerem znajduje się QTL mający wpływ na badaną cechę.

Mapowanie interwałowe polega na ustaleniu sprzężenia między QTL a markerami ograniczającymi wyznaczony przedział na mapie chromosomu, przez ocenę maksymalnej wiarygodności. Locus QTL jest lokalizowany w rejonie wyznaczonym przez pik krzywej LOD, o ile przewyższa on wartość krytyczną. Jeżeli ocenie poddana jest pozycja bardzo blisko prawdziwego QTL, to istnieje duże prawdopodobieństwo wykrycia QTL [HOLLAND 2009]. Do warunków koniecznych do poprawnego mapowania interwałowego należą: (1)

populacja mapująca musi wykazywać segregację pod względem danej cechy; (2) badana cecha wykazuje rozkład normalny; (3) przeprowadzona jest analiza genotypowa markerów molekularnych; (4) analiza fenotypowa jest przeprowadzana w jednakowych warunkach środowiskowych [MILCZARSKI i MASOJĆ, 2003].

Metoda CIM, czyli złożone mapowanie interwałowe, łączy dwie poprzednie metody. Polega na wstępnym przeprowadzeniu analizy wariancji pojedynczych markerów, a następnie na zastosowaniu modelu wykorzystującego wiele markerów w celu obliczenia sprzężenia pomiędzy QTL a markerami flankującymi określony przedział na mapie chromosomu poprzez ocenę maksymalnej wiarygodności [WĄSEK i wsp. 2013]. Metoda redukuje efekt oddziaływania pozostałych poligenów, znajdujących się w innych częściach chromosomu. Eliminuje się w ten sposób błędy będące wynikiem sumowania się efektów działania wielu loci warunkujących nasilenie danej cechy fenotypowej [SZYP-BORKOWSKA 2005].

Gdy nie można spełnić założeń wymaganych dla testów parametrycznych, takich jak: rozkłady zmiennych zbliżony do rozkładu normalnego, równość grup, czy równość wariancji w grupach, do testowania zależności pomiędzy markerem a cechą stosuje się nieparametryczne metody analizy. Testem stosowanym w takich przypadkach jest test Kruskal-Wallisa. Identyfikuje on efekt pojedynczego locus/markera. W analizie Kruskal-Wallis istotne statystycznie powiązania z badaną cechą są wskazane poprzez wartość K*, podane jest również prawdopodobieństwo popełnienia błędu (od 0.1 do 0.0001) [KLIMENKO i wsp. 2010].

Dla pszenicy wykryto i zmapowano kilkanaście QTL związanych z odpornością na *Blumeria graminis*. Przy zastosowaniu metody złożonego mapowania interwałowego, na podstawie mapy genetycznej markerów RFLP, Keller i wsp. (1999) zmapowali 14 QTLi w obrębie genomów A i B pszenicy. Badania te prowadzono na populacji rekombinowanych linii wsobnych pochodzących ze skrzyżowania odmiany pszenicy ozimej ‘Formo’ oraz odmiany pszenicy orkiszowej ‘Oberkulmer’ [KELLER i wsp. 1999]. Największy procent zmienności wyjaśniały QTLe zlokalizowane na chromosomach: 7B oraz 5A, odpowiednio 31.8% oraz 22.9%. Pozostałe QTLe pochodziły z rejonów 3A, 4A, 5B oraz 1B. Dodatkowo Keller i wsp. (1999) wskazują, iż QTL zlokalizowany na chromosomie 7B odnosi się do genu odporności na *Blumeria graminis* – *Pm5*. Dzięki mapie genetycznej z naniesionymi markerami SSR zidentyfikowano QTL na chromosomie 6AL [CHANTRET i wsp. 2000], w rejonie genu *MIRE* (genu odporności na *Blumeria graminis*). Mingeot i wsp. (2002) zmapowali QTL w locus genu *Pm4B* (marker RFLP – *XgbxG303*), wyjaśniający blisko 40% zmienności. Pozostałe QTLe zlokalizowane były na chromosomach 2B [MINGEOT i wsp. 2002], 1B i 2A [LIU i wsp. 2001]. Cztery znaczące QTL odporności na *B.graminis* u pszenicy wykryte zostały na podstawie testów inokulacyjnych w stadium siewki [JAKOBSON i wsp. 2012]. Zostały one zlokalizowane w obrębie genomu A na chromosomach 4A, 5A, 7A, 1A oraz na chromosomie 5B. W stadium rośliny dojrzałej pszenicy na podstawie powierzchni pod krzywą rozwoju choroby, AUDPC, zidentyfikowano QTLe na chromosomie 1AS oraz na 2BL [LIANG i wsp.

2006]. Na podstawie maksymalnego porażenia rośliny uzyskanego w testach polowych Lan i wsp. (2009) zidentyfikowali QTLe: *QPm.caas-1A*, *QPm.caas-6BS*, *QPm.caas-7A*.

Dla pszenżyta nie zidentyfikowano loci cech ilościowych związanych z odpornością na *Blumeria graminis*. Wykryto natomiast QTL warunkujące odporność na takie choroby, jak: septorioza plew (*Stagonospora nodorum*) oraz pleśń śniegowa (*Microdochium nivale*), odpowiednio na chromosomach 6A, 4B, 5B oraz 2A, 3A, 5A, 6A, 1B, 3B, 5B, 6B i 7B [SZECHYŃSKA-HEBDA i wsp. 2011].

2. CEL PRACY

Celem pracy była konstrukcja mapy genetycznej pszenżyta opartej na segregacji markerów molekularnych w dwukierunkowej populacji F_2 ‘Lamberto’ i ‘Grenado’, a także lokalizacja rejonów genomu lub markerów molekularnych związanych z odpowiedzią rośliny na infekcję *Blumeria graminis*.

Praca skupia się na poszukiwaniu podstaw genetycznych odporności pszenżyta na *Blumeria graminis* o cechach odporności ilościowej. Umożliwi to prowadzenie badań w celu nagromadzenia (piramidyzacji) więcej niż jednego genu odporności u jednego gatunku rośliny, co w znacznym stopniu może zwiększyć odporność na tego patogena grzybowego. Analiza genotypowa przy wykorzystaniu markerów molekularnych typu DArT i SSR wraz z wynikami testów stopnia porażenia populacji pszenżyta izolatami grzyba (inokulacyjnych oraz polowych), posłuży do identyfikacji markerów związanych z odpornością na *Blumeria graminis* w populacji pszenżyta ‘Lamberto’ i ‘Grenado’, oraz określenia rodzaju występującej odporności.

3. MATERIAŁ I METODY

3.1. Materiał badawczy

Materiał roślinny stanowiły odmiany ozime heksaploidalnego pszenżyta (AABBRR) (X *Triticosecale* Wittm.) – 'Lamberto' i 'Grenado' oraz ich dwukierunkowe mieszańce F_2 i rodziny F_3 (populacje 'Lamberto'×'Grenado' (LG) oraz 'Grenado'×'Lamberto' (GL)). Wyprowadzanie mieszańców przeprowadzone było przez firmę DANKO Hodowla Roślin Sp. z o.o. w Choryni. Obie odmiany były dobrze scharakteryzowane pod względem odporności na *Blumeria graminis*. 'Lamberto' to bardzo podatna na infekcję *Blumeria graminis* sp. odmiana pszenżyta ozimego, wytypowana na podstawie wieloletnich obserwacji polowych oraz danych COBORU. Odmianę tę charakteryzuje średnia mrozoodporność, dość duża odporności na wyleganie oraz średnia tolerancja na zakwaszenie gleby. Odmiana 'Lamberto' została skreślona z Krajowego Rejestru Odmian Roślin Uprawnych w 2007 roku na wniosek hodowcy [http://www.coboru.pl/Polska/odm_szczegoly.aspx?nrodm=1828].

'Grenado' to odmiana o wysokiej i stabilnej w latach odporności na infekcję *B.graminis*. Jest to odmiana półkarłowa hodowli DANKO, jedna z najkrótszych odmian wśród pszenżyt zarejestrowanych w Polsce. 'Grenado' jest szeroko uprawiane w Europie. Wyróżnia się bardzo wysokim potencjałem plonowania w różnych warunkach glebowo-klimatycznych, dzięki odporności na zakwaszenie gleby. Posiada bardzo wysoką odporność na wyleganie oraz charakteryzuje się bardzo dobrą zimotrwałością [http://www.danko.pl/grenado].

Pojedyncze rośliny odmian 'Lamberto' i 'Grenado' krzyżowano w obu kierunkach w celu uzyskania mieszańców F_1. Z roślin F_1 LG uzyskano pod izolatorem nasiona F_2. Na 186 roślinach F_2 w stadium siewki przeprowadzono w szklarni testy inokulacyjne z wykorzystaniem mieszaniny izolatów *B. graminis*. Jesienią, po wykonaniu testów rośliny F_2 przewieziono do stacji DANKO HR Sp. z o.o. w Laskach i wysadzono w polu. Wiosną z roślin populacji F_2 zebrano liście, które stanowiły materiał do badań molekularnych. W okresie poprzedzającym kwitnienie każda roślina F_2 została zaizolowana w celu pozyskania ziarna pokolenia F_3 LG. Podobnie, na drodze krzyżowania pojedynczych roślin uzyskano ziarniaki populacji F_1 GL, które wysiano w celu rozmnożenia. Uzyskano ziarna F_2, które skiełkowano, następnie przeprowadzono testy inokulacyjne na 453 siewkach, które kolejno wysadzono w oddziale IHAR w Krakowie.

Materiał infekcyjny w testach stopnia porażenia ozimego heksaploidalnego pszenżyta (X *Triticosecale* Wittm.) stanowiła mieszanina 5 jednokonidialnych izolatów *Blumeria graminis* wyodrębnionych spośród 40 izolatów z krajowej populacji grzyba zebranej w 2007 roku. Izolaty pochodziły z próbek porażonych liści pszenżyta z pięciu miejscowości: Borowo, Kraków, Krzeszowice, Laski i Smolice, z różnych odmian pszenżyta, oraz charakteryzowały się wysokim poziomem wirulencji wobec odmiany 'Lamberto'. Materiał infekcyjny został

zgromadzony przez dr Annę Strzembicką-Woźniak z Pracowni Patologii Zbóż IHAR w Krakowie.

3.2. Analiza genotypowa

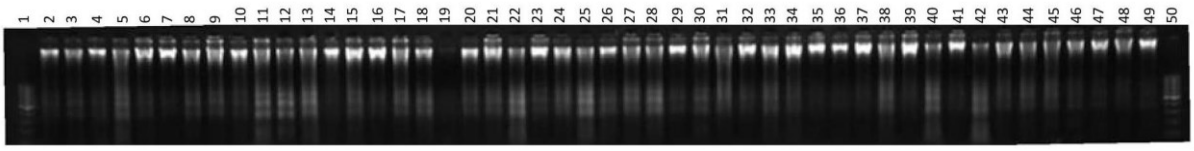
Analizę genotypową rozpoczynała izolacja materiału genetycznego z roślin populacji mapującej oraz komponentów rodzicielskich. Następnie przeprowadzane były analizy DArT i SSR. Uzyskane dane wykorzystano do określenia struktury obu populacji oraz konstrukcji mapy genetycznej pszenżyta.

3.2.1. Izolacja dna roślin

Materiał do badań molekularnych pobrano z 186 roślin populacji F_2 'Lamberto'×'Grenado' oraz 453 roślin populacji F_2 'Grenado'×'Lamberto' rosnących na poletkach doświadczalnych w Laskach i Krakowie. Pobrany materiał zamrożono i poddano liofilizacji. Izolację DNA z roślin przeprowadzono zgodnie z metodą Milligana [MILLIGAN 1992]. Do probówek typu Eppendorf zawierających zliofilizowany materiał roślinny dodano 600µl buforu ekstrakcyjnego zawierającego: 1% PVP (w/v), 0.1M Tris pH 8.0, 0.05M EDTA pH 8.0, 0.5M NaCl, 0.2% β-merkaptoetanol (v/v). Mieszaninę homogenizowano przez 2-5 minut za pomocą plastikowej bagietki. Do uzyskanego homogenatu dodano 125µl 10% SDS (w/v) pH 7.2 i mieszano na wytrząsarce typu VortexTK3S przez 30 sekund. Następnie inkubowano w łaźni wodnej w temperaturze 65°C przez 20 minut, mieszając przez odwracanie, co 7 minut. Po wyjęciu z łaźni wodnej dodano 200µl 5M octanu potasu, dokładnie mieszano i przełożono na lód na 5 minut. Po schłodzeniu wirowano przez 30 minut w temperaturze 4°C (wirówka SIGMA typu 3-16K, nr rotora 12131-H). Uzyskany supernatant przeniesiono do nowych probówek typu Eppendorf i dodano 400µl 3M octanu sodu pH 5.2. Probówki wymieszano przez dwukrotne odwrócenie. Wstawiono na 2 godziny do zamrażarki o temperaturze -20°C, po czym odwirowano przez 15 minut przy 8000rpm w temperaturze 4°C. Supernatant usunięto, a osad przepłukiwano dwukrotnie 1ml schłodzonego 70% alkoholu etylowego, mieszając przez 30 sekund. Wirowano przez 10 minut przy 8000rpm w temperaturze 4°C. Osad suszono przez 0.5-1 godziny w temperaturze pokojowej. Po wysuszeniu otrzymany osad DNA rozpuszczono w 49.75µl wody destylowanej i dodano 0.25µl roztworu RNAzy o stężeniu 10µg/µl. W celu całkowitego rozpuszczenia DNA przeniesiono do lodówki (temperatura 4°C) na czas od 1 do 24 godzin.

Stężenie DNA określano elektroforetycznie przy zastosowaniu 1.5% (w/v) żelu agarozowego zawierającego 0.00001% (w/v) bromku etydyny. Żel agarozowy przygotowano poprzez rozpuszczenie 1.5g agarozy w 100ml buforu TBE (6mM Tris, 9mM kwas borowy, 3mM EDTA), całość podgrzewając. Roztwór schłodzono do temperatury około 60°C, po czym dodano 1µl 1% bromku etydyny, wylewano do naczynia firmy Owl i umieszczano grzebienie w celu utworzenia studzienek. Po 30 minutach grzebienie usuwano, a naczynie z żelem umieszczano w komorze do elektroforezy wypełnionej buforem TBE. Próbki do nało-

żenia na żel przygotowano poprzez zmieszanie: 2µl uzyskanego roztworu wodnego DNA, 4µl wody destylowanej i 3.5µl buforu obciążającego (roztwór 0.83% błękitu bromofenolowego i 0.83% ksylenu w glicerolu). Jako standard wielkości stosowano GeneRuler 100bp DNA Ladder (Fermentas) składający się z 10 fragmentów o długości: 1000, 900, 800, 700, 600, 500, 400, 300, 200 oraz 100 par zasad. Do studzienek nakładano wcześniej przygotowane próbki zawierające wyizolowane DNA. Elektroforezę prowadzono przez 30 minut przy napięciu 120V.



Rys. 3.1. Rozdział sprawdzający na 1.5% żelu agarozowym: próbki populacji 'Lamberto'×'Grenado' (opis studzienek: 1 to standard wielkości, 2 – 3 to DNA roślin o stopniu porażenia 0 (rośliny odporne), 4 – 27 to DNA roślin o stopniu porażenia 1-2 (rośliny średnioodporne), 28 – Lamberto, 29 – Grenado, 30 – 49 to DNA roślin o stopniu porażenia 4 (rośliny wrażliwe).

Po zakończeniu elektroforezy żel umieszczano w aparacie ChemiDoc XRS BioRad i wykonywano zdjęcie pod transiluminatorem (Rys. 3.1). Na podstawie intensywności fluorescencji prążka określano stężenie DNA w próbkach. W celu przeprowadzenia analiz PCR badane próbki rozcieńczano do końcowego stężenia 10ng/µl, natomiast do analiz DArT do końcowego stężenia 100ng/µl.

3.2.2. Analiza systemami markerowymi

Dane pochodzące z analiz molekularnych są binarnym, zero-jedynkowym zapisem uzyskanych wyników. Fakt wystąpienia prążka o danej masie na elektroforogramie (markery SSR) lub sygnału hybrydyzacyjnego (markery DArT) jest zapisywany jako 1, brak prążka lub sygnału jako 0. W ten sposób matematyczny obraz analizowanej puli genotypów ma postać zero-jedynkowej macierzy [MAŃKOWSKI i wsp. 2011].

Analiza DArT była wykonana usługowo przez firmę Diversity Array Technology Pty Ltd. Przygotowanie próbek DNA polegało na przeprowadzeniu powtórnej izolacji DNA metodą Milligana oraz sprawdzeniu stężenia DNA na żelu agarozowym. Następnie preparaty DNA rozcieńczono tak, aby stężenie końcowe próbek wynosiło 100ng/µl. W kolejnym etapie przygotowano płytki 96-dołkowe, do których przeniesiono po 10µl próbek. Do każdego dołka dodano 1µl buforu TE (1mM Tris-HCl, 1mM EDTA). Płytki dokładnie zamknięto zgodnie z zaleceniami firmy i wysłano do analizy.

Amplifikację sekwencji mikrosatelitarnych – SSR, przeprowadzono dla 29 par starterów (Tabela 3.1) w celu wysycenia regionów związanych z odpornością na *B. graminis* wskazanych po wstępnych analizach DArT. Sekwencje stosowanych w pracy starterów zostały w większości udostępnione przez Dr V. Korzuna. Sekwencje 4 par starterów SSR, dostępnych w

bazie danych GrainGenes to: *gwm37*(L: 5'-ACTTCATTGTTGATCTTGCATG-3', R: 5'-CGACGAATTCCCAGCTAAAC-3'), *gwm391* (L: 5'-ATAGCGAAGTCTCCCTACTCCA-3', R: 5'-ATGTGCATGTCGGACGC-3'), *scm0107* (L: 5'-CCCGAACCCTAACCCTAAAA-3', R: 5'-AGCTCCTTCTCCTCCCTGAC-3'), *scm47* (L: 5'-ACATCACTGGAGGAGGAGAT-3', R: 5'-CACGTGGTTCACAAGCAT-3'). Wybranych 29 markerów przetestowano pod kątem występowania polimorfizmu na komponentach rodzicielskich, a następnie przeprowadzono analizy oddzielnie dla każdej populacji F_2.

Tabela 3.1. Zestawienie markerów SSR z chromosomów 1R, 4R oraz 6R testowanych w celu wysycenia regionów związanych z odpornością na *B.graminis* w populacjach GL oraz LG (lokalizacja wg GrainGenes), temperatur przyłączania starterów (temp. 2) i mieszanin reakcji PCR.

Lp.	Marker	Lokalizacja	Temperatura przyłącznia starterów	Mieszanina reakcyjna
1	**2**	**3**	**4**	**5**
1	*gwm37*	6R	52	MIX 1
2	*gwm391*	6R	52	MIX 1
3	*rems1247*	6R	52	MIX 1
4	*scm0001*	1R	58	MIX 1
5	*scm0004*	1R	52	MIX 1
6	*scm0021*	1R	55	MIX 1
7	*scm0036*	1R	55	MIX 1
8	*scm0068*	6R	58	MIX 1
9	*scm0107*	1R	58	MIX 2
10	*scm0126*	1R	58	MIX 2
11	*scm0127*	1R	55	MIX 2
12	*scm0142*	6R	55	MIX 1
13	*scm0176*	6R	55	MIX 1
14	*scm0177*	1R	52	MIX 1
15	*scm0214*	6R	50	MIX 1
16	*scm0247*	1R	55	MIX 1
17	*scm0269*	1R	55	MIX 1
18	*scm0274*	1R	52	MIX 1
19	*scm0275*	6R	55	MIX 1
20	*scm0310*	6R	58	MIX 1
21	*scm0340*	1R	55	MIX 1
22	*scm046*	6R	55	MIX 1
23	*scm06*	4R	58	MIX 1
24	*scm116*	4R	55	MIX 1
25	*scm219*	4R	52	MIX 1
26	*scm251*	4R	55	MIX 1
27	*scm277*	4R	55	MIX 1
28	*scm295*	6R	58	MIX 1
29	*scm47*	4R	55	MIX 1

Reakcja łańcuchowa polimerazy (PCR)

Do amplifikacji fragmentów DNA metodą PCR wykorzystywano termocykler Gene Amp PCR System 9700, a do sporządzenia mieszaniny reakcyjnej użyto odczynników firmy Fermentas. Startery syntetyzowane były przez firmę Metabion. Zastosowano mieszaniny reakcyjne o dwóch różnych składach przedstawionych w Tabeli 3.2. Reakcja łańcuchowa polimerazy składała się z etapów: wstępnej denaturacji (1 cykl), wstępnej amplifikacji (7 cykli), amplifikacji właściwej (41 cykli) oraz jednego cyklu końcowego wydłużania. Temperatury dla poszczególnych etapów reakcji zostały przedstawione w Tabeli 3.3. Modyfikacja podstawowego profilu temperaturowego polegała na zastosowaniu dwóch różnych temperatur na etapie przyłączania startera (Tabela 3.3). Po każdym z 7 cykli amplifikacji wstępnej temperatura przyłączania startera (Temp. 1) była zmniejszana o 1°C do chwili osiągnięcia żądanej temperatury przyłączania startera (Temp. 2) w etapie amplifikacji właściwej. Do amplifikacji produktów z wykorzystaniem 18 wybranych par starterów (wykazujących polimorfizm między formami rodzicielskimi) stosowano 4 różne modyfikacje profilu temperaturowego w zależności od temperatury przyłączania startera (Tabela 3.1).

Tabela 3.2. Skład mieszaniny reakcyjnej do PCR dla jednej próby.

Odczynnik	MIX 1	MIX2
DNA (10ng/µL)	1.5	1.5
Bufor do PCR (10X)	2	2
$MgCl_2$ (25µM)	2	2
dNTP (2mM)	2	2
Starter 1 (10µM)	0.5	0.5
Starter 2 (10µM)	0.5	0.5
Spermidyna (10mM)	0.8	0.8
Polimeraza TAQ (1U/µL)	0.4	0.6
Woda	10.3	10.1
Objętość końcowa (µL)	20	20

Tabela 3.3. Profil temperaturowy reakcji PCR

Etap reakcji PCR		Temperatura (°C)	Czas reakcji (s)	Liczba cykli
Denaturacja wstępna		95	120	1
Amplifikacja wstępna	Denaturacja	94	45	7
	Przyłączenie starterów (Temp. 1)	57-72	45	
	Wydłużanie	72	45	
Amplifikacja właściwa	Denaturacja	94	45	41
	Przyłączanie starterów (Temp. 2)	50-65	45	
	Wydłużanie	72	45	
Końcowe wydłużanie		72	10 min	1

Rozdział produktów PCR na żelu poliakrylamidowym

Wszystkie produkty reakcji PCR były rozdzielane za pomocą elektroforezy w żelu poliakrylamidowym z zastosowaniem aparatu do elektroforezy pionowej S3S firmy ThermoScientific Owl. Rozdział był podzielony na 5 etapów: przygotowanie szyb, przygotowanie żelu, przygotowanie próbek, rozdział produktów amplifikacji oraz barwienie żelu.

Żel poliakrylamidowy był wylewany pomiędzy dwie szyby: dużą (35 x 45 cm) i małą (35 x 43 cm). Przygotowanie szyb polegało na dwukrotnym ich przemyciu etanolem, następnie większą płytę traktowano roztworem Bind Silane (950µl 99.9% etanolu, 50µl 99.5% kwasu octowego oraz 2µl Bind Silane) i pozostawiano na cztery minuty. Kolejno szybę przemywano dwukrotnie 96% etanolem w odstępach dwóch minut. Małą szybę przemywano 1ml roztworu akrylazy. Po wyschnięciu szyby składano stosując przekładki boczne o grubości 0.3mm.

Przygotowanie żelu: 60.8ml 5.6M mocznika, 9.6ml 10x stężonego TBE (0.7M Tris, 0.9M kwas borowy, 0.03M EDTA), 9.6ml 40% akrylamidu (akrylamid:bisakrylamid – 19:1), 40µl TEMED oraz 150µl 10% APS, zmieszano ze sobą i wlano między poziomo ustawione szyby. Od strony małej szyby umieszczano grzebień o grubości 0.3mm w celu utworzenia studzienek. Tak przygotowany żel pozostawiano na 1.5 godziny, aby spolimeryzował. Po tym czasie szyby wraz z żelem umieszczano w pionowym aparacie do elektroforezy, a do komory dolnej i górnej dodawano 1x stężonego buforu TBE. Aparat włączano w celu rozgrzania szyb i żelu do około 50°C.

Przygotowanie próbek po reakcji PCR polegało na dodaniu do nich jednakowej objętości buforu do prób (formamid zawierający 0.03% (w/v) błękitu bromofenolowego, 0.03% (w/v) cyjanolu ksylenu i 1mM EDTA). Próbki poddawano denaturacji na bloku cieplnym w temperaturze 95°C przez 5 minut, po czym natychmiast przenoszono na lód na 5 minut (w celu zapobieżenia renaturacji próbek DNA). Do studzienek żelu nakładano po 2.5µl próbki.

Elektroforezę produktów amplifikacji przeprowadzano przez 70 minut przy 2000V w temperaturze ok. 55°C. Po zakończeniu rozdziału szyby rozdzielano za pomocą metalowej szpatułki. Małą szybę usuwano, natomiast żel przyklejony na dużej szybie był przeznaczony do barwienia.

Dużą szybę wraz z żelem przenoszono do kuwety i płukano 10% kwasem octowym przez 30 minut w celu jego utrwalenia. Następnie trzykrotnie przepłukiwano szybę z żelem wodą destylowaną w odstępach dwuminutowych, po czym zalewano 0.2% (w/v) roztworem azotanu srebra z 0.3% (v/v) formaldehydem i pozostawiano do barwienia na 30 minut. Po przemyciu wodą destylowaną fragmenty DNA wywoływano 6% (w/v) roztworem węglanu sodu z 0.3% (v/v) formaldehydem i 0.04% (w/v) tiosiarczanem sodu. Reakcję barwienia zatrzymywano ponownie zalewając 10% kwasem octowym, w celu utrwalenia uzyskanych wyników. Po upływie 10 minut przepłukiwano żel wodą destylowaną w celu usunięcia kwasu octowego przez około 30 minut i pozostawiano do wyschnięcia na powietrzu. Po wyschnięciu dokonywano opisu żelu i fotografowano uzyskane wyniki.

3.2.3. Badanie struktury populacji

Ocenę struktury populacji dwukierunkowej ‘Lamberto’ i ‘Grenado’ przeprowadzono na podstawie występowania markerów DArT. Dane pochodzące z macierzy zero-jedynkowej mają charakter skategoryzowany, to znaczy, że rzeczywista różnica pomiędzy wystąpieniem i brakiem danego prążka nie może być zapisana matematycznie jako różnica (1-0). Dlatego też do analizy takich danych nie powinno się wykorzystywać klasycznych miar odległości pomiędzy obiektami, takich jak odległość Euklidesa [MAŃKOWSKI i wsp. 2011]. Zastosowaną miarą podobieństwa był współczynnik Dice’a (zwany również miarą Nei’a i Li) [DICE 1945; NEI i LI, 1979]. Do obliczania odległości pomiędzy skupieniami wykorzystano metodę średnich połączeń – UPGMA. W wyniku tej analizy uzyskano wykres przypominający drzewo, zwany dendrogramem.

Struktura populacji mapującej została także zbadana poprzez analizę głównych współrzędnych (PCoA). Wynikiem analizy PCoA jest wykres przedstawiający rozmieszczenie obiektów (genotypów) w przestrzeni dwóch współrzędnych przedstawiających główne, niezależne źródła zmienności.

Analizę struktury populacji przeprowadzono także przy użyciu programu STRUCTURE 2.3.4 [PRITCHARD i wsp. 2000]. Testowano dopasowanie struktury populacji GL i LG do modeli liczących od K=1 do K=10 subpopulacji. Niezależne populacje były wyodrębniane na podstawie częstotliwości występowania alleli w poszczególnych loci. Pojedyncze genotypy mogą być przydzielone do różnych subpopulacji w zależności od testowanego modelu. Program zakłada, że wewnątrz populacji loci utrzymują równowagę sprzężeń zgodnie z prawem Hardy-Weinberga. Uzyskany wynik $\Delta K(K)$ wskazuje na rzeczywistą liczbę subpopulacji składających się na badaną populację dwukierunkową ‘Lamberto’ i ‘Grenado’.

3.2.4. Konstrukcja mapy genetycznej

Mapowanie genetyczne zostało przeprowadzone w programie JoinMap4 [VAN OOIJEN 2006] na podstawie matrycy zawierającej dane zero-jedynkowe markerów DArT w populacji mapującej, uzupełnione o wybrane markery SSR z rejonów przypuszczalnie związanych z odpornością na *Blumeria graminis*. Ze względu na niewielką liczność obu populacji ‘Lamberto’×‘Grenado’ i ‘Grenado’×‘Lamberto’ połączono obie matryce DArT. Matryca została przekształcona w programie Excel w zapis zawierający informację o pochodzeniu markerów od danego rodzica. Zapis danych dotyczący rodziców, został ujednolicony w następujący sposób: porównywano wyniki uzyskane dla różnych próbek rodziców i oznaczano markery o nieustalonym pochodzeniu. Dane niepewne były zaznaczane i szczególnie analizowane podczas tworzenia mapy genetycznej. W celu konstrukcji mapy genetycznej dane typu 0-1 przepisywano na zapis literowy A, B, C, D i H uwzględniający pochodzenie allelu. Markerom niewykazującym sygnału hybrydyzacyjngo podczas analizy DArT u odmiany ‘Grenado’ (‘0’ – homozygota) przypisano – A, markerom wykazującym sygnał hybrydyzacyjny u odmiany ‘Lamberto’ (‘1’ – heterozygota lub homozygota ‘Lamberto’) przypisano C. Markerom niewy-

kazującym sygnału hybrydyzacyjnego u odmiany ‘Lamberto’ (‘0’ - homozygota) – przypisano B, markerom wykazującym sygnał hybrydyzacyjny u odmiany ‘Grenado’ (‘1’ – heterozygota lub homozygota ‘Grenado’) – przypisano D. Tak przygotowaną matrycę danych wprowadzano do programu JoinMap4. Markery SSR, które ze względu na charakter kodominacyjny, wykazywały sygnał hybrydyzacyjny pochodzący od obu odmian ‘Lamberto’ i ‘Grenado’ oznaczano H.

Podczas konstrukcji wspólnej matrycy dla obu populacji pszenżyta, tworząc matrycę populacji dwukierunkowej ‘Lamberto’ i ‘Grenado’, ujednolicono zapis macierzy 0-1. Jeżeli dane dla rodziców były niezgodne, to testowano marker w obu możliwych fazach i właściwą fazę przypisywano na podstawie dalszych etapów mapowania genetycznego, lub marker odrzucano.

Przy pomocy programu mapującego JOINMAP 4 obliczono częstości rekombinacji między markerami, poprzez zastosowanie funkcji mapującej Kosambiego. W wyniku tej analizy uzyskano odległości mapowe pomiędzy poszczególnymi markerami wyrażone w cM. Za krytyczny poziom istotności LOD przyjęto wartość 3.0, poniżej której odrzucano prawdopodobieństwo sprzężenia dwóch loci. W trakcie procesu tworzenia mapy odrzucono 100 markerów DArT, które wprowadzały zbyt duże odległości w uzyskanych grupach sprzężeń lub tworzyły małe grupy złożone z kilku markerów.

Przy użyciu programu QTL IciMapping Version 3.2 [WANG i wsp. 2012a] uzyskano efektywną mapę genetyczną po wyodrębnieniu markerów o podobnych lokalizacjach w danych grupach sprzężeń oraz posiadających więcej danych brakujących.

3.3. Analiza fenotypowa

Ocena fenotypowa populacji mapującej obejmowała testy inokulacyjne na obu populacjach F_2 oraz testy prowokacji infekcji w polu (tzw. testy polowe) na populacji F_3 ‘Lamberto’×‘Grenado’.

W szklarniach IHAR w Krakowie wysiano rośliny pokolenia F_2 obu populacji i infekowano mieszaniną izolatów *Blumeria graminis*. W teście laboratoryjnym siewki inokulowano w fazie 2-go liścia izolatami grzyba i po 12-dniowej inkubacji przeprowadzano ocenę porażenia w skali 5-cio stopniowej, w której 0, 1, 2 oznaczają odporność, a 3 i 4 wrażliwość.

Testy polowe prowadzone były w Laskach w firmie DANKO HR Sp. z o.o. pod nadzorem mgr inż. Mirosława Pojmaja. W szklarniach wysiane zostały rośliny podatne na porażenia *Blumeria graminis*. Pojedynki zostały zainfekowane mieszaniną izolatów mączniaka prawdziwego i wykorzystane do późniejszej prowokacji infekcji w polu. Rodziny mieszańców F_3 i form rodzicielskich zostały wysiane w układzie bloków losowych w miejscowości Laski w dwóch powtórzeniach. Warunki doświadczenia polowego przedstawiały się w następujący sposób: rozstaw rzędów – 20cm, odległość między roślinami – 7cm. W 2010 roku w Laskach przeprowadzono ocenę fenotypową 186 pojedynków pokolenia F_3 na trzech górnych liściach w okresie kłoszenia, kwitnienia i tworzenia ziarniaka. Ocenę wykonano w skali 9-cio

stopniowej, w której liczba 1 oznacza brak odporności, natomiast liczba 9 brak objawów porażenia.

Jako pierwsze kryterium odporności uznano procentową powierzchnię liści roślin populacji F_3 porażonych przez mączniaka prawdziwego. W celu uzyskania wartości procentowych (ang. *proportion of diseased leaf area* (x)), oceny polowe (F) w skali od 1 do 9 uzyskane dla każdej rośliny z każdego z trzech terminów przekształcono (Tabela 3.4) zgodnie ze wzorem [FINCKH i wsp. 1999]:

$$\ln\left(\frac{x}{1-x}\right) = -5{,}09 + 0{,}94 * (10 - F).$$

Tabela 3.4. Oceny polowe porażenia populacji pszenżyta F_3 'Lamberto' × 'Grenado' (skala od 1 do 9) oraz odpowiadający im procent porażonej powierzchni liści.

Ocena polowa (*F*)	**Procent porażonej powierzchni (*x*) %**
9	1.55
8	3.88
7	9.36
6	20.91
5	40.37
4	63.41
3	81.61
2	91.91
1	96.67

Drugą metodą pomiaru odporności roślin było wyznaczenie powierzchni pod krzywą rozwoju choroby (AUDPC) na podstawie średniego procentu porażenia liści z trzech terminów oraz ilości dni jakie dzieliły poszczególne oceny. Powierzchnia pod krzywą rozwoju choroby została obliczona ze wzoru [SHANER i FINNEY, 1977, NADZIAK i BILIŃSKI, 2006]:

$$AUDPC = \sum_{i=1}^{n}\left[\frac{(Y_{i+1}+Y_i)}{2}\right] \times [X_{i+1} - X_i],$$

gdzie: n - liczba obserwacji,
i - numer obserwacji,
Y_i - średnia powierzchnia porażenia liści na roślinie,
X_i - czas (dzień) obserwacji,
n - liczba wszystkich obserwacji.

Uzyskane wyniki stopnia porażenia liści populacji F_3 'Lamberto'×'Grenado' zostały poddane jednoczynnikowej analizie wariancji. Wyniki AUDPC, najniższe oceny porażenia uzyskane dla poszczególnych roślin populacji F_3 'Lamberto'×'Grenado' oraz wyniki testów inokulacyjnych populacji F_2 'Grenado'×'Lamberto' zostały wykorzystane do wyznaczenia rejonów genomu populacji pszenżyta związanych z odpornością na *Blumeria graminis*.

3.4. Analiza QTL

Na podstawie wyników oceny fenotypowej oraz skonstruowanej mapy genetycznej populacji dwukierunkowej 'Lamberto' i 'Grenado' przeprowadzono identyfikację loci cech ilościowych (QTL). Wyniki oceny polowej populacji F_3 'Lamberto'×'Grenado' uzyskano w skali ciągłej, co umożliwiło przeprowadzenie złożonego mapowania QTL. Ocenę inokulacyjną na roślinach w stadium siewek obu populacji wyjściowych przeprowadzono w skali skokowej, dlatego też możliwe było mapowanie markerów, a nie QTL związanych z odpornością na *Blumeria graminis*. Identyfikację tych markerów wykonano stosując nieparametryczny test Kruskal-Wallisa, będący odpowiednikiem jednoczynnikowej analizy wariancji, oraz metodę SMA. Identyfikację i lokalizację QTL na uprzednio skonstruowanej mapie genetycznej przeprowadzono przy użyciu trzech programów do mapowania loci cech ilościowych. W programie Windows QTL Cartographer 2.5 (WANG i wsp. 2012b] zastosowano modele obliczeniowe: IM oraz CIM. W programie QTL IciMapping v3.1 [WANG i wsp. 2012a] wykorzystano modele: SMA, IM-EPI oraz ICIM-EPI. Mapowanie nieparametryczne w postaci wykonania testu Kruskal-Wallisa przeprowadzono w programie MapQTL [VAN OOIJEN 2004]. Modele IM-EPI oraz ICIM-EPI wykorzystano do ewentualnej identyfikacji markerów wykazujących efekty epistatyczne.

W programie Windows QTL Cartographer 2.5 metodę CIM przeprowadzono przez wybór standardowego modelu 'Model 6', wybierającego niektóre markery jako kontrolne, oraz metody regresji 'Forward & Backward'. Dla obu metod IM oraz CIM wybrano poziom istotności równy 0.05 oraz krok 2 cM. SMA została przeprowadzona dla modelu domyślnego. Poziom krytyczny testu LOD został wyznaczony na podstawie 1000 permutacji. Istotne statystycznie loci cech ilościowych są identyfikowane w rejonie określanym przez pik krzywej LOD, w rejonie, w którym przekracza on uzyskany poziom krytyczny testu LOD=2.5, a wartość współczynnika determinacji R^2 jest $\geq 10\%$.

W programie QTL IciMapping v3.1 dla wszystkich metod przyjęto opcję usuwania brakujących danych fenotypowych z mapowania QTL. Dla analizy SMA oraz IM-EPI przyjęto błąd typu I równy 0.05 wpływający na wartość krytyczną LOD wyznaczoną w wyniku 1000 permutacji. Ze względu na zbyt wysoki próg LOD uzyskany w wyniku przeprowadzonych permutacji analizy wykonano ponownie ustalając manualnie próg LOD równy 2.5. Dla wszystkich analiz przyjęto krok równy 2 cM. Dla metod ICIM-ADD oraz ICIM-EPI dodatkowo przyjęto prawdopodobieństwo stopniowej regresji równe 0.010.

3.5. Cytologia

W celu potwierdzenia obecności 42 chromosomów u odmian rodzicielskich populacji ‘Lamberto’×’Grenado’ wykonano preparaty chromosomów mitotycznych merystemów wierzchołkowych korzeni. W celu zatrzymania podziałów komórkowych w fazie mitozy zastosowano przechowywanie korzeni w lodowatej wodzie w łaźni lodowej w temperaturze 4°C przez 24-27h. Wielu autorów donosi, że to jest najefektywniejszy sposób uzyskiwania skondensowanych chromosomów mitotycznych zbóż [MIRZAGHADERI 2010; OLESZCZUK i wsp. 2011; SUGIYAMA i wsp. 2012,].

Ziarna form rodzicielskich populacji ‘Lamberto’×’Grenado’ zostały wysiane na szalkach Petriego o średnicy 10cm na podwójnej warstwie bibuły filtracyjnej, zwilżonej wodą z kranu. Ziarna pozostawiono w temperaturze pokojowej na 3-4 dni do momentu wypuszczenia korzeni. Następnie korzenie o długości 1-1.5cm odcięto, przeniesiono do zimnej destylowanej wody (ok. 1°C) i przechowywano na lodzie w temperaturze 4°C przez około 27 godzin. Po dokładnym osuszeniu korzeni z wody przy pomocy bibuły, utrwalano je w roztworze Carnoya (mieszanina alkoholu etylowego 99.8% : lodowatego kwasu octowego, 3:1) przez około 24 godziny w temperaturze 27°C. Utrwalone korzenie przeniesiono do 1% roztworu acetokarminu (1% karmin w 45% kwasie octowym) na 4 godziny i przygotowano preparaty gniecione [OLESZCZUK i wsp. 2011].

W wyniku optymalizacji metodyki stwierdzono, iż najwyraźniejsze chromosomy mitotyczne uzyskuje się dzięki przetrzymaniu korzeni w lodowej łaźni w temperaturze 4°C dłużej niż 24 godziny. Istotna jednak okazała się temperatura, w której przeprowadzano utrwalanie – najlepsze efekty uzyskiwano w temperaturze 27-30°C. Ogrzewanie szkiełka mikroskopowego z komórkami merystemu wierzchołkowego korzenia nad palnikiem przez 3-5 minut (bez zagotowania 1% acetokarminu) ułatwiło zniszczenie ściany komórkowej oraz uzyskanie przejrzystego wyglądu cytoplazmy otaczającej chromosomy.

4. WYNIKI

4.1. Analiza genetyczna

Analiza genetyczna obejmowała badanie polimorfizmu markerów DArT i struktury populacji dwukierunkowej ‘Lamberto’ i ‘Grenado’ oraz konstrukcję map genetycznych populacji ‘Lamberto’×‘Grenado’ i ‘Grenado’×‘Lamberto’. Uzyskane mapy stanowiły podstawę do identyfikacji markerów związanych z rejonami odpowiedzialnymi za odporność na mączniaka prawdziwego. W dalszym etapie wykonano analizy SSR w celu wysycenia wybranych rejonów genomu.

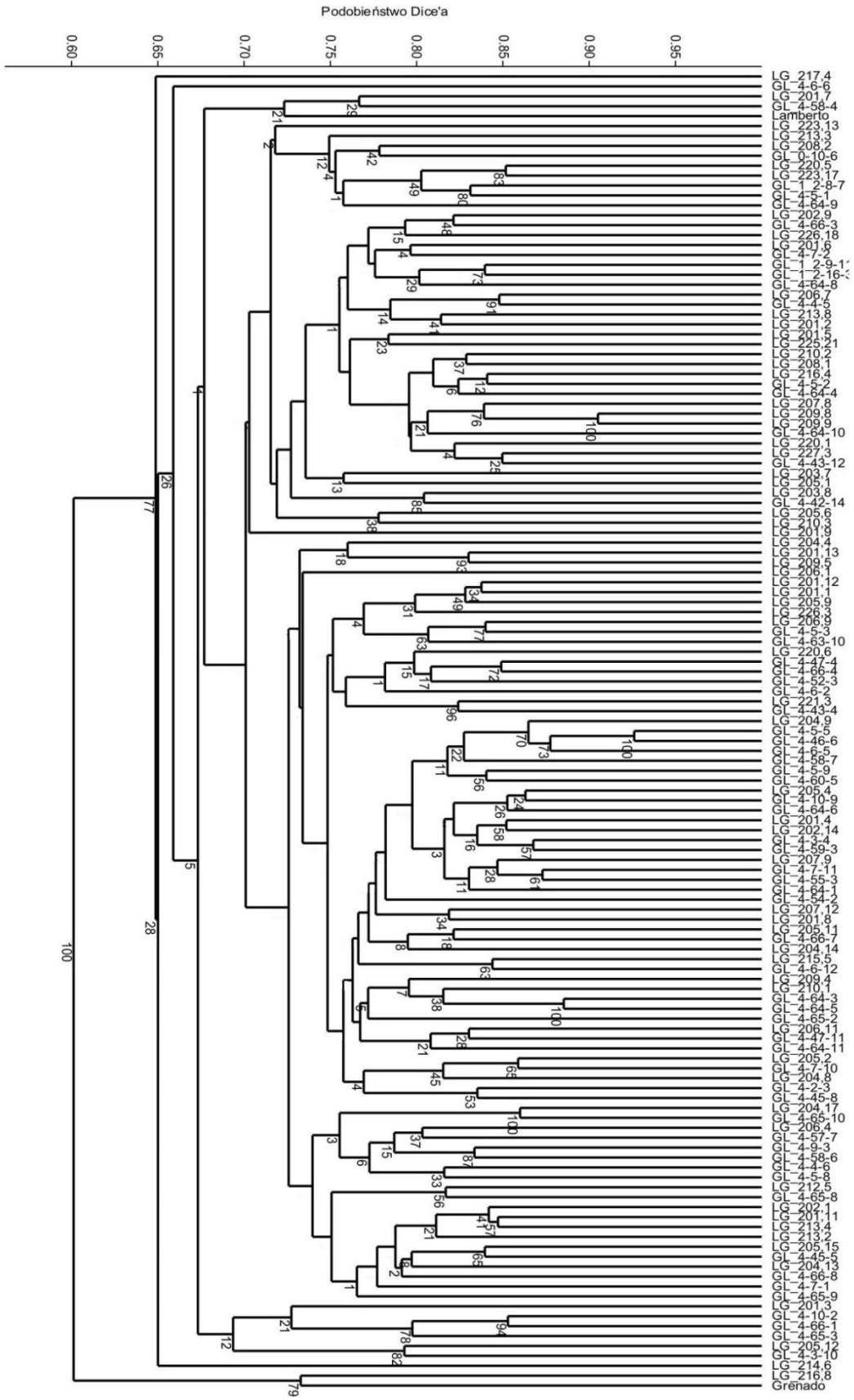
4.1.1. Analizy DArT

W wyniku analizy DArT na 91 roślinach populacji F_2 ‘Grenado’×‘Lamberto’ i 91 roślinach populacji F_2 ‘Lamberto’×‘Grenado’ oraz na odmianach rodzicielskich uzyskano 643 polimorficzne markery DArT. W wyniku wstępnych analiz struktury populacji z dalszych badań usunięto osobniki, które wykazywały zbyt duże podobieństwo genetyczne do formy rodzicielskiej ‘Grenado’. Ze względu na zmniejszoną liczebność badanej populacji zadecydowano o połączeniu obu populacji oraz utworzeniu wspólnej matrycy dla populacji dwukierunkowej ‘Lamberto’ i ‘Grenado’ ujednolicając zapis w macierzy 0-1.

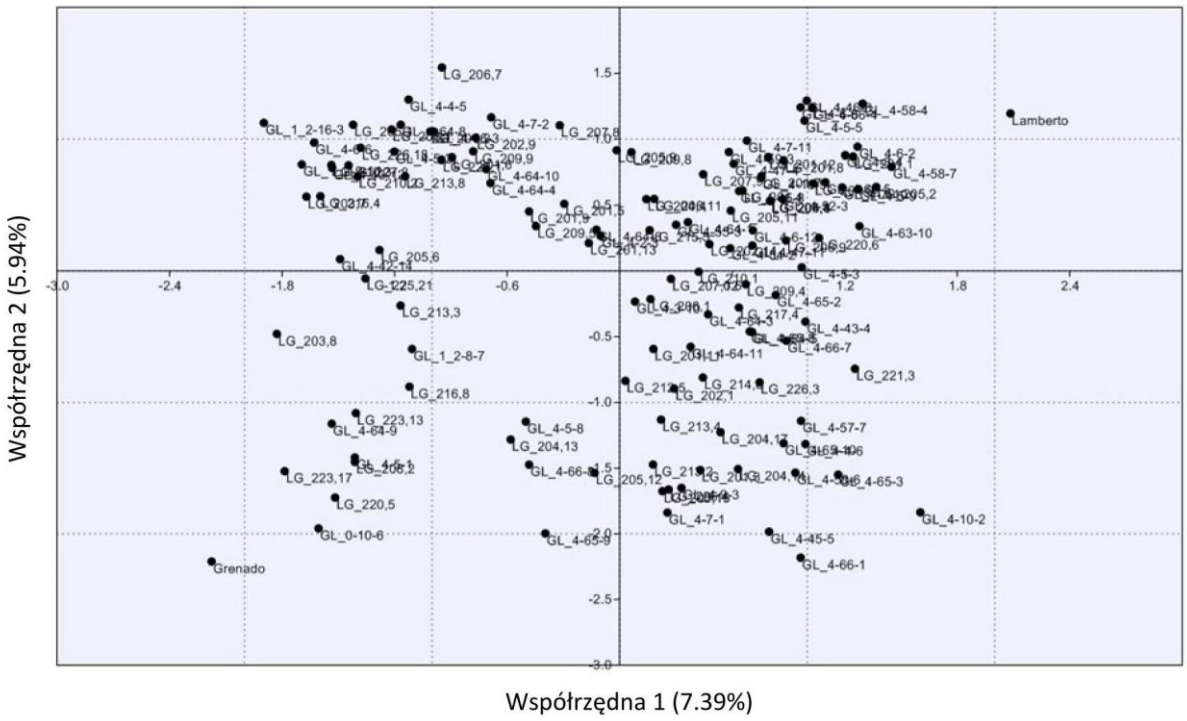
W wyniku analizy skupień metodą UPGMA, w oparciu o miary podobieństwa Dice’a, otrzymano dendrogram (Ryc 4.1) przedstawiający zależności pomiędzy 68 i 63 pojedynkami populacji mapujących, odpowiednio ‘Lamberto’×‘Grenado’ i ‘Grenado’×‘Lamberto’. Niskie wartości istotności wydzielanych grup uzyskane w wyniku próbkowania sugerują losowy rozkład genotypów. Górna cześć dendrogramu zawiera głównie genotypy należące do populacji LG (genotypy o oznaczeniach w przedziale od 201.1 do 227.3), natomiast dolna część dendrogramu – do populacji GL (genotypy o oznaczeniach w przedziale od 0-10-6 do 4-66-8). Podobieństwo Dice’a pomiędzy pojedynkami zawierało się pomiędzy 0.57 a 0.87, natomiast pomiędzy formami rodzicielskimi wynosiło 0.6. Odmiany rodzicielskie rozlokowane są w przeciwległych rejonach dendrogramu z osobnikami potomnymi populacji dwukierunkowej F_2 ‘Lamberto’ i ‘Grenado zlokalizowanymi w większości pomiędzy nimi.

Analiza składowych głównych bazująca na matrycy współczynników korelacji pomiędzy markerami pozwoliła na przedstawienie rozmieszczenia genotypów w układzie dwóch pierwszych składowych tłumaczących odpowiednio 7.39% i 5.94% całkowitej zmienności. Na podstawie wykresów rozmieszczenia analizowanych obiektów w układzie dwóch pierwszych współrzędnych głównych (Ryc. 4.2) nie można stwierdzić, że badane obiekty pszenżyta stanowią jedną grupę i należy dokładniej określić strukturę populacji.

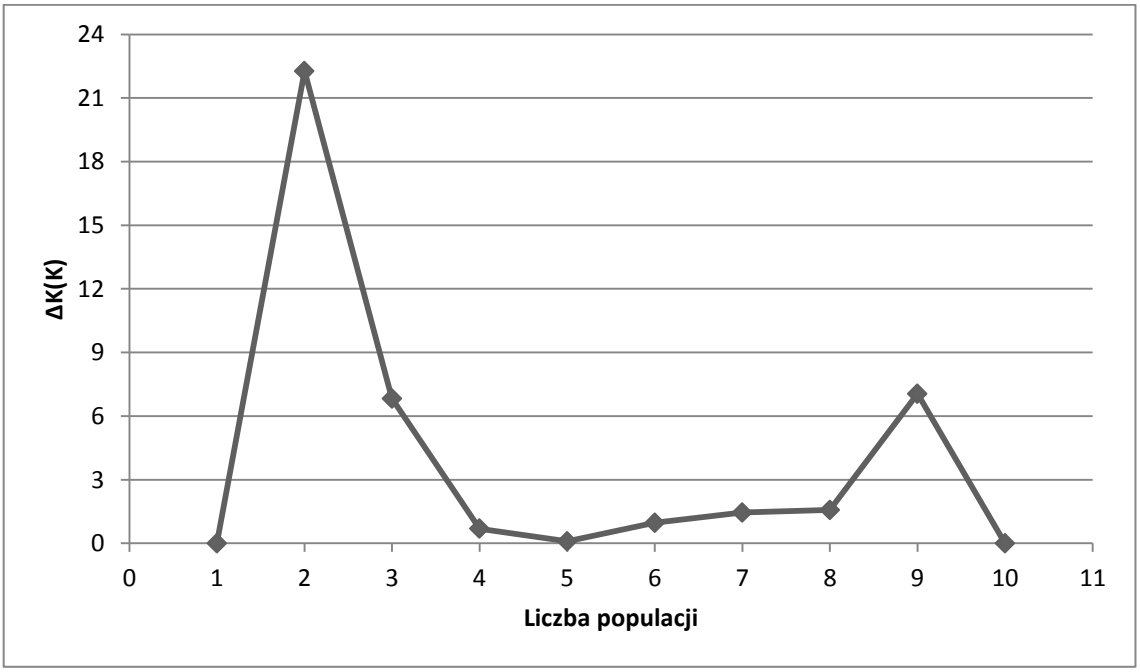
W wyniku dokładnej analizy struktury populacji, przy użyciu danych o niesprzężonych markerach (program STRUCTURE 2.3.4) uzyskano wartości $\Delta K(K)$ wskazujące, iż badana populacja dwukierunkowa ‘Lamberto’ i ‘Grenado’ jest złożona z dwóch subpopulacji (Ryc. 4.3).



Ryc. 4.1. Dendrogram uzyskany metodą średnich połączeń (UPGMA) w oparciu o macierz podobieństw Dice'a 131 pojedynków populacji dwukierunkowej F_2 'Lamberto' i 'Grenado' oraz genotypów rodzicielskich dla 643 markerów DArT.



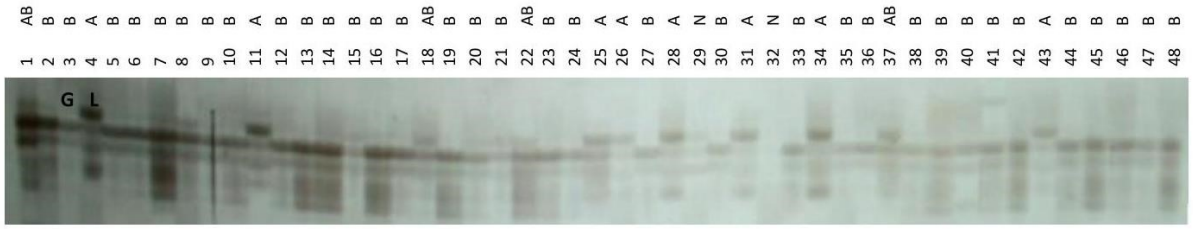
Ryc. 4.2. Rozmieszczenie badanych genotypów populacji dwukierunkowej F_2 'Lamberto' i 'Grenado' oraz form rodzicielskich w układzie dwóch pierwszych składowych głównych dla współczynników korelacji.



Ryc. 4.3. Analiza liczby subpopulacji w populacji dwukierunkowej 'Lamberto' i 'Grenado' na podstawie wartości ΔK(K).

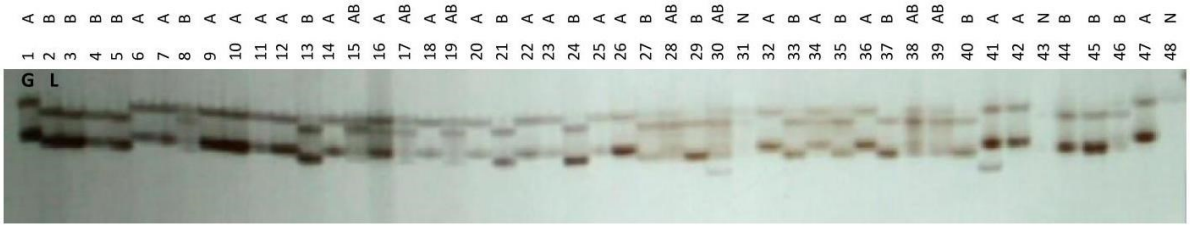
4.1.2. Badanie polimorfizmu markerów SSR u form rodzicielskich i w populacji mapującej

Spośród 29 markerów SSR, pochodzących z rejonów potencjalnie związanych z odpornością na mączniaka prawdziwego w populacjach mapujących (tzn. chromosomy 1R, 4R oraz 6R), 11 markerów (*rems1247, scm1, scm107, scm116, scm21, scm251, scm274, scm277, scm340, scm4, scm46*) było monomorficznych i nie różnicowało rodziców. Pozostałe 18 markerów wykazało polimorfizm pomiędzy rodzicami ‘Lamberto’ oraz ‘Grenado’ i markery te przeznaczone zostały do badania populacji mapującej. Przykładowe elektroforegramy dla markerów *scm310* oraz *scm269* zostały przedstawione na Ryc. 4.4 oraz Ryc. 4.5.



Ryc. 4.4. Rozdział elektroforetyczny przedstawiający polimorfizm markera *scm310;* oznaczenie: G – odmiana rodzicielska ‘Grenado’, L – odmiana rodzicielska ‘Lamberto’, A, B – homozygoty, AB – heterozygota.

Na populacjach F_2 ‘Lamberto’×‘Grenado’ i ‘Grenado’×‘Lamberto’ testowano odpowiednio 11 i 7 par starterów SSR. Na populacji ‘Lamberto’×‘Grenado’ testowano 11 markerów SSR (*scm310, scm295, scm214, rems1152, scm68, gwm37, scm142, scm275, scm310, gwm391, scm176*), uzyskując dane o segregacji w 12 loci. Dwa markery (*gwm391* oraz *scm176*) wykazywały charakter kodominujący, natomiast pozostałe dominujący. Na populacji ‘Grenado’×‘Lamberto’ testowano 7 markerów SSR (*scm219, scm177, scm126, scm36, scm127, scm247, scm269*), uzyskując dane o segregacji w 10 loci. Pięć loci wykazało zaburzenia segregacji, pozostałych pięć wykazało charakter dominujący.



Ryc. 4.5. Rozdział elektroforetyczny przedstawiający polimorfizm markera *scm269;* oznaczenie: G – odmiana rodzicielska ‘Grenado’, L – odmiana rodzicielska ‘Lamberto’, A, B – homozygoty, AB – heterozygota.

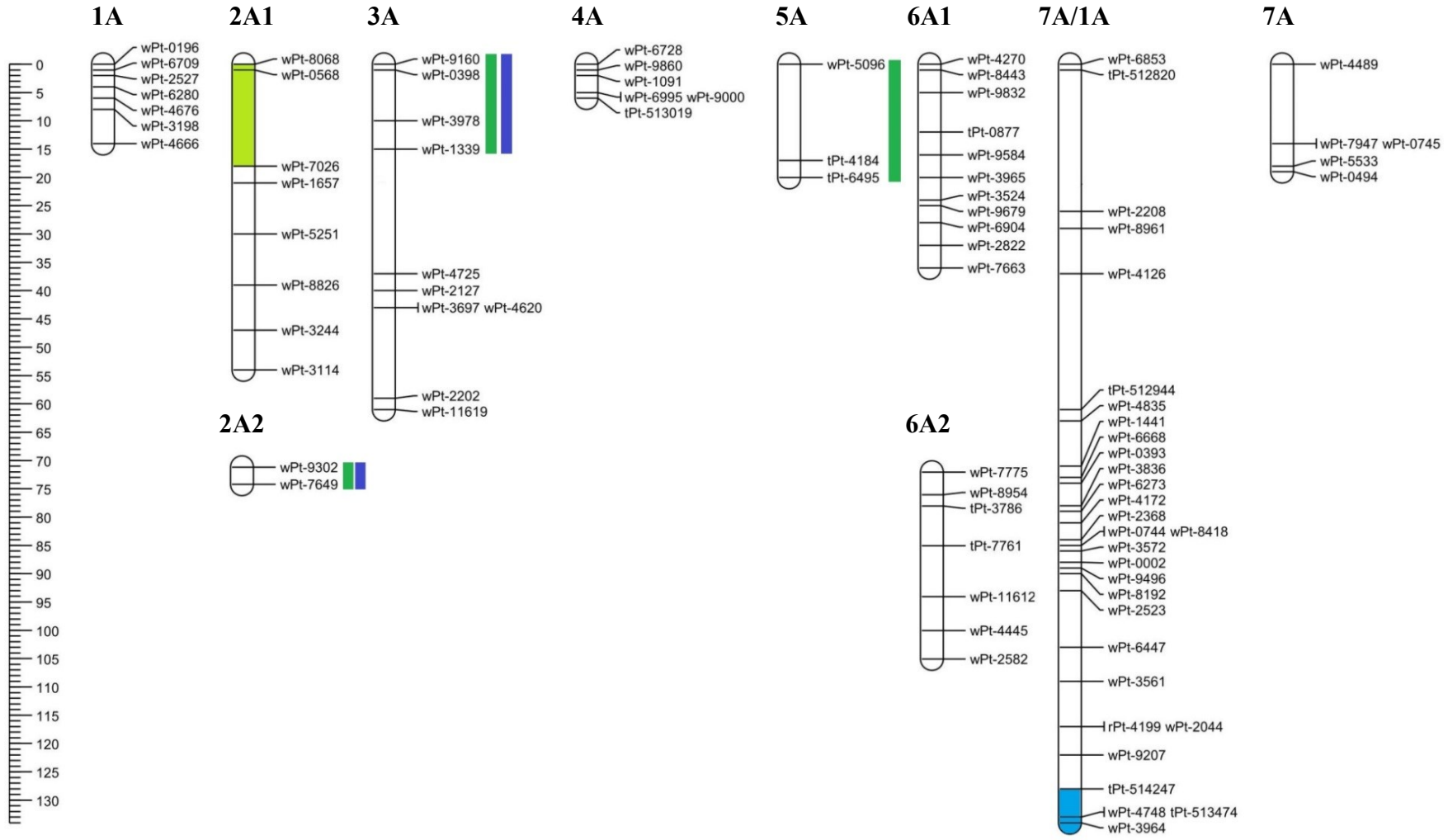
4.1.3. Konstrukcja mapy genetycznej

W wyniku analiz molekularnych otrzymano dane o segregacji 643 markerów DArT oraz 18 markerów SSR, które posłużyły do skonstruowania mapy genetycznej połączonej populacji ‘Lamberto’ i ‘Grenado’, liczącej 131 pojedynków.

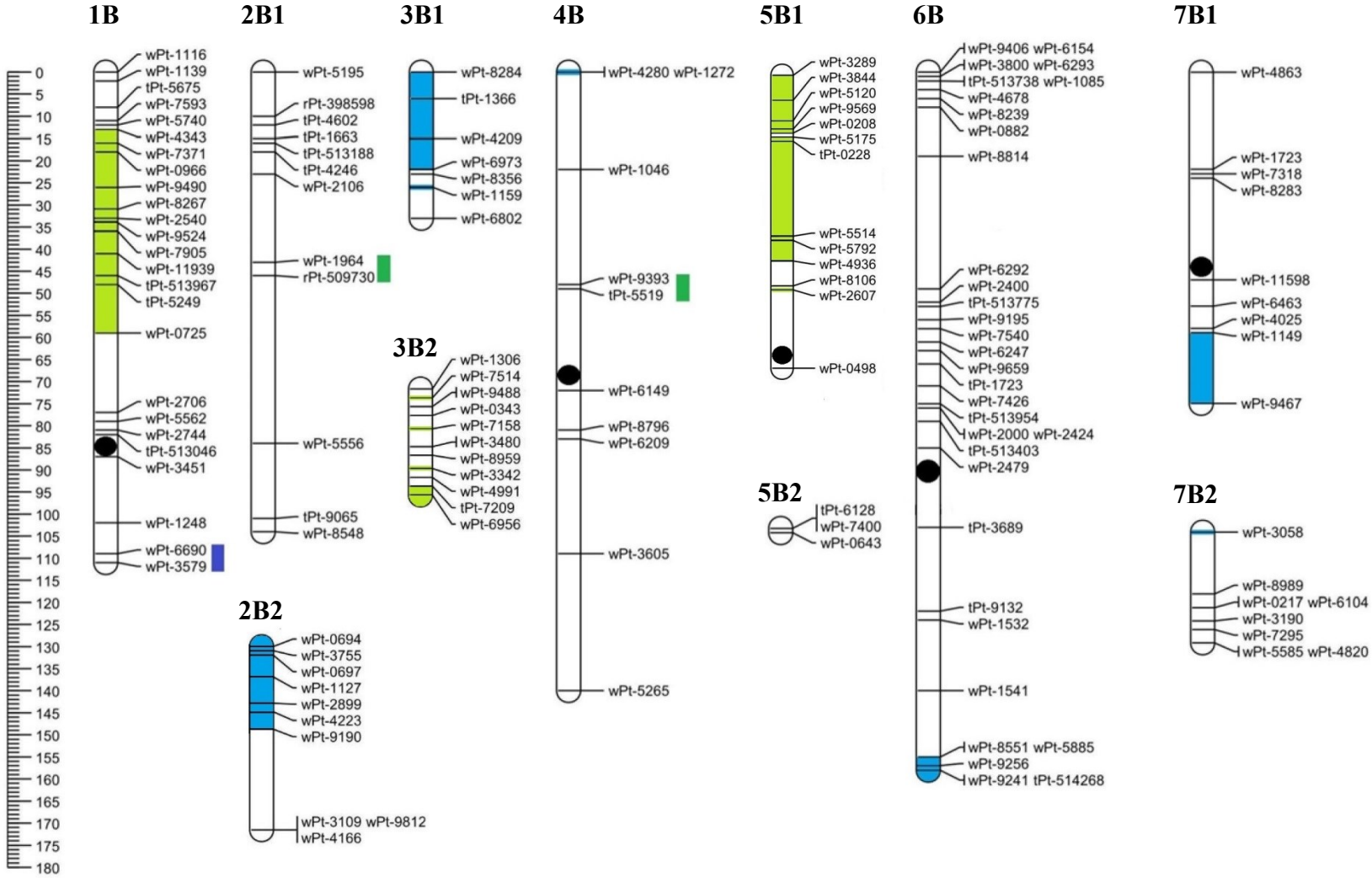
Uzyskana mapa genetyczna ma długość 1 813.6 cM. Wyodrębnionych zostało 26 grup sprzężeń, do których włączono 547 markerów DArT oraz 7 markerów SSR. Pozostałe markery zostały usunięte z analizy ze względu na brak informacji, od którego z rodziców pochodzą, wysoką istotność statystyczną odchylenia od oczekiwanego stosunku rozszczepień ($p<0.0001$) lub wprowadzanie zbyt dużych odległości mapowych w poszczególnych grupach sprzężeń. W celu lepszego zobrazowania grup sprzężeń usunięto markery dublujące daną lokalizację, eliminując markery posiadające więcej danych brakujących (Ryc. 4.6 – 4.8). Przy użyciu programu QTL IciMapping Version 3.2 [WANG i wsp. 2012] dokonano wyboru 432 markerów DArT, reprezentujących dane lokalizacje w grupach sprzężeń.

Genom A jest reprezentowany przez 10 grup sprzężeń o łącznej długości 380.6 cM (Tabela 4.1). Grupy sprzężeń zostały nazwane zgodnie ze znaną lokalizacją markerów DArT w genomie A pszenicy. Dla chromosomów 2A, 6A oraz 7A uzyskano po dwie grupy sprzężeń, oznaczone odpowiednio 2A1, 2A2, 6A1, 6A2 oraz 7A.1A i 7A. W genomie A zlokalizowano 110 markerów DArT, z czego 97 (88.2%) to markery pochodzenia pszenicznego – *wPt*, 12 (10.9%) markerów pochodzenia pszenżytniego – *tPt*, oraz jeden marker żytni – *rPt4199*. Na przedstawionej mapie genomu A (Ryc. 4.6) umieszczono 89 markerów reprezentujących unikalne loci w grupach sprzężeń. Długość poszczególnych grup sprzężeń wynosi od 3.3 do 133.8 cM. Najwięcej (32) markerów DArT zmapowano w grupie 7A.1A, a najmniej (3) w grupach 2A2 oraz 5A.

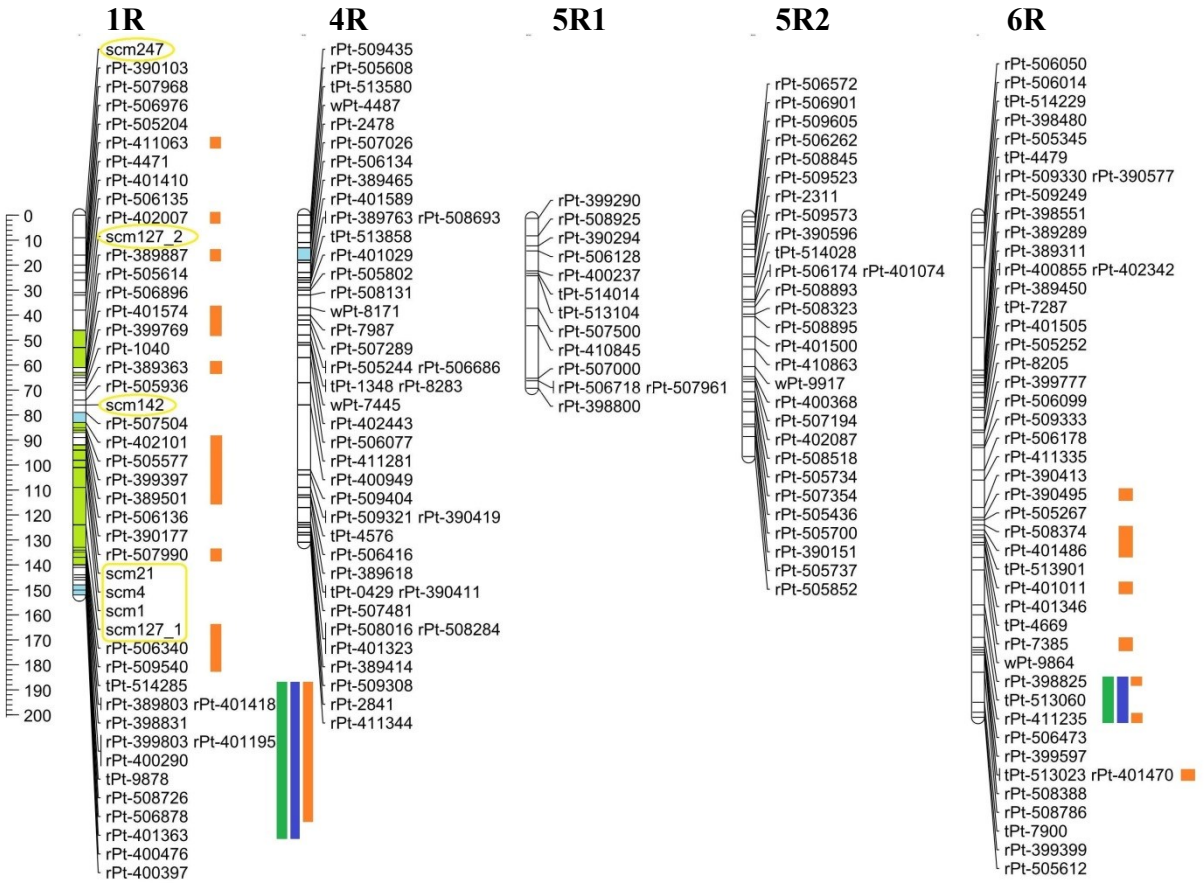
Genom B jest reprezentowany przez 11 grup sprzężeń, o długości wynoszącej 785.3 cM (Tabela 4.1). Na chromosomach genomu B zlokalizowano 194 markery DArT, z czego 87.3% to markery pszeniczne, 11.6% to markery pszenżytnie, natomiast 1% stanowią markery żytnie. Grupy sprzężeń zostały nazwane zgodnie ze znaną lokalizacją chromosomową markerów DArT. Markery z chromosomów 2B, 3B, 5B oraz 7B utworzyły po dwie grupy sprzężeń nazwane odpowiednio 2B1, 2B2, 3B1, 3B2, 5B1, 5B2 oraz 7B1, 7B2. Długość grup sprzężeń wynosi od 25.2 do 158.5 cM. Najwięcej markerów DArT tworzy grupę 6B, która jest jednocześnie najdłuższa (158.5 cM), oraz zawiera najwięcej markerów pszenżytnich. Na przedstawionej mapie genomu B (Ryc. 4.7) umieszczono 141 markerów reprezentujących 194 zmapowanych markerów.



Ryc. 4.6. Mapa genetyczna genomu A populacji dwukierunkowej F_2 ‘Lamberto’ i ‘Grenado’ z naniesionymi efektami QTL odporności na *B.graminis*; linią zieloną oraz niebieską zaznaczono QTLe wykryte w stadium rośliny dojrzałej na podstawie AUDPC oraz maksymalnego porażenia rośliny; kolorami zaznaczono rejony o zaburzonej segregacji markerów DArT – na zielono pochodzących od formy ‘Grenado’, na niebiesko od formy ‘Lamberto’; centromery wyznaczono na podstawie analizy strukturalnej opisanej w podrozdziale 4.1.6.



Ryc. 4.7. Mapa genetyczna genomu B populacji dwukierunkowej F_2 ‘Lamberto’ i ‘Grenado’ z naniesionymi efektami QTL odporności na *B.graminis*; linią zieloną oraz niebieską zaznaczono QTLe wykryte w stadium rośliny dojrzałej na podstawie AUDPC oraz maksymalnego porażenia rośliny; kolorami zaznaczono rejony o zaburzonej segregacji markerów DArT; na zielono pochodzących od formy ‘Grenado’, na niebiesko od formy ‘Lamberto’; centromery wyznaczono na podstawie analizy strukturalnej opisanej w części 4.1.6.



Ryc.4.8. Mapa genetyczna genomu R populacji dwukierunkowej F_2 'Lamberto' i 'Grenado' z naniesionymi efektami QTL odporności na *B. graminis*; linią żółtą zaznaczono 7 dodatkowych markerów SSR; zieloną oraz niebieską linią zaznaczono QTLe wykryte w stadium rośliny dojrzałej na podstawie AUDPC oraz maksymalnego porażenia rośliny; pomarańczową linią zaznaczono QTLe wykryte w stadium siewki na podstawie testów inokulacyjnych; kolorami zaznaczono rejony o zaburzonej segregacji markerów DArT; na zielono pochodzących od formy 'Grenado', na niebiesko od formy 'Lamberto'.

Genom R jest reprezentowany jedynie przez 5 grup sprzężeń, które utworzono na podstawie segregacji 250 markerów DArT oraz 7 markerów SSR (Tabela 4.2). Długość genomu R wynosi 647.7 cM. Najdłuższą grupą sprzężeń jest 6R – 201.1 cM. Uzyskany genom R nie jest zbalansowany, gdyż nie uzyskano grup sprzężeń odpowiadających chromosomom – 2R, 3R oraz 7R. Grupy sprzężeń oznaczono na podstawie lokalizacji markerów DArT oraz markerów SSR (grupa sprzężeń 1R). Uzyskano dwie grupy z chromosomu 5R, nazwane 5R1 oraz 5R2. Markery SSR zlokalizowano w jednej grupie sprzężeń – 1R (Ryc. 4.8). Najwięcej zmapowanych markerów było pochodzenia żytniego – 85.2% (213 markerów). Markery pszeniczne stanowią 3.2%, natomiast pszenżytnie 8.8%. Długość grup sprzężeń wynosi od 68 cM do 201.1 cM. Na przedstawionej mapie genomu R (Ryc. 4.8) umieszczono 211 markery reprezentujące 250 zmapowanych markerów.

Tabela 4.1. Charakterystyka genomów A i B dwukierunkowej populacji F_2 'Lamberto' i 'Grenado': podział na grupy sprzężeń, zlokalizowane w nich markery oraz markery zlokalizowane na mapach referencyjnych – konsensusowej mapie pszenicy z CIMMYT oraz konsensusowej mapie genomów A i B pszenicy [Marone i wsp. 2012].

	Grupa sprzężeń	*Fragment strukturalny*	*Proponowane chromosomy*	*Długość (cM)*	*Markery DArT*	*Reprezentatywne markery DArT*	*Gęstość (cM)*	*Liczba markerów na mapach referencyjnych*	
								CIMMYT	*Marone i wsp. (2012)*
GENOM A	**1A**	1AS#	1A	13.1	8	7	1.6	3	6
	2A1	2AS#	2A	54.5	10	8	5.5	1	2
	2A2	#2AL#	2R	3.3	3	2	1.1	-	2
	3A	#3A	3A	61.4	10	10	6.1	2	5
	4A	#4A	4A	6.2	11	6	0.6	1	3
	5A	#5A	5A	20.2	3	3	6.7	2	5
	6A1	6AS#	6A	36.2	16	11	2.3	2	12
	6A2	#6AL		32.6	8	7	4.1	2	6
	7A.1A	7AS#	7R	133.8	32	30	4.2	4	7
	7A	#7AL	7A	18.6	9	5	2.1	4	-
	Łącznie			**380.6**	**110**	**89**	**3.43**	**21**	**48**
GENOM B	**1B**	1BS.1BL#	1B	111.3	39	25	2.8	6	9
	2B1	2BS#	2B	104.0	19	12	5.5	5	4
	2B2	#2BL		42.5	11	10	3.9	1	1
	3B1	#3BS#	3B	33.2	7	5	1.2	7	2
	3B2	#3BL	5BS.3BL	23.7	18	12	1.4	2	8
	4B	4BS.4BL#	4B	140.4	12	10	11.7	4	3
	5B1	5BS.5BL#	5B	70.7	20	13	3.5	6	5
	5B2	-	5BS.3BL	0.9	7	4	0.13	-	-
	6B	6B	6B	158.5	41	33	3.9	9	16
	7B1	7BS.7BL#	7B	74.9	11	9	8.3	7	6
	7B2	#7BL		25.2	9	8	2.3	2	8
	Łącznie			**785.3**	**194**	**141**	**4.0**	**49**	**62**

Wykorzystane w pracy markery DArT poddano analizie testem *chi*^{2} pod kątem zgodności obserwowanych segregacji z oczekiwanym, mendlowskim stosunkiem rozszczepień w dwukierunkowej populacji mapującej (Aneks, Tabela Z1.1). W populacji F_2 markery dominujące (DArT) powinny segregować zgodnie ze stosunkiem 3:1 (A-:aa), natomiast markery kodominujące SSR 1:2:1 (AA:AB:BB). Dla wartości testu *chi*^{2} zawierających się w przedziale krytycznym (dla poziomu istotności $p < 0.1$) od 0 do 2.706, przyjęto hipotezę zerową o braku odchyleń od zakładanego stosunku rozszczepień. Zgodność segregacji z rozkładem 3:1 wykazywało 369 markerów DArT. Istotne odchylenie od powyższej segregacji ($p < 0.1$) wykazało 169 markerów (31.6%). Podwyższoną częstość allelu pochodzącego od 'Lamberto' wykazywało 97 markerów, natomiast od 'Grenado' 72 markery. Najwięcej markerów z zaburzoną segregacją zlokalizowano w grupach sprzężeń 7A.1A, 2B2, 3B1, 6B, 7B1, 4R (pochodzące od formy 'Lamberto') oraz 2A1, 1B, 3B2, 5B1, 1R (pochodzące od formy 'Grenado').

Tabela 4.2. Charakterystyka genomu R dwukierunkowej populacji F_2 'Lamberto' i 'Grenado'; podział na grupy sprzężeń i zlokalizowane w nich markery. Zlokalizowane wspólne markery genomu R w odniesieniu do dwóch map referencyjnych mapy żyta ozimego 'L318'×'L9' [Bolibok-Brągoszewska i wsp. 2009] oraz mapy 'Saka3006'×'Modus' (S×M) [TYRKA i wsp. 2011].

Grupa sprzężeń	*Proponowane chromosomy*	*Długość (cM)*	*Markery DArT (w tym SSR)*	*Reprezentatywne markery DArT*	*Gęstość (cM)*	*Liczba markerów na mapach referencyjnych*	
						L318×L9	*S×M*
1R	1R	152.0	58(7)	47	7	2	-
4R	4R	130.7	71	43	-	7	25
5R1	5R	68.0	27	27	-	3	6
5R2		95.9	37	37	-	4	8
6R	6R	201.1	57	47	-	9	9
Łącznie		**647.7**	**250(7)**	**211**	**7**	**25**	**48**

4.1.6. Analiza strukturalna mapy genetyczej

Analizę strukturalną utworzonych grup sprzężeń przeprowadzono w celu określenia kompletności uzyskanych grup sprzężeń, sprawdzenia kolinearności układu markerów oraz naniesienia lokalizacji centromerów chromosomów. Porównano uzyskaną mapę genetyczną genomów A i B ze zintegrowaną mapą pszenicy CIMMYT (GrainGenes, http://wheat.pw.usda.gov/ggpages/map_summary.html), mapą odmian Conan×Reeder [SHERMAN i wsp. 2009] oraz mapą pszenicy utworzoną przez Marone i wsp. (2012) dla sześciu populacji mapujących: 'Creso'×'Pedroso', 'Ofanto'×'Cappelli', 'Cirillo'×'Neodur', 'Ciccio'×'Svevo', 'Latino'×'Primadur' oraz 'Messapia'×'MG4343'. Mapę genomu R porów-

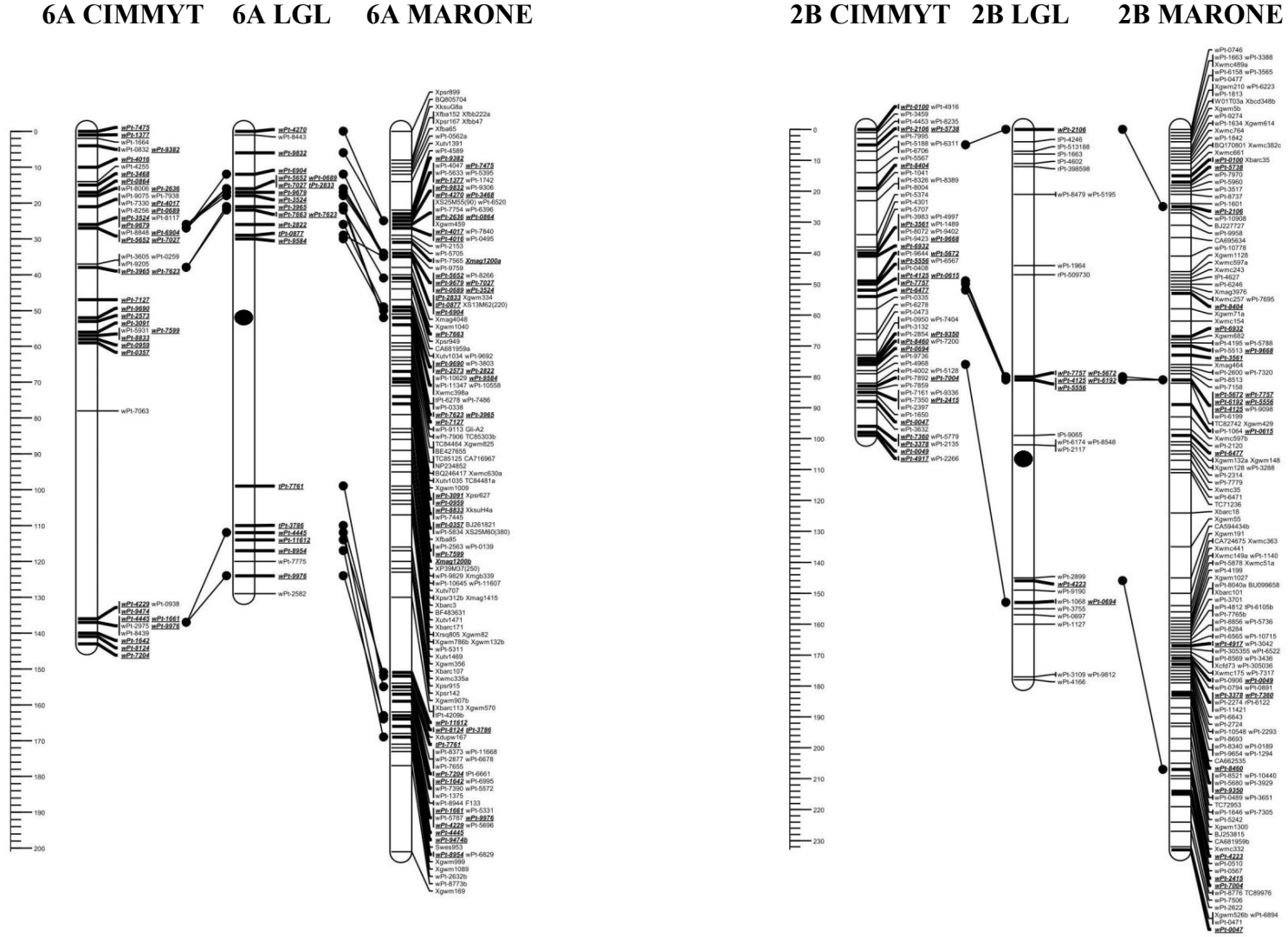
nano z mapą genetyczną odmian żyta L318×L9 [BOLIBOK-BRĄGOSZEWSKA i wsp. 2009]. Wprowadzono nazewnictwo grup sprzężeń w odniesieniu do fragmentu/ów chromosomu jakiemu odpowiadają. Nazewnictwo chromosomów niekompletnych zastosowano wg Tyrki [TYRKA i wsp. 2011], gdzie # oznacza miejsce pęknięcia chromosomu. W załącznikach nr 2-4 przedstawione zostały wyniki analizy porównawczej dla grup sprzężeń genomów A, B i R posiadających więcej niż jeden wspólny marker z mapą pszenicy zwyczajnej CIMMYT lub z mapą konsensusową pszenicy twardej wg Marone i wsp. (2012).

Przedstawione grupy sprzężeń odpowiadają całym chromosomom, chromosomom niekompletnym lub fragmentom chromosomów. Głównym kryterium, według którego daną grupę sprzężeń uznano za kompletny chromosom jest zlokalizowanie markerów reprezentujących krótkie i długie ramię chromosomu oraz jego rejon centromerowy (Ryc.4.7, grupa sprzężeń 6B). Za chromosom niekompletny uznano tę grupę sprzężeń, dla której zlokalizowano markery jednego z dwóch ramion chromosomu oraz z rejonu centromerowego (Ryc.4.7, grupy sprzężeń 1B, 4B, 5B1, 7B2). Fragmentom chromosomów odpowiadają grupy sprzężeń, które reprezentują określone rejony z krótkich (S) lub długich (L) ramion odpowiednich chromosomów. Po dwie grupy sprzężeń przydzielono do chromosomów 2A, 6A, 7A, 2B, 3B, 5B, 6B, 7B oraz 5R. Odpowiadają one fragmentom tych chromosomów. U pszenicy genomy A i B są reprezentowane przez 7 chromosomów, natomiast w badanej populacji pszenżyta do genomów A i B zaliczono odpowiednio 10 i 11 grup sprzężeń. Z kolei w uzyskanym genomie R brakuje grup sprzężeń odpowiadających chromosomom 2R, 3R oraz 7R.

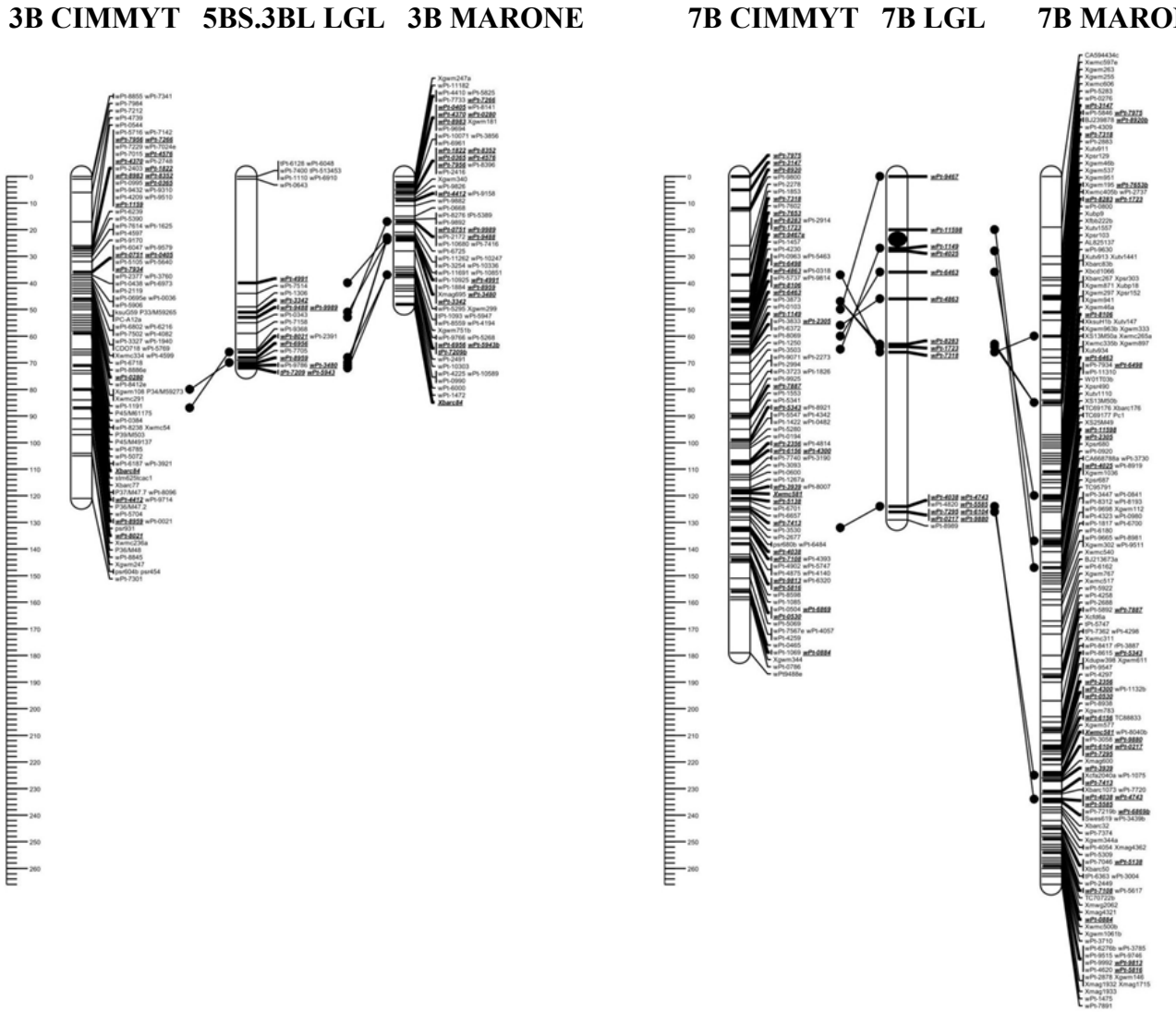
Dzięki analizie porównawczej grup sprzężeń z genomu A można zaproponować połączenie grup 6A1 i 6A2 w chromosom 6A (Ryc. 4.9). Połączenie tych dwóch grup sprzężeń nastąpiło przy LOD = 1.0, a odległość między nimi wyniosła 69.79 cM. W nowo utworzonej grupie nie ma markerów zlokalizowanych w bezpośrednim rejonie centromeru. Na mapie Marone i wsp. (2012) marker *wPt-9584* znajduje się na krótkim ramieniu 6A ok. 20 cM od centromeru. Na podstawie tej informacji zaznaczono centromer w odległości 20 cM od markera *wPt-9584* w połączonej grupie 6A. Grupa ta reprezentuje cały chromosom. Grupy sprzężeń 2A1 oraz 2A2 nie uległy połączeniu, nawet przy LOD < 1. Przyjęto zatem, iż są to grupy odpowiadające fragmentom dwóch chromosomów. Grupa sprzężeń określona jako 1A przedstawia fragment krótszego ramienia chromosomu i została nazwana 1AS#. Markery zlokalizowane w grupie 2A1 wskazują, iż jest to fragment 2AS#, natomiast 2A2 – #2AL#. Grupa 3A nazwana #3AL według lokalizacji markerów DArT na obu mapach referencyjnych. Grupa 4A nazwana #4AL na podstawie 4 wspólnych markerów z obiema mapami referencyjnymi. Grupę 5A nazwano #5AL porównując ją z mapą Marone i wsp. (2012), na której odnalezione zostały dwa wspólne markery ułożone kolinearnie (*wPt-4184* i *wPt-6495*). W grupie 6A nie ma markerów z rejonu centromerowego. Pod względem strukturalnym zostały nazwane odpowiednio 6A1 – 6AS#, 6A2 – #6AL. Grupa sprzężeń 7A odpowiada fragmentowi #7AL, natomiast grupa 7A/1A fragmentowi – 7AS#.

Grupy sprzężeń 1B, 4B, 5B1, 7B2 reprezentują prawie całe chromosomy, brakuje im markerów odpowiadającym dystalnym fragmentom długich ramion. Dla pięciu grup udało się zlokalizować położenie centromeru (Ryc. 4.7). Grupy sprzężeń 2B2, 3B2 i 7B2 odpowiadają fragmentom dystalnym długich ramion odpowiednich chromosomów. Grupa 2B1 odpowiadała części krótkiego ramienia, natomiast 3B2 była kolinearna z fragmentem długiego ramienia chromosomu 3B. Największą liczbę wspólnych markerów z mapą pszenicy Marone i wsp. (2012) zlokalizowano w grupie sprzężeń 6B, która odpowiada kompletnemu chromosomowi 6B łącznie z rejonem centromerowym. Dzięki analizie porównawczej grup sprzężeń z genomu B można zaproponować połączenie grup 2B1, 2B2, 3B2, 5B2 oraz 7B1, 7B2, odpowiednio w chromosomy 2B, 5BS.3BL oraz 7B (Ryc.4.9 i Ryc. 4.10). Grupy sprzężeń 2B1 oraz 2B2 zostały połączone przy LOD równym 3.0, a odległość między grupami wyniosła 42.52 cM. Po połączeniu tych grup i porównaniu z mapami referencyjnymi zaproponowano rozmieszczenie markerów DArT na chromosomie 2B wraz z lokalizacją rejonu centromerowego.

Grupa sprzężeń 5B2 oraz 3B2 uległa połączeniu przy LOD równym 4.0, wprowadzając przerwę o długości 38.88 cM. Na mapach referencyjnych 5B nie było wspólnych markerów z rejonem 5B2, dlatego też grupa sprzężeń 5BS.3BL została porównana z chromosomem 3B map referencyjnych. Połączenie grup 7B1 i 7B2 nastąpiło przy LOD = 1.6, a odległość między nimi wyniosła 57.37 cM. Na podstawie porównania kolinearności markerów z mapami referencyjnymi odwrócono kolejność markerów na utworzonym chromosomie (Ryc. 4.10). Powstał w ten sposób fragment #7BS.7BL zbudowany z 18 markerów DArT. Proponowany chromosom 7B zawiera inwersję odcinka o długości około 40 cM. Na odcinku od markera *wPt-1149* do *wPt-7318* kolejność markerów jest odwrócona w porównaniu do map referencyjnych.



Ryc. 4.9. Połączone chromosomy 6A, 2B wraz z zaznaczonymi centromerami; porównanie z mapami referencyjnymi: mapą konsensusową CIMMYT oraz mapą konsensusową genomów A i B utworzoną przez zespół Marone i wsp. (2012).



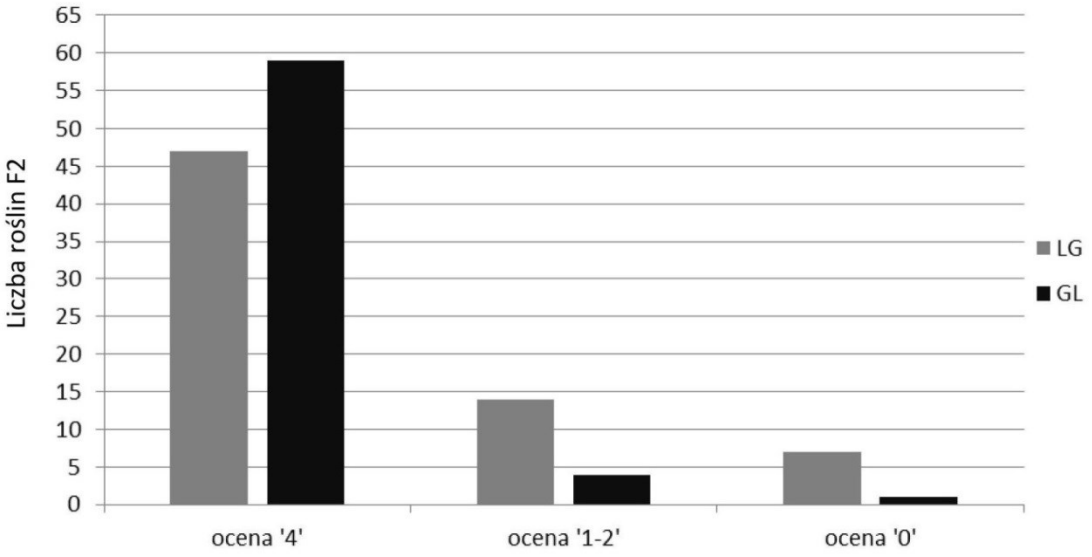
Ryc. 4.10. Połączone chromosomy 3B, 5B oraz 7B wraz z zaznaczonymi centromerami; porównanie z mapami referencyjnymi: mapą konsensusową CIMMYT oraz mapą konsensusową genomu B utworzoną przez zespół Marone i wsp. (2012).

Ze względu na brak danych odnośnie położenia centromerów w genomie R nie przydzielono nazw strukturalnych grupom sprzężeń R. Grupy sprzężeń z genomu R posiadają najwięcej zmapowanych markerów. Grupy 1R oraz 4R odpowiadają całym chromosomom. Grupy 5R1 i 5R2 odpowiadają jedynie fragmentom chromosomu 5R. Marker *rPt-506976* zmapowany u pszenżyta przez Tyrkę i wsp. (2011) na chromosomie 5R został zlokalizowany na chromosomie 1R. Dzięki analizie porównawczej grup sprzężeń z genomu R można zaproponować połączenie grup 5R1 i 5R2 w chromosom 5R. Połączenie tych dwóch grup sprzężeń nastąpiło przy LOD = 4.0, a odległość między nimi wyniosła 43.32 cM. Chromosom z grupy sprzężeń 6R nie posiada jedynie fragmentu ramienia 6RS.

W grupach 1A, 6A1, 6A2, 7A, 7A.1A, 1B, 4B, 5B, 7B2 oraz 4R pojedyncze markery wykazują zaburzenia kolinearności. Dla genomów pszenicznych liczba wspólnych markerów z mapami CIMMYT i Marone i wsp. (2012) została przedstawiona w Tabeli 4.1, a dla genomu żytniego z mapami Bolibok-Brągoszewskiej i wsp. (2009) i Tyrki i wsp. (2011) w Tabeli 4.2. Najwięcej wspólnych markerów DArT znaleziono w grupach odpowiadających chromosomom 6B, 6A oraz 6R, odpowiednio 16, 12 i 11 markerów.

4.2. Analiza fenotypowa

Populacje F_2 pszenżyta ozimego ‘Lamberto’×’Grenado’ oraz ’Grenado’×‘Lamberto’ scharakteryzowano w stadium siewki pod względem reakcji na porażenie izolatami *Blumeria graminis* (Ryc. 4.11). W wyniku testów rośliny sklasyfikowano jako wrażliwe (ocena ‘4’) i odporne (ocena ‘0’ i ‘1-2’).



Ryc. 4.11. Ocena fenotypowa na podstawie testów inokulacyjnych roślin populacji F_2 ‘Lamberto’×’Grenado’ i ‘Grenado’×’Lamberto’, odpowiednio dla 68 i 63 pojedynków; ocena ‘4’ – wrażliwe (brak odporności), ‘1-2’ – średnioodporne, ’0’ – odporne.

Liczebność roślin w poszczególnych klasach wykorzystano do określenia sposobu dziedziczenia cechy. Istotność odchyleń uzyskanych stosunków rozszczepień od oczekiwanego stosunku rozszczepień analizowano testem chi^2 (Tabela 4.3.).

W wyniku analizy chi^2 uzyskano informacje o najlepszym dopasowaniu uzyskanych stosunków rozszczepień do segregacji przewidywanych dla modelu jedno- i dwugenowego. Dla oczekiwanego stosunku rozszczepień 3:1 oraz poziomu istotności 0.005 wartość testu chi^2 wynosi 3.841. Rozkład genotypów w populacji 'Lamberto'×'Grenado' był zbliżony do 3 (wrażliwe) :1 (odporne), co świadczy o recesywnym, jednogenowym modelu odporności. Różnice pomiędzy założonym rozkładem genotypów 3:1 a uzyskanymi wynikami testów inokulacyjnych nie były statystycznie istotnie. Jednocześnie hipoteza o współdziałaniu genów nieallelicznych (rozszczepienia 7:9) jest mniej prawdopodobna (0.03-0.05). Odrzucono natomiast hipotezę o dziedziczeniu kodominującym i stwierdzono, że obserwowany rozkład genotypów nie był zgodny ze stosunkiem 1:2:1.

Dla populacji 'Grenado'×'Lamberto' weryfikowano hipotezy o rozkładzie zgodnym z dziedziczeniem jednogenowym (3:1) i dwugenowym (15:1). Z prawdopodobieństwem $0.0001 < P < 0.001$ odrzucono hipotezę o dziedziczeniu zgodnym ze stosunkiem 3:1. Przyjęto natomiast z prawdopodobieństwem $p > 0.9$ hipotezę o współdziałaniu komplementarnym dwóch genów recesywnych. Rozkład 15:1, świadczy o tym, że w populacji 'Grenado'×'Lamberto' reakcja odporności na *B. graminis* jest determinowana przez dwa geny recesywne.

Rośliny populacji F_3 'Lamberto'×'Grenado', stanowiące potomstwo roślin F_2 tworzących populację mapującą (68) oceniono pod względem stopnia porażenia przez mączniaka prawdziwego. Na Ryc. 4.12 przedstawiono wyniki testów polowych przeprowadzonych w trzech terminach: I – III.

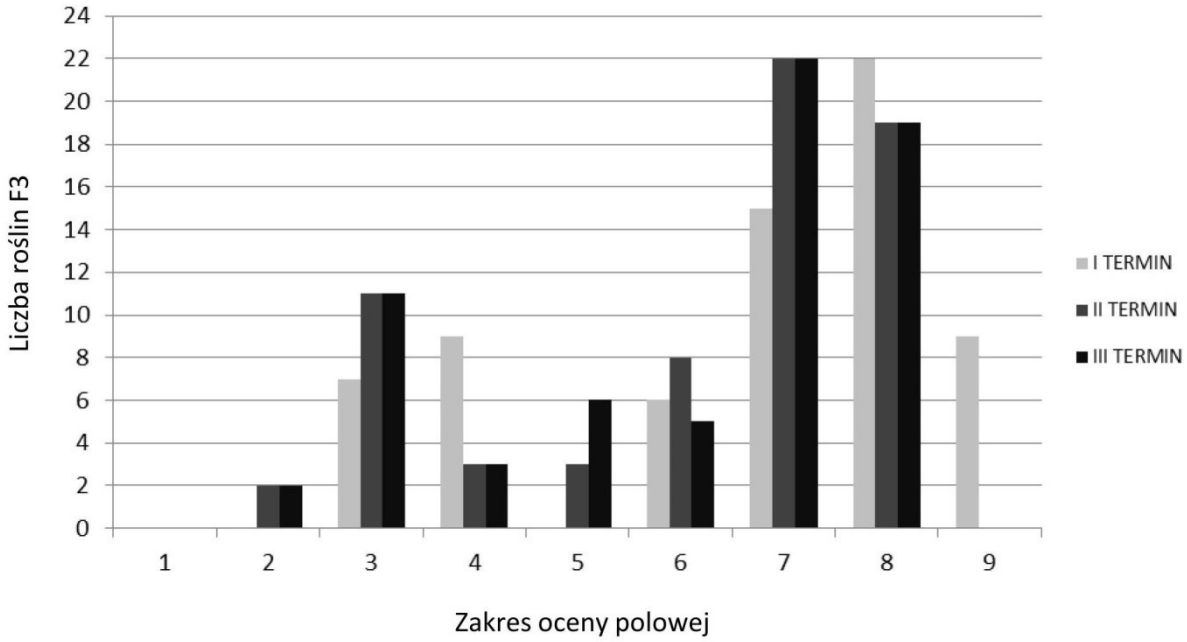
Przeprowadzona analiza wariancji wykazała istotność różnic pomiędzy rodzinami F_3 w warunkach polowych przy $p < 0.0001$ (Tabela 4.4). Uzyskane wyniki charakteryzują się zróżnicowaniem, dzięki czemu mogą być prowadzone dalsze analizy genotypowe i identyfikacja QTLi.

Przeprowadzono analizę statystyczną sprawdzającą rozkład normalny badanej cechy przy pomocy testu *Shapiro-Wilk* (Tabela 4.5). Przedział krytyczny dla liczebności populacji 68 i stopnia swobody 0.05 wynosi od 0 do 0.957. Dzięki oszacowanej wartość testu (0.712) odrzucona została hipoteza zerowa o zgodności uzyskanych wyników z rozkładem normalnym. Aby móc przeprowadzić dalsze analizy statystyczne w postaci mapowania loci cech ilościowych przeprowadzono normalizację uzyskanych wyników.

Tabela 4.3. Analiza dziedziczenia cechy w populacjach F_2 'Lamberto'×'Grenado' i 'Grenado'×'Lamberto' na podstawie wyników testów inokulacyjnych 131 pojedynków.

Populacja	*Liczba roślin*	*Rośliny wrażliwe*	*Rośliny odporne*	*df*	*chi²*	*Poziom istotn.*	*Oczekiwany stosunek rozszczepień*
'Lamberto' ×'Grenado'	68	47	21[a]	1	1.25	0.2 – 0.3	3:1
					4.57	0.03 – 0.05	7:9
			14* 7**	2	11.38	< 0.001	1:2:1
'Grenado' ×'Lamberto'	63	59	4[a]	1	0.001	0.95 – 0.9	15:1
			3* 1**		11.68	< 0.001	3:1

[a] – połączona grupa roślin średnioodpornych oraz odpornych odpowiednio ocenie porażenia siewki 1-2 oraz 4;
* – wyszczególnione rośliny średnioodporne;
** – wyszczególnione rośliny odporne.



Ryc. 4.12. Zmienność ocen fenotypowych dla 68 roślin populacji F_3 'Lamberto'×'Grenado' dla trzech terminów: I – 01.06.2010; II – 14.06.2010; III – 02.07.2010; 1 – oznacza porażenie całkowite, 9 – brak oznak porażenia.

Tabela 4.4. Wyniki analizy wariancji procentu porażonych liści 68 roślin populacji F_3 'Lamberto'×'Grenado' w stadium rośliny dojrzałej (pod uwagę brane są pojedynki, które były poddawane analizie genotypowej).

Źródło zmienności	*SS*	*df*	*MS*	*F*	*p*
Rodzina F_3	2652.99	67	884.33	97,58	< 0.0001
Błąd	27.19	136	8.34		
Ogółem	2680.18	203			

SS – suma kwadratów odchyleń od średniej (ang. *Sum of Squares*)
df – liczba stopni swobody
MS – średni kwadrat odchyleń od średniej (ang. *Mean Square*)
F – wartość statystyki F
p – wartość p (ang. *p-value*) – poziom istotności wyznaczony dla wartości statystyki testowej

Tabela. 4.5. Charakterystyka rozkładu cech w populacji 'Lamberto'×'Grenado' – porażenie maksymalne oraz AUDPC.

Ocena	*Średnia dla populacji*	*Wariancja*	*Skośność*	*Kurtoza*	*df*	*W*	*p*
Porażenie maksymalne	6.10	3.62	- 0.76	- 0.85	67	0.81	< 0,0001
AUDPC	814.70	855516.10	1.10	- 0.51	67	0.69	< 0,0001

df – liczba stopni swobody
W – test normalności *Shapiro-Wilk*
p – wartość p (ang. *p-value*) – poziom istotności wyznaczony dla wartości statystyki testowej

4.3. Identyfikacja markerów sprzężonych z reakcją odporności i analiza QTL

Populacje 'Lamberto'×'Grenado' oraz 'Grenado'×'Lamberto' liczyły odpowiednio 186 i 453 roślin. Do analiz genetycznych systemami markerowymi wybrano po 91 roślin z obu populacji, zachowując proporcjonalnie udział roślin odpornych i wrażliwych.

W wyniku nieparametrycznej analizy Kruskal-Wallis [KRUSKAL i WALLIS, 1952] zidentyfikowano markery związane z odpornością na mączniaka prawdziwego na podstawie testów inokulacyjnych przeprowadzonych dla połączonej populacji F_2 pszenżyta. Wytypowano 42 markery DArT z grup sprzężeń 1R oraz 6R oraz 1 marker SSR z grupy sprzężeń 1R (Tabela 4.6). Sprzężenie wybranych markerów z reakcją na infekcję *B.graminis* w stadium siewki było istotne przy $P < 0.005$. Analiza testem Kruskal-Wallis potwierdziła istotność QTLi wykrytych metodą CIM w obrębie chromosomu 6R oraz metodą IM w obrębie chromosomu 1R, a także wykazała 26 dodatkowych markerów, w tym jeden marker SSR (grupa sprzężeń 1R).

W wyniku analizy pojedynczych markerów (SMA) na połączonej populacji F_2 pszenżyta wytypowano dwa rejony QTL kształtujące reakcję roślin na infekcję *B.graminis* w stadium siewki (Tabela 4.7). Rejony te znajdowały się w grupach sprzężeń 1R (Ryc. 4.13) oraz 6R (Ryc. 4.14) i wyjaśniały odpowiednio 12% i 8% zmienności.

W celu ustalenia stabilności efektów QTL stwierdzonych dla chromosomów żytnich dla ocen uzyskanych w testach inokulacyjnych, analizę Kruskal-Wallis przeprowadzono dla grup sprzężeń z genomu R osobno dla populacji 'Lamberto'×'Grenado' (LG) oraz 'Grenado'×'Lamberto' (GL) (Ryc. 4.15). Dla populacji LG wyznaczono 7 markerów DArT sprzężonych z odpornością na *Blumeria graminis*, zlokalizowanych w grupie sprzężeń 6R. Istotny związek z odpornością dla większości z tych markerów potwierdzono analizą SMA (*Q.Pm.lgl.6R)* na połączonej populacji F_2 pszenżyta. W przypadku populacji GL dzięki analizie nieparametrycznej testem Kruskal-Wallisa zidentyfikowano 45 markerów DArT w grupie sprzężeń 1R, z czego 33 markery miały istotny związek z odpornością na *B. graminis* w połączonej populacji F_2. Dla populacji GL wyznaczono równocześnie 7 unikalnych markerów DArT związanych z odpornością na infekcję *B.graminis* w grupie sprzężeń 4R2. Markery te wykazywały sprzężenie z cechą tylko w populacji 'Grenado'×'Lamberto'.

W wyniku przeprowadzenia mapowania QTLi związanych z maksymalną oceną porażenia roślin oraz AUDPC w populacji F_3 'Lamberto'×'Grenado' uzyskano 8 loci cech ilościowych (8 metodą IM, 5 metodą CIM) (Tabela 4.8). Nazwy QTL odnoszą się do cechy, populacji oraz grupy sprzężeń. Loci uzyskane metodą IM wyjaśniają od 0.3% do 15%, natomiast metodą CIM od 0.4% do 33.4%. Metoda CIM jest bardziej selektywna, ponieważ łączy w sobie mapowanie interwałowe oraz analizę pojedynczych markerów. Dla obu wartości fenotypowych (maksymalnej oceny porażenia oraz AUDPC) wytypowane zostały cztery wspólne rejony – *Q.Pm.lgl.2A2, Q.Pm.lgl.3A, Q.Pm.lgl.1R* oraz *Q.Pm.lgl.6R*, z których ten ostatni wyjaśnia największy procent zmienności (33.4% metodą CIM dla maksymalnego porażenia rośliny). W grupie sprzężeń 3A na podstawie maksymalnej oceny porażenia oraz AUDPC zlokalizowano dwa nachodzące na siebie rejony związane z odpornością na *B. graminis*. Bardziej precyzyjna lokalizacja QTL została wyznaczona metodą IM dla maksymalnego porażenia. Przy użyciu programu ICIMapping stwierdzono, iż wyznaczone QTLe nie miały charakteru addytywnego.

Najbardziej istotne znaczenie mają QTLe wyznaczone dla obu wartości fenotypowych (maksymalne porażenie roślin i AUDPC). Główne QTLe odporności na porażenie *Blumeria graminis* to *Q.Pm.lgl.6R* oraz *Q.Pm.lgl.1R*, wykryte metodą CIM na chromosomie 6R (Tabela 4.8; Ryc. 4.17) oraz metodą IM na chromosomie 1R (Tabela 4.8; Ryc. 4.16). *Q.Pm.lgl.3A* wykazuje efekt na dobrym poziomie wyjaśniając 4.2% zmienności cechy. Jednak *Q.Pm.lgl.2A2* (AUDPC) wyjaśnia jedynie 0.4% zmienności i ma mniejsze znaczenie w odpowiedzi na infekcję wywołującą mączniaka prawdziwego. Wybrane QTLe zostały przedstawione na Ryc. 4.16 – 4.18.

Tabela. 4.6. Markery DArT oraz SSR związane z odpornością na *Blumeria graminis* w populacjach F_2 pszenżyta 'Grenado' i 'Lamberto', uzyskane na podstawie testów inokulacyjnych w wyniku analizy Kruskal-Wallis.

Lp.	***Chromosom***	***Marker***	***Pozycja (cM)***	***K[a]***	***Poziom istotności[b]***
1		*rPt-411063*	26.000	11.12	0.001
2		*rPt-507719*	46.000	12.51	0.0005
3		*rPt-402007*	46.000	11.66	0.001
4		*rPt-389887*	60.000	8.30	0.005
5		*rPt-401574*	65.000	9.75	0.005
6		*rPt-505853*	67.000	10.94	0.001
7		*rPt-399769*	67.000	10.05	0.005
8		*rPt-389363*	69.000	10.75	0.005
9		*rPt-389670*	83.000	8.28	0.005
10		*rPt-400883*	83.000	8.08	0.005
11		*rPt-402101*	83.000	8.08	0.005
12		*rPt-400535*	83.000	7.89	0.005
13		*rPt-505577*	84.000	12.55	0.0005
14		*rPt-399397*	85.000	11.44	0.001
15		*rPt-389501*	86.000	8.08	0.005
16		*rPt-507990*	93.000	9.84	0.005
17	**1R**	*scm127_1*	124.000	10.89	0.005
18		*rPt-506340*	132.000	10.49	0,005
19		*rPt-509540*	134.000	11.13	0.001
20		***tPt-514285[c]***	134.000	10.75	0.005
21		***rPt-389803[c]***	136.000	14.75	0.001
22		***rPt-401418[c]***	137.000	13.73	0.001
23		***rPt-398831[c]***	139.000	15.67	0.0005
24		***rPt-399803[c]***	140.000	9.50	0.005
25		***rPt-401195[c]***	140.000	9.86	0.005
26		***rPt-507452[c]***	140.000	10.49	0.005
27		***rPt-507103[c]***	141.000	11.41	0.001
28		***rPt-507848[c]***	141.000	11.18	0.001
29		***rPt-506299[c]***	141.000	11.18	0.001
30		***wPt-9317[c]***	141.000	9.03	0.005
31		***rPt-400290[c]***	141.000	10.07	0.005
32		***rPt-508726[c]***	144.000	12.77	0.0005
33		***rPt-506878[c]***	146.000	10.49	0.005

Tabela 4.6. Kontynuacja

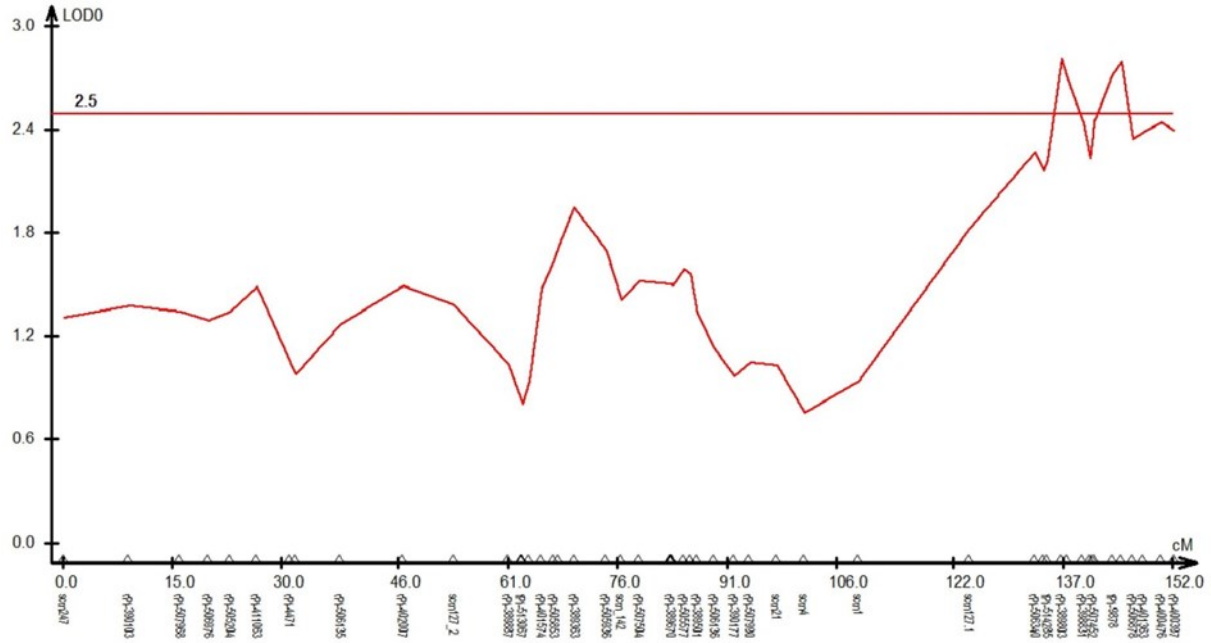
Lp.	*Chromosom*	*Marker*	*Pozycja (cM)*	*K*[a]	*Poziom istotności*
34	**6R**	*rPt-390495*	120.000	8.09	0.005
35		*wPt-7108*	124.000	12.01	0.001
36		*rPt-508374*	124.000	8.79	0.005
37		*rPt-401486*	125.000	8.79	0.005
38		*rPt-401241*	128.000	8.83	0.005
39		*rPt-401011*	128.000	10.45	0.005
40		*rPt-7385*	136.000	9.85	0.005
41		***rPt-398825***[c]	155.000	12.46	0.0005
42		***rPt-411235***[c]	168.000	7.91	0.005
43		*rPt-402480*	175.000	8.15	0.005

[a] – wartość testu Kruskal-Wallis.
[c] – pogrubioną czcionką zaznaczone markery potwierdzające QTL wykryte metodami CIM i/lub IM dla cech: AUDPC i/lub maksymalnego porażania roślin.

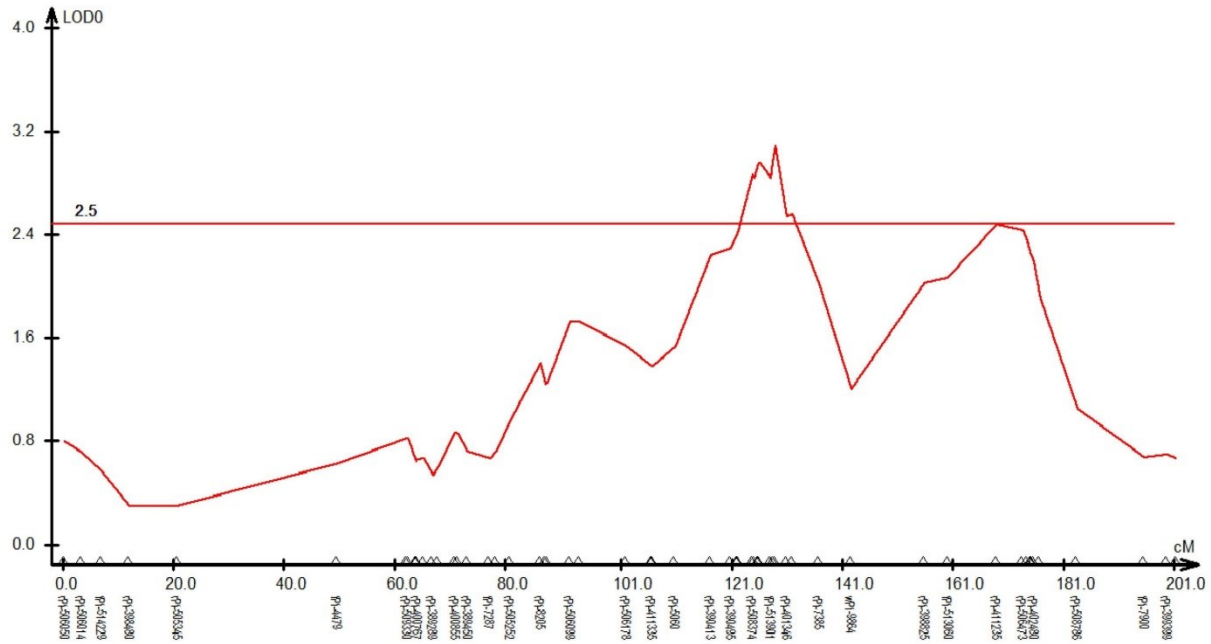
Tabela 4.7. QTLe związane z odpornością na *Blumeria graminis* w dwukierunkowej populacji F_2 pszenżyta 'Lamberto' i 'Grenado' uzyskane na drodze analizy pojedynczych markerów (SMA) na podstawie wyników testów inokulacyjnych.

QTL	*Grupa sprzężeń*	*Przedział markerów*	*Lokalizacja (cM)*	*LOD*	*R^{2a}*	*F^b*	*p(F)*[c]	*Źródło QTL*
Q.Pm.lgl.1R	**1R**	***rPt-389803 – rPt-508726***	136.6 – 144.8	2.81	12%	13.4	***	G
Q.Pm.lgl.6R	**6R**	***rPt-508374 – rPt-401346***	124.5 – 130.6	3.1	7.8%	14.8	***	G

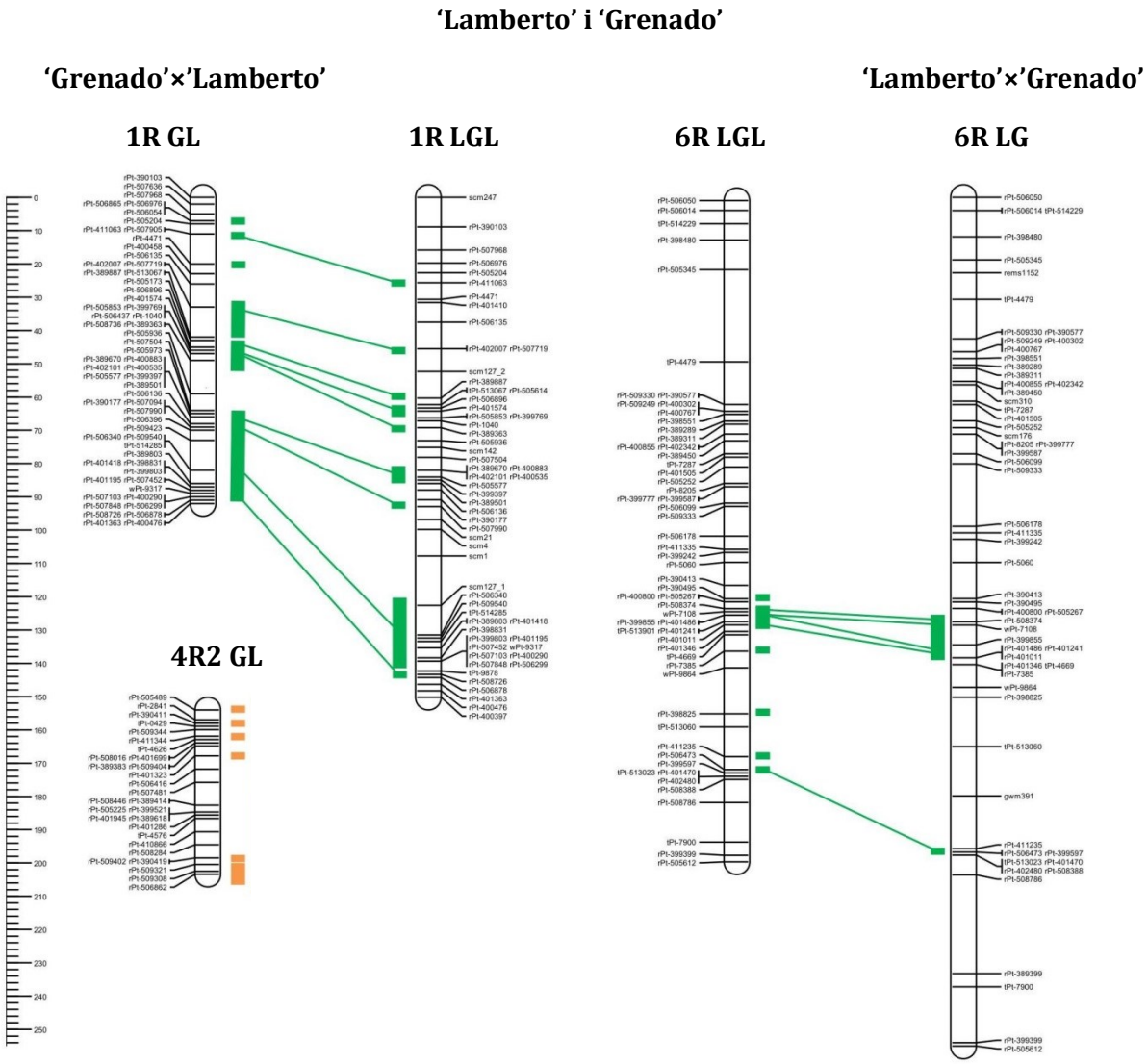
[a] – R^2 – współczynnik determinacji;
[b] – wartość testu F;
[c] – poziom istotności: *** - 0.0001.



Ryc. 4.13. Krzywa rozkładu LOD uzyskana metodą SMA na podstawie wyników testów inokulacyjnych dla grupy sprzężeń 1R pod względem odporności na porażenie *B. graminis* populacji F_2 'Lamberto' i 'Grenado'.



Ryc. 4.14. Krzywa rozkładu LOD uzyskana metodą SMA na podstawie wyników testów inokulacyjnych dla grupy sprzężeń 6R pod względem odporności na porażenie *B. graminis* populacji F_2 'Lamberto' i 'Grenado'.

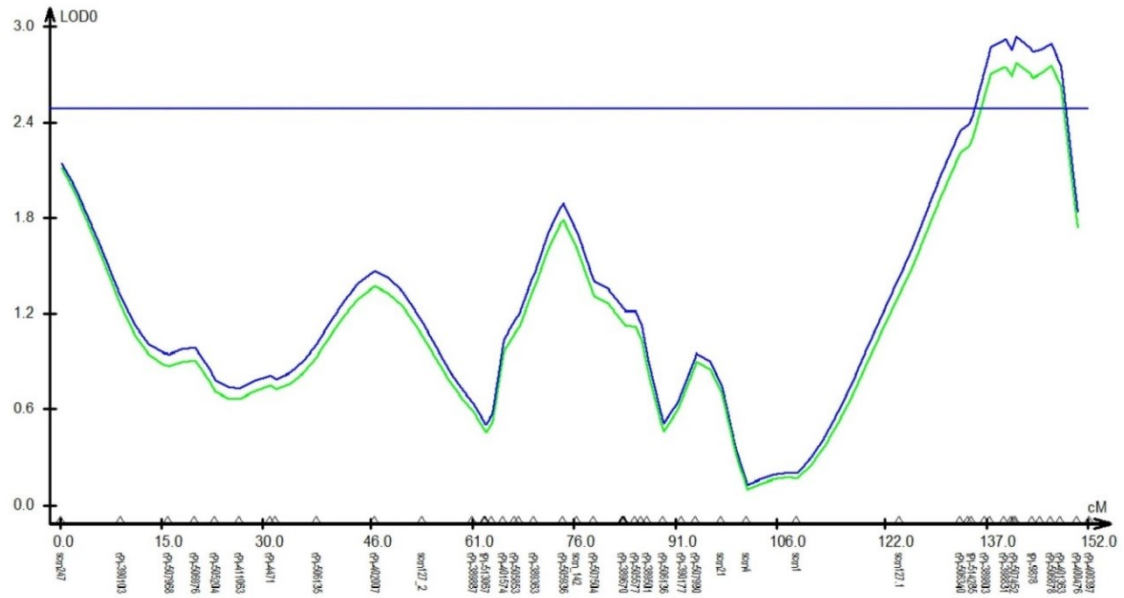


Ryc. 4.15. Markery związane z odpornością na *Blumeria graminis* w stadium siewki zidentyfikowane dla populacji połączonej F_2 'Lamberto' i 'Grenado' w porównaniu do osobnych populacji (GL i LG).

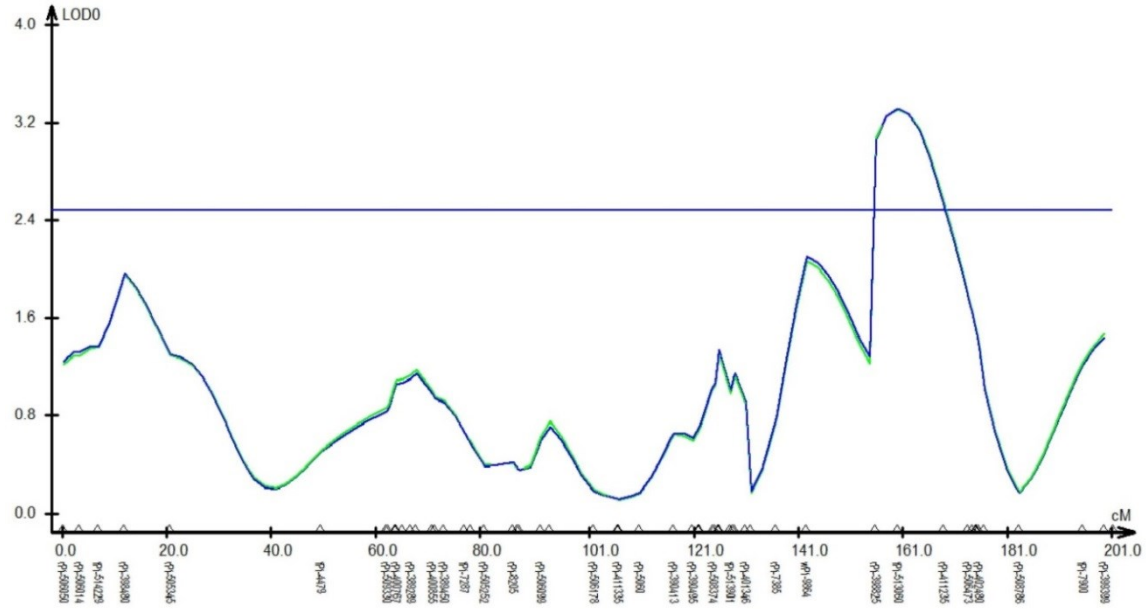
Tabela 4.8. Loci cech ilościowych związane z odpornością na *Blumeria graminis* w dwukierunkowej populacji F_3 pszenżyta 'Lamberto' i 'Grenado' uzyskane na podstawie wyników oceny polowej.

Cecha		*QTL*	*Przedział markerów*	*Pozycja (cM)*	*LOD*	*R^{2a}*	*Metoda statyst.*[b]	*Źródło odporności*
Porażenie maksymalne	**2A2**	***Q.Pm.lgl.2A2***	***wPt-9302 – wPt-0623***	0.0 – 3.3	5.91	1.2%	IM	L
	3A	***Q.Pm.lgl.3A***	***wPt-3978 – wPt-1339***	10.4 – 14.8	9.27	4.2%	IM	G
	1B	***Q.Pm.lgl.1B***	***wPt-6690 – wPt-3579***	108.7 – 111.3	3.56	4%	IM	L
	1R	***Q.Pm.lgl.1R***	***tPt-514285 – rPt-401363***	134.7 – 147.8	2.95	15%	IM	G
	6R	***Q.Pm.lgl.6R***	***rPt-398825 – rPt-411235***	155.6 – 168.6	3.33	33.4%	CIM	G
AUDPC	**2A2**	***Q.Pm.lgl.2A2***	***wPt-9302 – wPt-0623***	0.0 – 3.3	8.12 9.88	0.4% 0.4%	CIM IM	L
	3A	***Q.Pm.lgl.3A***	***wPt-9160 – wPt-1339***	0.0 – 14.8	8.1 4.2	4.2% 3.5%	IM CIM	G
	5A	***Q.Pm.lgl.5A***	***wPt-5096 – tPt-6495***	0.0 – 20.2	11.71	0.3%	IM	G
	2B1	***Q.Pm.lgl.2B1***	***wPt-1964 – rPt-509730***	43.3 – 46.5	7.26 11.17	2.7% 0.4%	CIM IM	G
	4B	***Q.Pm.lgl.4B***	***wPt-9393 – tPt-5519***	47.7 – 48.7	8.45	0.3%	CIM	G
	1R	***Q.Pm.lgl.1R***	***tPt-514285 – rPt-401363***	134.7 – 147.8	2.83	15%	IM	G
	6R	***Q.Pm.lgl.6R***	***rPt-398825 – rPt-411235***	155.6 – 168.6	3.30	32.7%	CIM	G

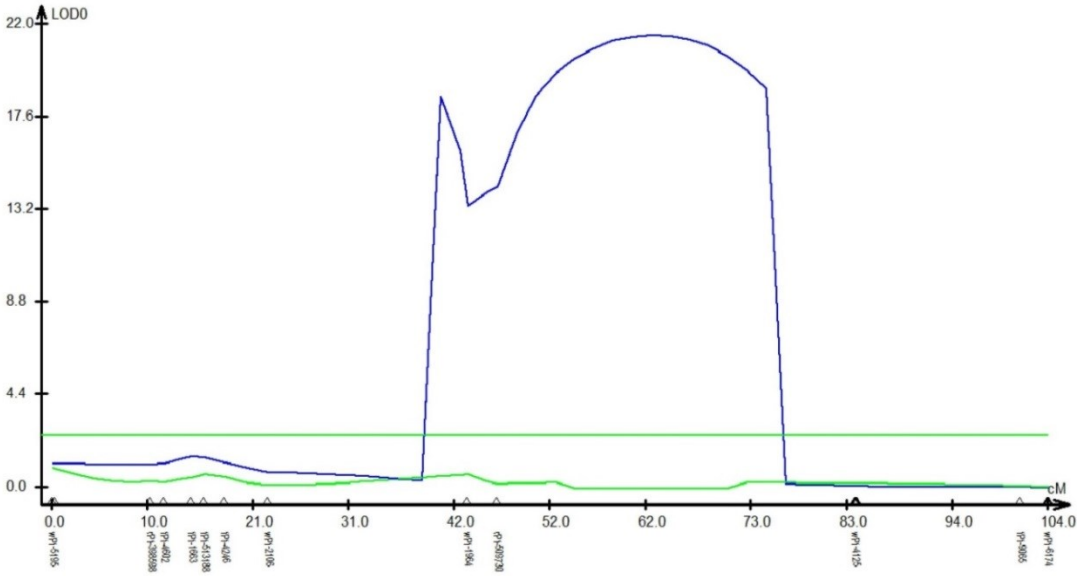
[a] - R^2 – współczynnik determinacji
[b] - stosowane metody statystyczne: IM – mapowanie interwałowe, CIM – złożone mapowanie interwałowe.



Ryc. 4.16. Krzywa rozkładu LOD uzyskana metodą mapowania interwałowego dla grupy sprzężeń 1R pod względem odporności na porażenie *B. graminis* populacji F_2 'Lamberto' i 'Grenado'; na niebiesko – maksymalne porażenie roślin, na zielono – AUDPC.



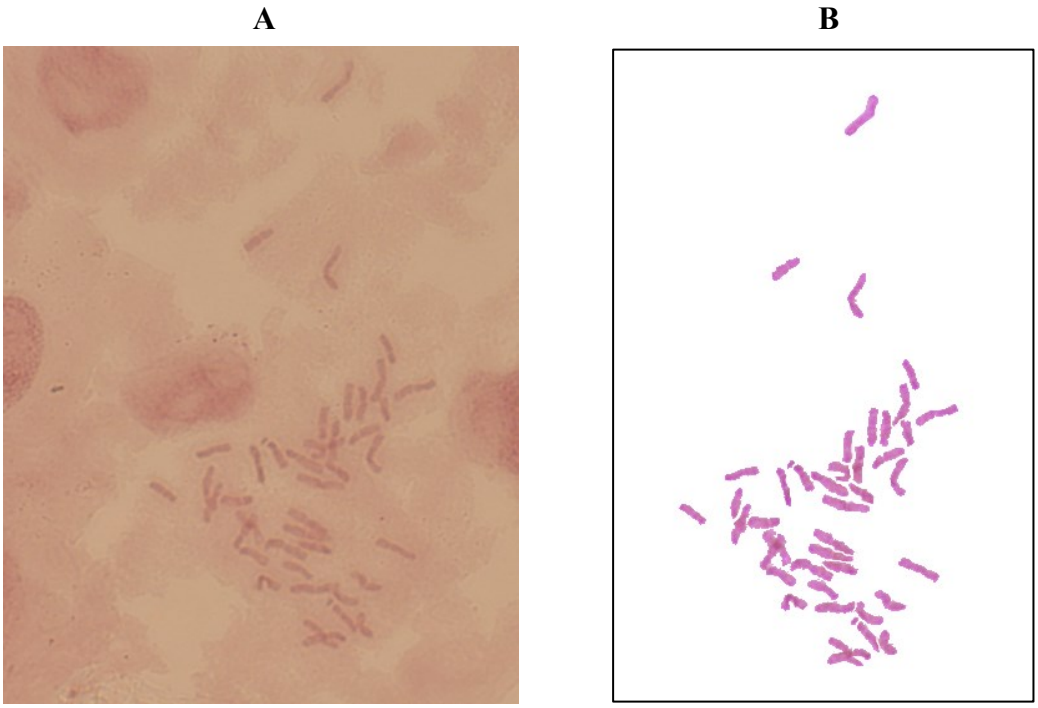
Ryc. 4.17. Krzywa rozkładu LOD uzyskana metodą złożonego mapowania interwałowego dla grupy sprzężeń 6R pod względem odporności na porażenie *B. graminis* populacji F_2 'Lamberto' i 'Grenado'; na niebiesko – maksymalne porażenie roślin, na zielono – AUDPC.



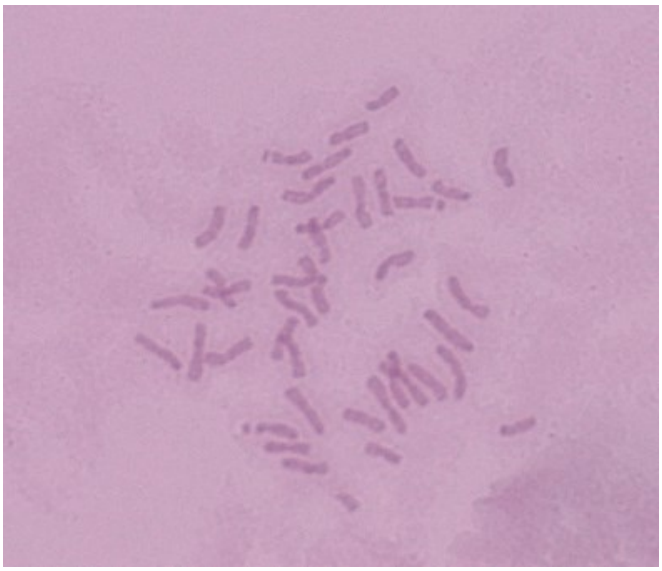
Ryc. 4.18. Krzywa rozkładu LOD uzyskana metodą mapowania interwałowego dla grupy sprzężeń 2B1 pod względem odporności na porażenie *B. graminis* populacji F_2 'Lamberto' i 'Grenado'; na niebiesko – maksymalne porażenie roślin, na zielono – AUDPC.

4.4. Cytologia

Analizy cytologiczne przeprowadzono w celu potwierdzenia liczby chromosomów u odmian 'Lamberto' i 'Grenado'. W wyniku badań przeprowadzonych na 5 wybranych losowo ziarniakach uzyskano wyraźne obrazy płytek metafazowych. W przypadku obu odmian rodzicielskich populacji 'Lamberto'×'Grenado' stwierdzono obecność 42 zróżnicowanych pod względem długości i wielkości chromosomów (Ryc. 4.19 i Ryc. 4.20).



Ryc. 4.19. Płytka metafazowa w komórce z merystemu wierzchołkowego korzenia odmiany ojcowskiej 'Lamberto': A – zdjęcie oryginalne; B – zdjęcie po obróbce obrazu.



Ryc. 4.20. Płytka metafazowa w komórce z merystemu wierzchołkowego korzenia odmiany matecznej ‘Grenado’ .

5. DYSKUSJA

Cele niniejszej pracy zostały zrealizowane poprzez konstrukcję mapy genetycznej pszenżyta dwukierunkowej populacji F_2 'Lamberto' i 'Grenado' oraz zlokalizowanie rejonów genomu i markerów molekularnych warunkujących występowanie reakcji odporności na infekcję *Blumeria graminis*. Podejmowana tematyka stanowi wyzwanie naukowe, ponieważ do tej pory prace prowadzone nad mapą genetyczną pszenżyta były nielicznie i po raz pierwszy populację mapującą stanowiła populacja dwukierunkowa.

MAPA GENETYCZNA

Analiza DArT populacji 'Lamberto' i 'Grenado' skutkowała w uzyskaniu 643 markerów. 493 markery DArT miało znaną lokalizację na chromosomach, 53 markery (8.2%) nie miało określonej lokalizacji chromosomowej, natomiast 97 markerów miało przypisanych równocześnie kilka pozycji na chromosomach. Spośród markerów o znanej lokalizacji, największy udział w mapie miały markery z genomu B pszenicy oraz genomu R żyta, odpowiednio 191 (38.7%) oraz 189 (38.3%). Mniej markerów pochodziło z genomu A – 107 (21.7%) i D (łącznie 6 markerów DArT). W wyniku przeprowadzonego mapowania ustalono pozycję chromosomową dla 39 markerów DArT. Uzyskany stosunek markerów odzwierciedla jednocześnie polimorficzną naturę genomów A, B oraz R [ALHEIT i wsp. 2011]. Wśród 643 markerów uzyskanych na drodze analizy DArT 336 markerów pochodziło od pszenicy (*wPt*), 240 z żyta (*rPt*), a 67 z pszenżyta (*tPt*). Podobny rozkład markerów DArT pomiędzy genomami pszenicy i żyta jest utrwalony na platformie DArT opracowanej dla pszenżyta, w której markery pochodzące z genomów żyta, pszenicy są liczniej reprezentowane niż markery pszenżytnie [BADEA i wsp. 2011]. Występowanie nowych markerów DArT charakterystycznych dla pszenżyta (serii *tPt)* stanowi o jego odrębności taksonomicznej i jest efektem utrwalania szeregu zmian mutacyjnych począwszy od pierwotnych form pszenżyta.

Uzyskana dwukierunkowa mapa pszenżyta dla populacji otrzymanej ze skrzyżowania odmian 'Lamberto' i 'Grenado' składa się z 26 grup sprzężeń, zaliczonych do genomów pszenicznych (genom A – 10 grup sprzężeń, genom B – 11 grup sprzężeń) lub genomu żytniego – 5 grup sprzężeń. Nie uzyskano grup sprzężeń odpowiadających chromosomom 2R, 3R oraz 7R. Dla chromosomu 2R nie zidentyfikowano żadnego markera DArT, dla 3R – 8 markerów, w tym 7 z nich miało alternatywne lokalizacje, natomiast dla chromosomu 7R uzyskano jeden marker. Jest to bezpośrednią przyczyną braku odpowiednich grup sprzężeń na mapie genetycznej badanych populacji. Brak grup sprzężeń dla chromosomów 2A oraz 1R opisał także Alheit i wsp. (2011). Wg tego autora brak grup sprzężeń może być także konsekwencją zaburzeń segregacji, które wpływają na wielkość dystansów w mapie genetycznej i kolejność loci, ale także może spowodować nieobecność całych chromosomów na mapie genetycznej. W przypadku mapy dla populacji 'Lamberto' i 'Grenado' zaburzenia w segregacji nie mogą stanowić przyczyny braku grupy sprzężeń, gdyż w procedurze mapowania nie eliminowano markerów o silnych odchyleniach od oczekiwanego stosunku rozszczepień. Spo-

śród wyjściowej liczby 643 markerów na mapę naniesiono 547 markerów, co stanowi 85%. Można, zatem wnioskować z podobnym prawdopodobieństwem, że żadna grupa sprzężeń obecna w dwukierunkowej populacji 'Lamberto' i 'Grenado' nie została wyeliminowana w procedurze mapowania.

Uzyskane grupy sprzężeń populacji 'Lamberto' i 'Grenado' w większości odpowiadają fragmentom chromosomów, natomiast całe chromosomy uzyskano dla 6B, 1R oraz 4R. W niniejszej pracy przyjęto, iż odległość między zmapowanymi markerami w grupach sprzężeń nie może przekraczać 30cM, uzyskując w ten sposób po dwie grupy sprzężeń w obrębie 2A, 6A, 7A, 2B, 3B, 7B oraz 5R. Wykorzystane w pracy odmiany pszenżyta ozimego są formami heksaploidalnymi, posiadającymi 21 chromosomów reprezentujących trzy genomy. W celu uzyskania docelowej liczby chromosomów przeprowadzono próbę połączenia grup sprzężeń stanowiących fragmenty tych samych chromosomów. Grupy sprzężeń 6A1 i 6A2, 2B1 i 2B2, 7B1 i 7B2 oraz 5R1 i 5R2 połączono uzyskując odpowiednio chromosomomy 6A, 2B, 7B oraz 5R. Maksymalne odległości pomiędzy markerami w tych grupach sprzężeń wyniosły odpowiednio 70 cM, 42 cM, 57 cM i 43 cM. Dzięki połączeniu ośmiu fragmentów w 4 chromosomy zredukowano całkowitą liczbę grup sprzężeń z 26 do 22. Wysoka liczba grup sprzężeń zidentyfikowanych początkowo w populacji LGL, brak pewnych rejonów chromosomów wynikający z porównań strukturalnych, oraz duże odległości pomiędzy wybranymi grupami sprzężeń świadczą o dużych wahaniach w częstościach rekombinacji i supresji rekombinacji w niektórych rejonach chromosomów.

Grupy sprzężeń 2A1 i 2A2 nie uległy połączeniu, nawet przy bardzo niskiej wartości LOD (1.0), dlatego też uznano, iż grupy te nie są sprzężone i jedna z nich rekompensuje brak chromosomu 2R u badanych odmian pszenżyta. Podobnie nie udało się połączyć grup 7A z 7A/1A i uznano, że jedna z nich (grupa 7A/1A) stanowi fragment chromosomu rekompensującego brak chromosomu 7R u badanych odmian pszenżyta.

W obrębie genomów pszenicy i żyta zidentyfikowano liczne translokacje lub/i substytucje, zarówno u pszenicy jak i pszenżyta. Chromosomy z genomu B najczęściej biorą udział w powstawaniu aberracji chromosomowych u pszenicy [BADAEVA i wsp. 2007]. Substytucje w największym stopniu dotyczą chromosomów 1B, 3B, 5B oraz 7B – 3A/3B, 4A/1B, 1B/1R, 3B/5B, 3B/7B, 5B/7B [SCHLEGEL i SCHLEGEL, 1989]. U pszenicy zwyczajnej, do najczęściej spotykanej translokacji należy T1BL.1RS [DRZEWIECKI i wsp. 2008; KONAREV 2001], w której ramiona telocentryczne chromosomów pszenicznego i żytniego łączą się ze sobą. W niniejszej pracy, grupy sprzężeń 3B2 oraz 5B2 uległy połączeniu w grupę 5BS.3BL przy wysokim LOD=4.0, a odległość pomiędzy obiema grupami wyniosła ok. 39 cM. Uzyskany chromosom fuzyjny ma charakter translokacji T5BS.3BL i i nie był dotychczas opisany w literaturze. Biorąc pod uwagę, iż brakuje chromosomu 3R, grupa sprzężeń 5BS.3BL może rekompensować funkcjonalnie brak tego chromosomu. Połączenie grup 5BS i 3BL w chromosom T5BS.3BL jest uzasadnione statystycznie i pozwala uzyskać docelową liczbę 21 chromosomów cechujących zbalansowane genomy pszenżyta heksaploidalnego.

Dodatkowe analizy cytologiczne mogłyby stanowić dodatkowy, cenny dowód i potwierdzenie obliczeń. Skład genomu pszenżyta populacji ‘Lamberto’ i ‘Grenado’ zaproponowano w Tabeli 5.1.

Tabela 5.1. Propozycja składu poszczególnych genomów populacji ‘Lamberto’ i ‘Grenado’; po 7 grup reprezentujących genom A, B oraz R.

Grupa	GENOM A	GENOM B	GENOM R
1	1A	1B	1R
2	2A1	2B (2B1, 2B2)	2A2
3	3A	3B1	5BS.3BL
4	4A	4B	4R
5	5A	5B1	5R (5R1, 5R2)
6	6A (6A1, 6A2)	6B	6R
7	7A	7B (7B1, 7B2)	7A.1A

W celu identyfikacji różnic w mapie genetycznej wynikających z kierunku krzyżowania, porównano mapę pszenżyta dla połączonej populacji dwukierunkowej ‘Lamberto’ i ‘Grenado’ z oddzielnymi mapami uzyskanymi dla populacji ‘Lamberto’×’Grenado’ oraz ‘Grenado’×’Lamberto’. Przeprowadzenie takiej analizy u pszenżyta możliwe było pierwszy raz ze względu na dostępność populacji mapujących. Uzyskane wyniki dla większości grup sprzężeń są zbieżne i markery wykazywały kolinearność względem siebie na wszystkich trzech mapach. W kilku przypadkach stworzenie wspólnej matrycy do konstrukcji mapy genetycznej LGL umożliwiło przydzielenie większej ilości markerów do poszczególnych grup sprzężeń (np. 3A). Analiza łączna populacji LG oraz GL pozwoliła na uzyskanie jednej grupy sprzężeń 4B o zwiększonej liczbie markerów (12), zamiast kilku fragmentów chromosomu 4B. W przypadku chromosomu 1R łączna analiza na populacji LGL wiązała się z redukcją liczby zmapowanych markerów DArT (51 markerów), w stosunku do liczby markerów zlokalizowanych na populacjach LG (54 markery) i GL (63 markery). Na podstawie analiz przeprowadzonych na populacjach LG, GL i LGL potwierdzono odrębność dwóch fragmentów reprezentujących chromosom 2A. Ułożenie markerów związanych z QTL w grupach sprzężeń 4B oraz 1B jest zbieżne dla map LG oraz LGL, w przypadku grupy 2A2 lokalizacja jest zbieżna dla map GL oraz LGL, natomiast markery związane z *Q.Pm.lgl.2B1* występują jedynie w populacji połączonej, co oznacza, że efekt związany z *Q.Pm.lgl.2B1* jest artefaktem wynikającym ze struktury populacji.

Analiza statystyczna wykazała zaburzenia przewidywanej segregacji markerów DArT oraz SSR. Ze względu na fakt, iż markery DArT są znacznikami wykazującymi efekt dominujący, natomiast markery SSR są zwykle kodominujące, planowano uzyskać stosunki rozszczepień odpowiednio 3:1 oraz 1:2:1. W populacji połączonej, dwukierunkowej markery z

istotnymi odchyleniami od przewidywanych mendlowskich segregacji stanowiły 33% wszystkich zmapowanych markerów. Dla populacji 'Grenado'×'Lamberto' wartość ta wynosiła 23%, z czego 65% pochodziło od formy matecznej 'Grenado'. W populacji 'Lamberto'×'Grenado' 27.1% markerów wykazywała zaburzenia segregacji, z czego 75% pochodziło od formy matecznej 'Lamberto'. Na podstawie tych obserwacji można stwierdzić, że w oddziaływaniach jądrowo-cytoplazmatycznych, przekładających się na zaburzenia segregacji chromosomów u pszenżyta, preferowane są chromosomy dziedziczone po matce.

Zaburzenia segregacji chromosomów są zjawiskiem powszechnym w świecie roślin i prowadzą do zniekształceń częstotliwości występowania alleli w stosunku do oczekiwanych rozszczepień mendlowskich. Po raz pierwszy zjawisko to zostało opisane u kukurydzy przez Mangelsdorf i Jones (1926), a następnie u wielu innych gatunków uprawnych w tym jęczmienia [GOLOENKO i wsp. 2002], kukurydzy [LU i wsp. 2002], ryżu [XU i wsp. 1997], sorgo [PEREIRA i wsp. 1994], pomidora [PATERSON i wsp. 1988] czy pszenicy [KUMAR i wsp. 2007; LOEGERING i SEARS, 1963]. U roślin zaburzenia segregacji są często obserwowane w potomstwie mieszańców między- lub wewnątrzgatunkowych, jako rezultat współzawodnictwa gamet, zamierania gamet lub zygoty [FARIS i wsp. 1998].

Konkurencja wśród gamet wynika z faktu, że po mejozie u haploidalnych mikrospor i ziaren pyłku ekspresji ulegają pojedyncze warianty genów. Genetyczne różnice pomiędzy ziarnami pyłku mogą prowadzić do konkurencji gametofitu, selekcji i nierównomiernego zapłodnienia, faworyzującego dany typ pyłku. Dodatkowo geny występujące u mieszańców, odpowiedzialne za sterylność mogą powodować zamieranie specyficznych gamet lub zygot, co również wpływa na zwiększone zaburzenia segregacji alleli [FARIS i wsp. 1998].

Na występowanie zaburzeń segregacji wpływają także rodzaj populacji mapującej, niehomologiczne rekombinacje oraz obecność elementów transpozycyjnych [YAMAGISHI i wsp. 2010]. Występowanie regionów o zaburzonej segregacji jest uznawane za potencjalną siłę zwiększającą zmienność wewnątrzgatunkową oraz napędzającą ewolucję [CHARLESWORTH 1988; TAYLOR i INGVARSSON, 2003]. Za region o zaburzonej segregacji uznaje się grupę co najmniej trzech markerów o istotnie zaburzonej segregacji z tendencją do tworzenia klastrów, umożliwiających lokalizowanie tych miejsc w genomie [LIU i wsp. 2011]. U pszenżyta zlokalizowano regiony o zaburzonej segregacji na chromosomach 2B, 3B, 1R, 2R, 4R 7R [ALHEIT i wsp. 2011]. W niniejszej pracy regiony o zaburzonej segregacji występowały w każdym chromosomie genomu B, co w zakresie chromosomów 2B oraz 3B stanowi potwierdzenie wcześniejszych obserwacji. Ponadto, występowanie rejonów o zaburzeniach segregacji na chromosomach 2A, 7A, 7B jest przypuszczalnie związane z brakiem chromosomów 2R i 7R w badanej populacji 'Lamberto' i 'Grenado'. O wysokiej aktywności mechanizmów dostosowawczych u pszenżyta świadczy również występowanie zaburzeń w segregacji chromosomów 4R, 5R i 6R.

ANALIZA FENOTYPOWA

W wyniku inokulacji roślin F_2 populacji 'Lamberto'×'Grenado' oraz 'Grenado'×'Lamberto' mieszaniną izolatów *Blumeria graminis* uzyskano oceny jakościowe. Na podstawie testów inokulacyjnych stwierdzono, że w populacji 'Lamberto'×'Grenado' stosunek liczby roślin odpornych do roślin wrażliwych był zgodny z rozszczepieniem 1:3, co świadczy o recesywnym typie dziedziczenia odporności na *B. graminis* w tej populacji w cytoplazmie 'Lamberto'. Z kolei w populacji 'Grenado'×'Lamberto' rozkład genotypów wrażliwych do odpornych był zgodny ze stosunkiem 15:1, co świadczy o warunkowaniu odporności na *B. graminis* przez współdziałanie dwóch genów recesywnych. U pszenicy większość zidentyfikowanych do tej pory genów odporności na *Blumeria graminis* to geny dominujące lub kodominujące, istnieje jednak kilka genów recesywnych warunkujących tą cechę. Są to *pmLK906* z chromosomu 2AL [NIU i wsp. 2010], *pm2026* (5AL) [XU i wsp. 2008], *mljy* (7B), *mlsy* (7B) [HUANG i wsp. 2002], *mlxbd* (7B) [HUANG i wsp. 2003] i *mlRd30* [SINGRÜN i wsp. 2004]. Recesywne, żytnie geny odporności na *B. graminis* nie były dotychczas zidentyfikowane w populacji pszenżyta.

Według Renner i Kupper (1921) cytoplazma mateczna stanowi podłoże dla genów ojcowskich i może modyfikować ich ekspresję, prowadząc do powstania odmiennego fenotypu. Może to stanowić podstawę wytłumaczenia istnienia odmiennych rozszczepień roślin odpornych i wrażliwych na infekcję *Blumeria graminis* w populacjach LG i GL. Hipoteza ta jest zgodna z wynikami uzyskanymi przez Song i wsp. (1995), którzy u syntetycznych poliploidów *Brassica* opisali ukierunkowane zmiany genomu jądrowego dotyczące formy ojcowskiej, w przeciwieństwie do formy niosącej genom cytoplazmatyczny mateczny. Różna ilość genów warunkujących odporność roślin pszenżyta w zależności od cytoplazmy oznacza, że cytoplazma może mieć istotny wpływ na ekspresję genów odporności na *B. graminis* w krzyżowaniach międzyodmianowych pszenżyta. Przeprowadzone badania stanowią pionierski przykład modyfikującego wpływu cytoplazmy na odporność na mączniaka prawdziwego u pszenżyta.

LOCI CECH ILOŚCIOWYCH

Jednym z głównych celów niniejszego opracowania była identyfikacja QTLi związanych z odpornością na *Blumeria graminis* w populacji pszenżyta LGL. Klasyczne mapowanie QTL najczęściej jest oparte na populacji segregującej powstałej w wyniku pojedynczego krzyżowania odmian, wykazujących skrajne wartości badanej cechy (np. linie DH lub RIL). W celu szybkiej identyfikacji związku stosowanych markerów DNA (np. RFLP, RAPD) z badaną cechą wykorzystywana jest analizą skrajnych segregantów, BSA. Metoda ta pozwala na szybką identyfikację molekularnych markerów sprzężonych z badanym loci [MICHELMORE i wsp. 1991], poprzez łączenie prób DNA o skrajnych fenotypach w dwa zestawy. Wykorzystanie tzw. prób zbiorczych ma na celu uśrednienie zmienności spowodowanej ekspresją tła genetycznego i wyodrębnienie różnic genetycznych w rejonie badanego genu. Według założeń Michelmore i wsp. (1991) identyfikowane różnice uzyskane dla prób zbiorczych

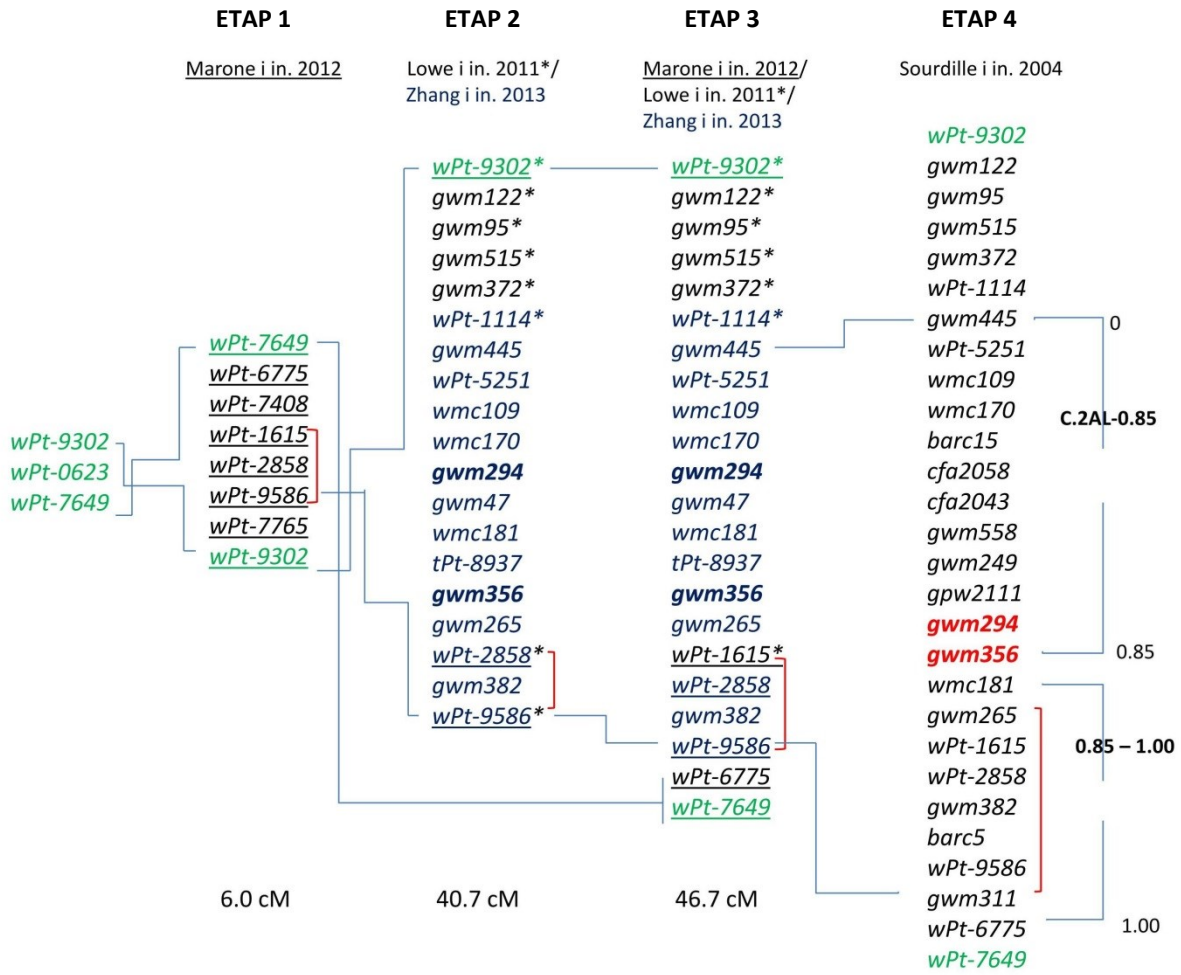
powinny być związane z badaną cechą. Na podstawie wyników segregacji markerów polimorficznych pomiędzy próbami zbiorczymi tworzona jest mapa sprzężeń w rejonie docelowego genu. Integracja oceny fenotypowej populacji mapującej oraz uzyskanych danych o mapie genetycznej skutkuje w uzyskaniu istotnych loci cech ilościowych, wyznaczanych metodami CIM oraz IM. W niniejszej pracy wykorzystanie strategii BSA do identyfikacji QTL nie było możliwe ze względu na dziedziczenie dwugenowe odporności na *Blumeria graminis* w populacji GL.

W stadium rośliny dojrzałej, na podstawie wyników oceny fenotypowej maksymalnego porażenia rośliny oraz powierzchni pod krzywą rozwoju choroby – AUDPC, wykryto dwa QTLe o wysokim procencie wyjaśnianej zmienności cechy: *Q.Pm.lgl.6R* oraz *Q.Pm.lgl.1R* o wartościach R^2 odpowiednio 33.4% oraz 15%. QTL *Q.Pm.lgl.6R*, pochodzący od odmiany 'Grenado' z rejonu genomu żytniego, jest efektem głównym, w największym stopniu wyjaśniającym zmienność cechy w badanej populacji pszenżyta. Istotnym QTLem jest także *Q.Pm.lgl.1R* (pochodzący głównie od formy 'Grenado'), gdyż wyjaśnia powyżej 10% zmienności cechy. Pozostałych siedem QTLi (*Q.Pm.lgl.2A2*, *Q.Pm.lgl.3Aa*, *Q.Pm.lgl.3Ab*, *Q.Pm.lgl.5A*, *Q.Pm.lgl.1B, Q.Pm.lgl.2B1*, *Q.Pm.lgl.4B*) wyjaśnia od 0.3 do 4.2% zmienności cechy i dlatego też są nazwane efektami mniejszymi.

Wyznaczone na drodze analizy statystycznej rejony loci cech ilościowych poddano analizie wzbogacającej o dodatkowe, już zmapowane markery umieszczone w dostępnych bazach danych. Na podstawie dostępnych map genetycznych i mapy fizycznej pszenicy [UPHAUS i wsp. 2007], rejon QTL *Q.Pm.lgl.2A2* obejmujący 3 cM na mapie LGL pszenżyta wzbogacono o 26 markerów DArT i SSR obejmujących u pszenicy fragment wielkości 46.7 cM (Ryc. 5.1). Na mapie Marone i wsp. (2012) fragment chromosomu 2A flankowany markerami *wPt-9302* i *wPt-7649* jest odwrócony o 180° w stosunku do homologicznych odcinków na mapach Lowe i wsp. (2011) oraz Zhang i wsp. (2013). Przyczyną takiej sytuacji mogą być inwersje fragmentów chromosomu, które wcześniej zarejestrowane zostały dla chromosomów 4A i 2B pszenicy [LUKASZEWSKI i wsp. 2012] oraz 1R [LUKASZEWSKI 2008]. Inwersja prowadzi do odwrócenia fragmentów odpowiedzialnych za tworzenie chiazm w dystalnej części chromatydy [LUKASZEWSKI 2008], zmniejszając w tym rejonie częstość występowania crossing-over. Na podstawie przeprowadzonego porównania rejonów homologicznych chromosomu 2A można stwierdzić, że we fragmencie chromosomu *Q.Pm.lgl.2A2* pszenżyta rekombinacja uległa silnej supresji.

Locus *Q.Pm.lgl.2A2* zostało zlokalizowane na podstawie ocen maksymalnego natężenia objawów chorobowych oraz AUDPC, przy zastosowaniu dwóch metod statystycznych – mapowania interwałowego oraz złożonego mapowania interwałowego. Na podstawie porównań trzech map genetycznych i występowania w nich markerów *wPt-7408, wpt-2858*, *wpt-1615*, *wpt-9586* oraz *gwm382* [LOWE i wsp. 2011; MARONE i wsp. 2012; ZHANG i wsp. 2013] zidentyfikowano fragment homologiczny chromosomu 2A na mapie fizycznej [SOURDILLE i wsp. 2004]. Markery DArT zlokalizowane w rejonie *Q.Pm.lgl.2A2* (*wPt-9302*,

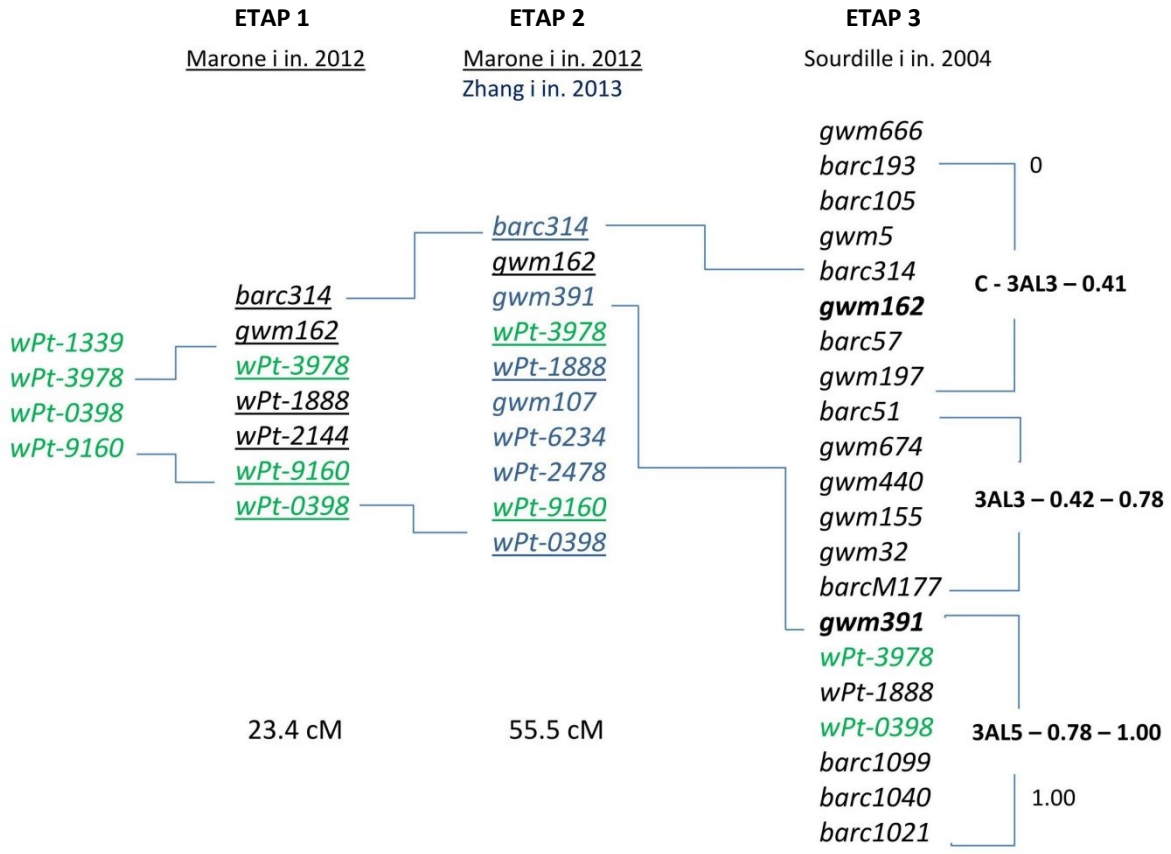
wPt-7649 oraz *wPt-0632*) także znajdują się w rejonie QTL (*QPm.vt-2A*) wskazanym przez Liu i wsp. (2001). QTL odporności na mączniaka prawdziwego zostało zlokalizowane na chromosomie 2A pomiędzy markerami *gwm304* oraz *gwm312*, położonymi wewnętrznie do markerów *gwm122* oraz *gwm382* zlokalizowanych na mapie fizycznej pszenicy [LIU i wsp. 2001; MINGEOT i wsp. 2002; SOURDILLE i wsp. 2004]. Dzięki temu możliwe było wskazanie fizycznej pozycji badanego rejonu na chromosomie 2A oraz zlokalizowanie tam dwóch markerów (*gwm294* oraz *gwm356*) sprzężonych z genami *Pm50* [MOHLER i wsp. 2013] oraz *Pm4* [MA i wsp. 2004].



Ryc. 5.1. Analiza uzupełniająca QTL – *Q.Pm.lgl.2A2*; rejon wzbogacony o 26 markerów DArT i SSR. Powyżej każdego fragmentu grupy 2A znajdują się informacje o mapie, na której zostały zlokalizowane markery. Dodatkowe oznaczenia: *kolor zielony* – markery z mapy pszenżyta LGL; *kolor granatowy* – mapa Zhang i wsp. (2013); * – mapa Lowe i wsp. 2009; *podkreślenie* – mapa Marone i wsp. (2012), *kolor czerwony* – markery sprzężone z genami *Pm* (objaśnienie w tekście). Poniżej poszczególnych fragmentów chromosomu 2A zaznaczono ich długości w cM.

Dla QTL opisanego w grupie 3A – *Q.Pm.lgl.3A*, z markerami flankującymi – *wPt-9160* oraz *wPt-1339*, efektem analizy uzupełniającej było wskazanie prawdopodobnej pozycji na mapie fizycznej pszenicy [SOURDILLE i wsp. 2004] (Ryc. 5.2). Analiza porównawcza

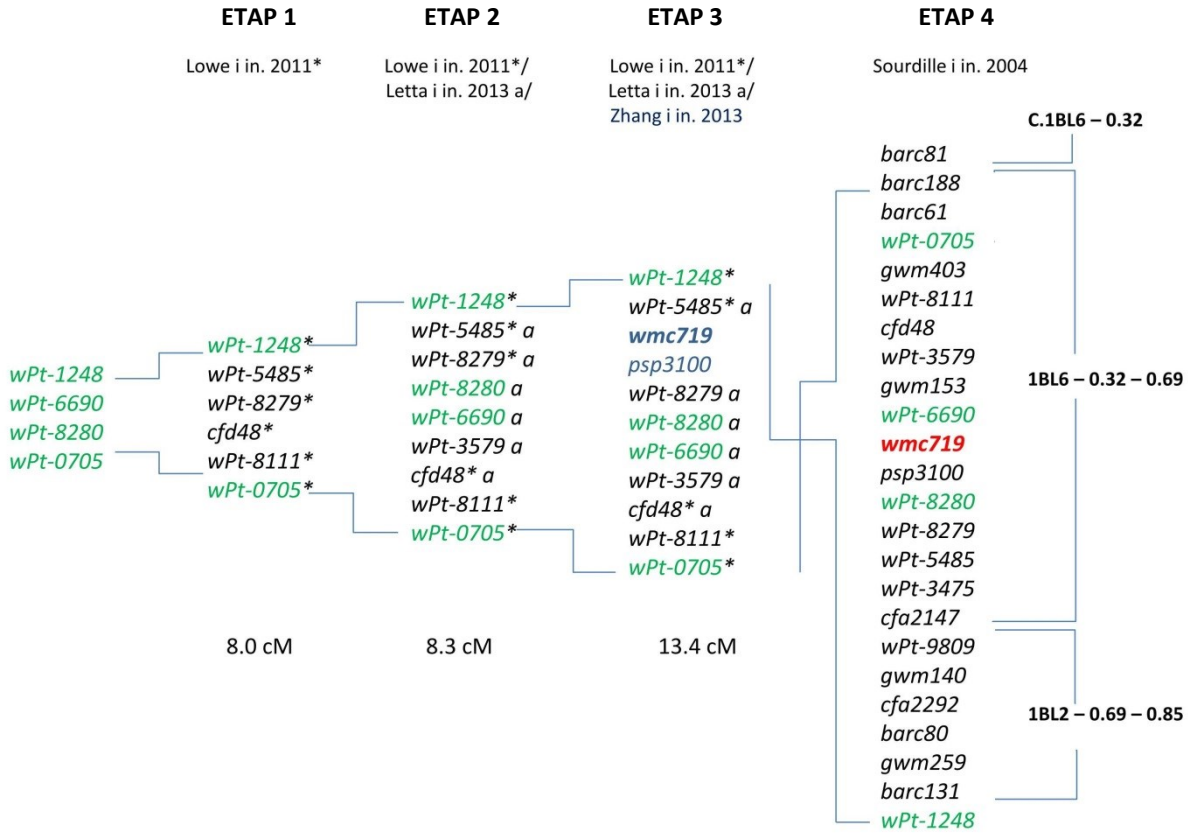
występowania markerów *wPt-3978* oraz *wPt-0398* skutkowała w uzyskaniu fragmentu złożonego z 10 markerów, w tym 4 markerów SSR [MARONE i wsp. 2012; ZHANG i wsp. 2013]. Pozycje markerów *barc314* oraz *wPt-0398* umożliwiły lokalizację drugiego markera z mapy fizycznej pszenicy – *gwm391*. Na podstawie przeprowadzonego porównania można stwierdzić, że *Q.Pm.lgl.3A* jest zlokalizowany fizycznie w dystalnym fragmencie chromosomu 3A. Na chromosomie 3A Chen i wsp. (2011) zlokalizowali gen *Pm44*, jednak brak jest szczegółowych danych dotyczących sprzężonych z nim markerów.



Ryc. 5.2. Analiza uzupełniająca QTL – *Q.Pm.lgl.3A*; rejony wzbogacone o 4 markery SSR i 3 DArT. Powyżej każdego fragmentu grupy 3A znajdują się informacje o mapie, na której zostały zlokalizowane markery. Dodatkowe znaczenia: *kolor zielony* – markery z mapy pszenżyta LGL; *kolor granatowy* – mapa Zhang i wsp. (2013); *podkreślenie* – mapa Marone i wsp. (2012), poniżej poszczególnych fragmentów chromosomu 3A zaznaczono ich długości w cM.

Markery tworzące QTL w grupie sprzężeń 1B – *Q.Pm.lgl.1B*, zlokalizowane w przedziale 108.7 – 111.3 cM (*wPt-6690 – wPt-0705*), poddano analizie uzupełniającej o markery z dostępnych map genetycznych [LETTA i wsp. 2013; LILLEMO i wsp. 2008; LOWE i wsp. 2011; TADESSE i wsp. 2010; ZHANG i wsp. 2013] i zidentyfikowano odpowiedni fragment na długim ramieniu chromosomu 1B [SOURDILLE i wsp. 2004] (Ryc. 5.3). Uzyskano bardzo dokładne dane dotyczące markerów zawartych pomiędzy markerami *wPt-6690* i *wPt-3575* flankującymi region *Q.Pm.lgl.1B*. Na podstawie kolinearność markerów pomiędzy mar-

kerami DArT *wPt-5485* a *wPt-3579* zlokalizowano marker SSR – *wmc719* [ZHANG i wsp. 2013], który jest sprzężony z genem odporności na mączniaka prawdziwego – *Pm39* [LILLEMO i wsp. 2008]. W rejonie tym u pszenicy zidentyfikowano również QTL – *QPm.vt-1B*. Sprzężony z *Q.Pm.lgl.1B* marker *wPt-8280* znajduje się pomiędzy markerami *gwm259* oraz *psp3100* tworzącymi *QPm.vt-1B* [LIU i wsp. 2001]. Lokalizacja markerów *gwm259*, *wmc719* oraz *wPt-0705* na różnych mapach genetycznych [XUE i wsp. 2008, ZHANG i wsp. 2013] pozwoliła na identyfikację na mapie fizycznej pszenicy [SOURDILLE i wsp. 2004] odpowiedniego rejonu *Q.Pm.lgl.1B*. Potwierdzeniem zidentyfikowania QTL w rejonie chromosomu 1B są również doniesienia Lillemo i wsp. (2008), którzy wykryli u odmiany pszenicy 'Saar' marker *wmc719* sprzężony z genem odporności *Pm39*.



Ryc. 5.3. Analiza uzupełniająca QTL – *Q.Pm.lgl.1B*; rejon wzbogacony o 19 markerów DArT i SSR. Powyżej każdego fragmentu grupy 1B znajdują się informacje o mapie, na której zostały zlokalizowane markery. Dodatkowe znaczenia: *kolor zielony* – markery z mapy pszenżyta LGL; *kolor granatowy* – mapa Zhang i wsp. (2013); a – mapa Letta i wsp. 2013; * – mapa Lowe i wsp. 2009; *podkreślenie* – mapa Marone i wsp. (2012), *kolor czerwony* – markery sprzężone z genami *Pm* (objaśnienie w tekście); poniżej poszczególnych fragmentów chromosomu 1B zaznaczono ich długości w cM.

QTL na chromosomie 2B został opisany przez Liu i wsp. (2001) oraz Bougot i wsp. 2006, natomiast nie ma bezpośredniego związku tego rejonu z QTL *Q.Pm.lgl.2B1* uzyskanym w niniejszej pracy. Zdaje się to potwierdzać wcześniejsze spostrzeżenia, że QTL na 2B w populacji LGL był zidentyfikowany dzięki strukturalności populacji. Wszystkie trzy QTLe z

chromosomów 1B, 2A i 2B zostały także potwierdzone przez badania Tucker i wsp. (2007), którzy uzupełnili te rejony o nowe markery. Reasumując, udało się potwierdzić kolinearność locus *Q.Pm.lgl.2A2* zlokalizowanego w grupie 2A2 z dużym rejonem na chromosomie 2AL, na którym zlokalizowane są geny dominujące odporności na *Blumeria graminis Pm4*, *Pm50* oraz recesywny gen – *pmLK906* [NIU i wsp. 2010]. Podobnie, *Q.Pm.lgl.1B* odpowiada lokalizacją dominującemu genowi *Pm39* z grupy sprzężeń 1B. W celu potwierdzenia obecności tych genów w genomie populacji pszenżyta 'Lamberto' i 'Grenado' należałoby przeprowadzić analizy wysycające potencjalne rejony dodatkowymi markerami, w tym SSR. Z uwagi na silną supresję rekombinacji wybranych rejonów genomu u pszenżyta, prace badawcze ukierunkowane na sekwencjonowanie pszenicznych genów odporności na *B. graminis* efektywnych u pszenżyta powinny być prowadzone raczej u pszenicy. Do tej pory jedynym genem odporności na *Blumeria graminis* o poznanej sekwencji jest gen *Pm3* [SRICHUMPA i wsp. 2005]. Wzbogacenie informacji o sekwencjach innych genów tego typu umożliwiłoby ich precyzyjną identyfikację, a co za tym idzie ułatwiłoby np. piramidyzację genów odporności u konkretnych odmian pszenżyta.

U pszenicy, cztery znaczące QTL odporności na *B.graminis* u pszenicy wykryte zostały na podstawie testów inokulacyjnych w stadium siewki. Zostały one zlokalizowane w obrębie genomu A na chromosomach 4A (*Xwmc232–Xrga3.1*), 5A (*Xgwm666–Xcfd30-Xbarc319*), 7A (*Xgwm635–Xbarc70*), 1A (*Xpsp2999–Xwmc24*) oraz na chromosomie 5B (*Xgwm205–Xgwm213*) [JAKOBSON i wsp. 2012]. W niniejszej pracy w stadium siewki dla połączonej populacji F_2 wykryto metodą SMA dwa QTLe w genomie R pszenżyta na chromosomach 1R (*Q.Pm.lgl.1R*) oraz 6R (*Q.Pm.lgl.6R*). QTLe te pochodzą od odmiany rodzicielskiej 'Grenado'. Rejon obejmujący *Q.Pm.lgl.1R* dla testów inokulacyjnych częściowo pokrywał się z wynikami uzyskanymi dla stadium rośliny dojrzałej, w przedziale 136.6 – 144.8 cM. Również *Q.Pm.lgl.6R* dla testów inokulacyjnych leży w niedalekiej odległości od QTL wyznaczonego dla rośliny dojrzałej. Procenty wyjaśnianej zmienności w stadium siewki dla *Q.Pm.lgl.6R* i *Q.Pm.lgl.1R* były niższe niż dla odporności w stadium rośliny dojrzałej. Dodatkowo dla rejonu odporności w stadium siewki na chromosomie 1R za pomocą testu Kruskal-Wallisa wyznaczono 42 markery DArT oraz jeden marker SSR (*scm127_1*) wykazujące związek z odpornością przy poziomie istotności poniżej 0.005. Na chromosomie 1R 14 markerów DArT było istotnie sprzężonych z odpornością na mączniaka prawdziwego również w stadium rośliny dojrzałej. Według doniesień literaturowych na chromosomach 1R, 4R oraz 6R zidentyfikowano do tej pory żytnie geny odporności, odpowiednio *Pm1*, *Pm6* oraz *Pm5* [SCHLEGEL i KORZUN, 2013]. Przy czym brak informacji o lokalizacji loci cech ilościowych na wyżej wymienionych chromosomach dla cechy odporności na *Blumeria graminis*. W niniejszej pracy zidentyfikowano po raz pierwszy markery DArT bezpośrednio sprzężone z reakcją na infekcję *Blumeria graminis* na chromosomach 1R, 4R oraz 6R (Tabela 5.2).

Tabela. 5.2. Markery sprzężone z odpornością populacji dwukierunkowej F_2 ‘Lamberto’ i ‘Grenado’ na infekcję *Blumeria graminis* w stadium siewki.

Chromosom	Marker DArT	Pozycja
1R	*rPt-389803*	136.636
	rPt-401418	137.429
	rPt-398831	139.577
6R	*rPt-398825*	155.581
	tPt-513060	159.833
	rPt-411235	168.637
4R	*rPt-505489*	0
	tPt-0429	5.337
	rPt-411344	7.615
	rPt-509404	11.187
	rPt-509402	44.879
	rPt-509308	49.389
	rPt-506862	49.524

Na podstawie testów inokulacyjnych w połączonej populacji LGL wykryto QTLe zgodne populacją F_2 ‘Grenado’×’Lamberto’ (*Q.Pm.lgl.1R*) lub populacją ‘Lamberto’×’Grenado’ (*Q.Pm.lgl.6R*). Dodatkowo w populacji F_2 ‘Grenado’×’Lamberto’ w stadium siewki wykryto unikalne markery DArT związane z odpornością na mączniaka prawdziwego w grupie sprzężeń 4R2. Aktywność locus na chromosomie 4R2 nie została potwierdzona w połączonej populacji F_2 LGL, ani w populacji F_2 ‘Lamberto’×’Grenado’. W populacji F_2 GL, w stadium siewki, sprzężenie z cechą wykazywały markery zlokalizowane w grupach 1R oraz 4R2, podczas gdy w populacji LG istotne znaczenie miały markery z grupy 6R. Zatem, w warunkowaniu odporności na *Blumeria graminis* u pszenżyta istotne znaczenie ma kierunek krzyżowania odmian. Wg Renner i Kuper (1921) oraz Song i wsp. (1995) zjawisko to jest tłumaczone hipotezą występowania genów wrażliwych na plazmon, gdzie cytoplazma mateczna może modyfikować ekspresję genów ojcowskich.

6. WNIOSKI KOŃCOWE

Na podstawie przeprowadzonych badań sformułować można następujące stwierdzenia i wnioski końcowe:

1. Na podstawie segregacji 547 markerów DArT oraz 7 markerów SSR w dwukierunkowej populacji F_2 'Lamberto' i 'Grenado' liczącej łącznie 131 roślin skonstruowano mapę genetyczną o długości 1 813.6 cM złożoną z 26 grup sprzężeń.

2. Porównawcza analiza strukturalna umożliwiła redukcję liczby uzyskanych grup sprzężeń do 21 fragmentów odpowiadających chromosomom pszenżyta w populacji 'Lamberto' i 'Grenado'. W wyniku analizy cytologicznej potwierdzono liczbę 42 chromosomów u odmian rodzicielskich 'Lamberto' i 'Grenado'.

3. W uzyskanej mapie genetycznej nie stwierdzono obecności chromosomów 2R, 3R oraz 7R, zidentyfikowano natomiast translokacje niehomeologiczne 5BS.3BL oraz 7A.1A. Brak trzech chromosomów żytnich był rekompensowany obecnością chromosomów z genomów A lub B. Zaproponowano reprezentację brakujących chromosomów żytnich poprzez substytucje: 2A/2R, 7A.1A/7R oraz 5BS.3BL/3R.

4. Wysoka liczba grup sprzężeń zidentyfikowanych początkowo w populacji LGL, brak pewnych rejonów chromosomów wynikający z porównań strukturalnych, oraz duże odległości pomiędzy wybranymi grupami sprzężeń świadczą o supresji rekombinacji niektórych rejonów chromosomów pszenżyta.

5. W populacji dwukierunkowej 'Lamberto' i 'Grenado' 33% wszystkich zmapowanych markerów miało zaburzoną segregację i występowało w postaci klastrów na większości chromosomów. Na podstawie analiz przeprowadzonych oddzielnie w populacjach 'Lamberto'×'Grenado' oraz 'Grenado'×'Lamberto' stwierdzono, że w oddziaływaniach jądrowo-cytoplazmatycznych, przekładających się na zaburzenia segregacji chromosomów u pszenżyta, preferowane są chromosomy dziedziczone po matce.

6. Podstawową metodą oceny odporności populacji pszenżyta na *B.graminis* były testy inokulacyjne z wykorzystaniem wirulentnych izolatów. W zależności od kierunku krzyżowania, stwierdzono rożne stosunki rozszczepień genotypów odpornych i wrażliwych. Na podstawie testów chi^2 stwierdzono, że w populacjach F_2 'Lamberto'×'Grenado' oraz F_2 'Grenado'×'Lamberto' rośliny odporne i wrażliwe segregują odpowiednio w stosunku 1:3 i 1:15. Zatem odporność w populacji LG jest warunko-

wana przez 1 gen recesywny, a w populacji GL odporność warunkowana jest przez współdziałanie dwóch genów recesywnych.

7. Na podstawie testu Kruskal-Wallis stwierdzono, że w stadium siewki w populacji 'Lamberto'×'Grenado' odporności na *Blumeria graminis* jest warunkowana przez loci zlokalizowane w rejonie 124.5-130.6 cM na chromosomie 6R, które wyjaśniają około 8% zmienności. Zgodnie z ustalonym modelem współdziałania genów recesywnych, w populacji F_2 'Grenado'×'Lamberto' odporność w stadium siewki była kształtowana przez loci z chromosomów 1R i 4R, które wyjaśniały odpowiednio 12% i 9% zmienności.

8. W stadium rośliny dojrzałej zidentyfikowano dwa główne loci odporności na *Blumeria graminis Q.Pm.lgl.1R* oraz *Q.Pm.lgl.6R*, dla których procent wyjaśnianej zmienności wynosił odpowiednio 15% oraz 33.4%. Oba wymienione loci pochodzą od odmiany 'Grenado' i mają odpowiednio 14 oraz 2 wspólne markery DArT z loci odporności efektywnymi w stadium siewki.

9. Na kształtowanie odporności roślin w stadium rośliny dojrzałej mniejszy wpływ miały loci *Q.Pm.lgl.2A2*, *Q.Pm.lgl.3A* oraz *Q.Pm.lgl.1B* wyjaśniające odpowiednio 1.2%, 4.2% oraz 4% zmienności. W rejonie *Q.Pm.lgl.2A2* zlokalizowano markery SSR – *gwm294* oraz *gwm356*, które są sprzężone ze zidentyfikowanymi wcześniej genami *Pm50* oraz *Pm4*. Podobnie w rejonie *Q.Pm.lgl.1B* znajduje się gen *Pm39*, który może być wykrywany za pomocą markera SSR – *wmc719*.

7. BIBLIOGRAFIA

1. **AGRIOS G.N. 2004.** Plant Pathology Fifth Edition. Elsavier. Chapter 11: 448-451.
2. **ALHEIT K.V., REIF J.C., MAURER H.P., HAHN V., WEISSMANN E.A., MIEDANER T., WÜRSCHUM T. 2011.** Detection of segregation distortion loci in triticale (X *Triticosecale* Wittmack) based on a high-density DArT marker consensus genetic linkage map. BMC Genomics 12: 380.
3. **APPELS R., GUSTAFSON J.P., MAY C.E. 1982.** Structural Variation in the Heterochromatin of Rye Chromosomes in Triticales. Theor Appl Genet 63: 235-244.
4. **ARSENIUK E., GRUSZECKA D., TARKOWSKI CZ. 1998.** Analysis of Stagonospora nodorum Blotch Resistance in Hybrids of Triticale, Wheat, Rye, *Aegilops* spp., *Agrotriticum sp*., and *Dasypyrum sp*., Proc. 4th Int. Triticale Symp., Alberta, Vol. 1: 303–311.
5. **ARSENIUK E. 2002**. V-te Międzynarodowe Sympozjum Naukowe w Instytucie Hodowli i Aklimatyzacji Roślin w Radzikowie na temat pszenżyta.
6. **ARSENIUK E., OLEKSIAK T. 2009.** Stan obecny i perspektywy uprawy pszenżyta. Instytut Hodowli i Aklimatyzacji Roślin w Radzikowie.
7. **BADAEVA E.D., DEDKOVA O. S., GAY G., PUKHALSKYI V.A., ZELENIN A. V., BERNARD S., BERNARD. M. 2007.** Chromosomal rearrangements in wheat: their types and distribution. Genome 50(10): 907-926.
8. **BADEA A., EUDES F., SALMON D., TUVESSON S., VROLIJK A., LARSSON C.T., CAIG V., HUTTNER E., KILIAN A., LAROCHE A. 2011.** Development and assessment of DArT markers in triticale. Theor Appl Genet 122: 1547–1560.
9. **BENNETT M.D. 1974.** Meiotic, gametophitic and early endosperm development in triticale. El Baton, Mexico, 137–148.
10. **BENTO M., PEREIRA H.S., ROCHETA M., GUSTAFSON P, VIEGAS W., SILVA M., FRASER J. 2008**. Polyploidization as a retraction force in plant genome evolution: sequence rearrangements in triticale. PLoS One 3(1): e1402.
11. **BENTO M., GUSTAFSON J.P., VIEGAS W., SILVA M. 2011**. Size matters in Triticeae polyploids: larger genomes have higher remodeling. Genome 54: 175-183.
12. **BEN-DAVID R., XIE W., PELEG Z., SARANGA Y., DINOOR A., FAHIMA T. 2010.** Identification and mapping of *PmG16*, a powdery mildew resistance gene derived from wild emmer wheat. Theor Appl Genet 121(3): 499-510.
13. **BERTHOLDSSON N-O., ANDERSSON S.C., MERKER A. 2012.** Allelopathic potential of *Triticum* spp., *Secale* spp. and *Triticosecale* spp. and use of chromosome substitutions and translocations to improve weed suppression ability in winter wheat. Plant Breeding 131: 75-80.

14. **BHULLAR N.K., STREET K., MACKAY M., YAHIAOUI N., KELLER B. 2009.** Unlocking wheat genetic resources for the molecular identification of previously undescribed functional alleles at the *Pm3* resistance locus. PNAS 106(23): 9519-9524.
15. **BLAKESLEE A., AVERY A. 1937**. Methods of inducing doubling of chromosome in plants. J Hered 28: 392-411.
16. **BLANCO A., GADALETA A., CENCI A., CARLUCCIO A.V., ABDELBACKI A. M. M., SIMEONE R. 2008.** Molecular mapping of the novel powdery mildew resistance gene *Pm36* introgressed from *Triticum turgidum* var. *dicoccoides* in durum wheat. Theor Appl Genet 117: 135–142.
17. **BONCHEV G., GEORGIEV S., PEARCE S. 2010.** Retrotransposons and ethyl methanesulfonate-induced diversity in hexaploid wheat and Triticale. Cent Eur J Biol 5(6): 765-776.
18. **BORRÁS-HIDALGO O. 2004.** Basic insight in plant-pathogen interaction. Biotecnologia Aplicada 21: 1-4.
19. **BOUGOT Y., LEMOINE J., PAVOINE M.T., BARLOY D., DOUSSINAULT G. 2002.** The use of RFLP markers for the identification of alleles of the *Pm* locus conferring powdery mildew resistance in wheat (*Triticum aestivum* L.). Plant Breeding 121: 325-329.
20. **BOUGOT Y., LEMOINE J., PAVOINE M.T., GUYOMAR'CH H., GAUTIER V., MURANTY H., BARLOY D. 2006.** A major QTL effect controlling resistance to powdery mildew in winter wheat at the adult plant stage. Plant Breeding 125: 550-556.
21. **BOYKO E.V., BADAEV N.S., MAXIMOV N.G., ZELENIN A.V. 1984**. Does DNA kontent change in the course of triticale breeding? Cereal Res Commun 12(1-2): 99-100.
22. **BRAUN H.J., PAYNE T.S., MORGOUNOV A.I., GINKEL M.V., RAJARAM S. 1998.** The challenge: one billion tons of wheat by 2020. In: Proceedings of the Ninth International Wheat Genetics Symposium, Saskatoon, Saskatchewan, Canada, 2–7 August 1998: 33–40.
23. **CAI X., LIU D. 1989.** Identification of a 1B/1R wheat–rye chromosome translocation. Theor Appl Genet 77: 81-83.
24. **CAO A. Z., WANG X. E., CHEN Y. P., ZOU X. W., CHEN P. D. 2006.** A sequence-specific PCR marker linked with *Pm21* distinguishes chromosomes 6AS, 6BS, 6DS of *Triticum aestivum* and 6VS of *Haynaldia villosa*. Plant Breeding 125: 201-205.
25. **CENCI A., D'OVIDIO R., TANZARELLA O. A., CEOLONI C., PORCEDDU E. 1999.** Identification of molecular markers linked to *Pm13*, an *Aegilops longissima* gene conferring resistance to powdery mildew in wheat. Theor Appl Genet 98: 448-454.
26. **CEOLONI C., DEL SIGNORE G., ERCOLI L., DONINI P. 1992.** Locating the alien chromatin segment in common wheat - *Aegilops longissima* mildew resistant transfers. Hereditas 116: 239-245.

27. **CHANTRET N., SOURDILLE P., RÖDER M., TAVAUD M., BERNARD M., DOUSSINAULT G. 2000.** Location and mapping of the powdery mildew resistance gene *MlRE* and detection of a resistance QTL by bulked segregant analysis (BSA with microsatellites in wheat). Theor Appl Genet 100: 1217–1224.
28. **CHARLESWORTH D. 1988.** Evolution of homomorphic sporophytic self incompatibility. Heredity 60: 445-453.
29. **CHEŁKOWSKI J., STĘPIEŃ Ł., BŁASZCZYK L. 2004.** Możliwości wykorzystania markerów DNA w hodowli odpornościowej pszenicy. VII Konferencja Krajowa, Rośliny zbożowe - markery molekularne dla odporności, jakości i identyfikacji.
30. **CHEN P.D., QI L.L., ZHOU B., ZHANG S.Z., LIU D.J. 1995.** Development and molecular cytogenetic analysis of wheat-*Haynaldia villosa* 6VS/6AI. translocation lines specifying resistance to powdery mildew. Theor Appl Genet 91: 1125-1128.
31. **CHEN X.M., LUO Y.H., XIA X.C., XIA L.Q., CHEN X., REN Z.L., HE Z.H., JIA J.Z. 2005.** Chromosomal location of powdery mildew resistance gene *Pm16* in wheat using SSR marker analysis. Plant Breeding 124: 225-228.
32. **CHEN Y., CHEŁKOWSKI J. 1999.** Genes for resistance to wheat powdery Milew. J Appl Genet 40(4): 317-334.
33. **CHEN Y., ZHANG Z.Y., LI H.J., LIU Z.Y., VEISZ O., VIDA G. 2011.** *Pm44*, a new gene for powdery mildew resistance on the short arm of wheat chromosome 3A. (Draft Manuscript).
34. **CHEN Z.J., NI Z. 2006 .** Mechanisms of genomic rearrangements and gene expression changes in plant polyploids. BioEssays 28: 240-252.
35. **CHEN Z.J. 2007**. Genetic and Epigenetic Mechanisms for Gene Expression and Phenotypic Variation in Plant Polyploids. Annu Rev Plant Biol 58: 377-406.
36. **CHHUNEJA P., KUMAR K., STIRNWEIS D., HURNI S., KELLER B., DHALIWAL H.S., SINGH K. 2012.** Identification and mapping of two powdery mildew resistance genes in *Triticum boeoticum* L. Theor Appl Genet 124: 1051-1058.
37. **CROSSA J**., **BURGUEÑO J., DREISIGACKER S., VARGAS M., HERRERE-FOESSEL S.A., LILLEMO M., SINGH R.P., TRETHOWAN R., WARBURTON M., FRANCO J., REYNOLDS M., CROUCH J.H., ORTIZ R. 2007.** Association analysis of historical bread wheat germplasm using additive genetic covariance of relatives and population structure. Genetics 177: 1889-1913.
38. **CYPELT E. 2011**. Produkcja upraw rolnych i ogrodniczych w 2011r. Materiały źródłowe. Główny Urząd Statystyczny. Warszawa, 17-33.
39. **DAS M.K., GRIFFEY C.A. 1994.** Diallel analysis of adult-plant resistance to powdery mildew in wheat. Crop Sci 34: 948–952.
40. **DICE L.R. 1945.** Measures of the Amount of Ecologic Association Between Species. Ecology 26: 297–302.

41. **DIVASHUK M.G., KROUPIN P.Y., SOLOVIEV A.A., KARLOV G.I. 2010**. Molecular Cytogenetic Characterization of the Spring Triticale Line 131/7 Carrying a Rye–Wheat Translocation. Russ J Genet, 46 (2): 185-190.
42. **DRZEWIECKI J., TIKHENKO N.D., TSVETKOVA N.V. 2008.** Współdziałanie genomów pszenicy Chinese Spring i linii wsobnych żyta w pszenżycie na przykładzie ekspresji genów kodującychprolaminy ziarniaków. Biuletyn Instytutu Hodowli i Aklimatyzacji Roślin, Radzików, Nr 249: 85-99.
43. **EHDAIE, B., R.W. WHITKUS, AND J.G. WAINES. 2003**. Root biomass, water-use efficiency and performance of wheat-rye translocations of chromosomes 1 and 2 in spring bread wheat Pavon. Crop Sci 43: 710–717.
44. **EICHMANN R, HÜCKELHOVEN R. 2008.** Accomodation of powdery mildew fungi in intact plant cells. J Plant Physiol 165: 5-18.
45. **ELLINGBOE A.H. 1976.** Genetics of host-parasite interactions. Encyclopedia of Plant Physiology, NS. Vol. 4. Physiological Plant Pathology. Springer-Verlag, Berlin, 761-778.
46. **EXCOFFIER L., LISCHER H.E. L. 2010.** Arlequin suite ver 3.5: A new series of programs to perform population genetics analyses under Linux and Windows. Mol Ecol Resour. 10: 564-567.
47. **FELDMAN M., LEVY A.A. 2005.** Allopolyploidy – a shaping force in the evolution of wheat genomes. Cytogenet Genome Res 109(1-3): 250-258.
48. **FELSENSTEIN, J. 1989.** PHYLIP - Phylogeny Inference Package (Version 3.2). Cladistics 5: 164-166.
49. **FIEDOROW Z., GOŁĘBNIAK B., WEBER Z. 2006.** Ogólne wiadomości z fitopatologii, Wydawnictwo Akademii Rolniczej im. Augusta Cieszkowskiego. ISBN 83-7160-4335.
50. **FINCKH M. R., GACEK E. S., CZEMBOR H. J., WOLFE M. S. 1999**. Host frequency and density effects on powdery mildew and yield in mixtures of barley cultivars. Plant Pathol 48: 807-816.
51. **FRANCKI M.G., WALKER E., CRAWFORD A.C., BROUGHTON S., OHM H.W., BARCLAY I., WILSON R.E., MCLEAN R. 2009.** Comparison of genetic and cytogenetic maps of hexaploid wheat (*Triticum aestivum* L.) using SSR and DArT markers. Mol Genet Genomics 281: 181–191.
52. **FRIEBE B., HEUN M., TULEEN N., ZELLER F.J., GILL B.S. 1994.** Cytogenetically Monitored Transfer of Powdery Mildew Resistance from Rye into Wheat. Crop Sci 34(3),: 621-625.
53. **FRIEBE B., JIANG J., RAUPP W.J., MCINTOSH R.A., GILL B.S. 1996.** Characterization of wheat-alien translocations resistance to diseases and pest: current status. Euphytica 91:59–87.

54. **FU B., CHEN Y., LI N., MA H., KONG Z., ZHANG L., JIA H., MA Z. 2013.** *pmX*: a recessive powdery mildew resistance gene at the *Pm4* locus indentified in wheat landrace Xiaohongpi. Theor Appl Genet 126(4): 913-921.
55. **GAO H., ZHU F., JIANG Y., WU J., YAN W., ZHANG Q., JACOBI A., CAI S. 2012**. Genetic analysis and molecular mapping of a new powdery mildew resistant gene *Pm46* in common wheat. Theor Appl Genet 125(5): 967-973.
56. **GILL B.S. 1999.** Nucleocytoplasmic interaction (NCI) hypothesis of genome evolution and speciation in polyploid plants evolution and speciation in polyploid plants. In Proceedings of the Kihara Memorial International Symposium on Cytoplasmic Engineering in Wheat. Edited by T. Sasakurma. Yokohama, Japan, 48-53.
57. **GODFREY D, ZHANG Z, SAALBACH G, THORDAL-CHRISTENSEN H.** A proteomics study of barley powdery mildew haustoria. Proteomics 9: 3222–3232.
58. **GOLOENKO I.M., DAVYDENKO O.G., SHIMKEVICH A.M. 2002.** Segregation distortion of marker nuclear genes in alloplasmic and isoplasmic lines of barley. Genetika 38: 944–949.
59. **GONZÁLEZ J.M., MUÑIZ L.M., JOUVE N. 2005.** Mapping of QTLs for androgenetic response based on a molecular genetic map of ×*Triticosecale* Wittmack. Genome, 48(6): 999–1009.
60. **GRUSZECKA D., KOWALCZYK K. 2002.** Yield Structure of Triticale Strains Achieved Due to Crossbreeding with *Aegilops*, Proc. 5th Int. Triticale Symp., Radzikow, 2: 345-349.
61. **GUSTAFSON J.P., BENNETT M.D. 1976.** Preferential Selection for Wheat-Rye Substitutions in 42-Chromosome Triticale. Crop Sci 16: 688–693.
62. **HAMMER Ø., HARPER D.A.T., RYAN P.D. 2001.** PAST: Paleontological Statistics Software Package for Education and Data Analysis. Palaeontologia Electronica 4(1).
63. **HAN F.P., FEDAK G., OUELLET T., LIU B. 2003**. Rapid genomic changes in interspecific and intergeneric hybrids and allopoliploids of Triticeae. Genome 46, 716-723.
64. **HAO Y., LIU A., WANG Y., FENG D., GAO J., LI X., LIU S., WANG H. 2008.** *Pm23*: a new allele of *Pm4* located on chromosome 2AL in wheat. Theor Appl Genet 117: 1205-1212.
65. **HARTL L., WEISS H., ZELLER F.J., JAHOOR A. 1993.** Use of RFLP markers for the identification of alleles of the *Pm3* locus conferring powdery mildew resistance in wheat (*Triticum aestivum* L.). Theor Appl Genet 86: 959-963.
66. **HARTL L., MOHLER V., ZELLER F.J., HSAM S.L.K., SCHWEIZER G. 1999.** Identification of AFLP markers closely linked to the powdery mildew resistance genes *Pm1c* and *Pm4a* in common wheat (*Triticum aestivum* L.). Genome 42(2): 322-329.
67. **HE R., CHANG Z., YANG Z., YUAN Z., ZHAN H., ZHANG X., LIU J. 2009.** Inheritance and mapping of powdery mildew resistance gene *Pm43* introgressed from *Thinopyrum intermedium* into wheat. Theor Appl Genet 118: 1173-1180.

68. **HEITEFUSS R. 1997.** General principles of host-parasite interactions. Resistance of Crop Plants against Fungi. G. Fischer, Jena, 19-32.
69. **HEUN M., FISCHBECK G. 1987.** Genes for powdery mildew resistance in cultivars of spring wheat. Plant Breeding 99: 282-288.
70. **HEUN M., FRIEBE B., BUSHUK W. 1990.** Chromosomal location of the powdery mildew resistance gene of amigo wheat. Genetics 80(10): 1129-1133.
71. **HOLLAND J. 2009.** QTL Mapping 2. NC State University, North Caroline, 1-5.
72. **HSAM S.L.K., ZELLER F.J. 1997.** Evidence of allelism between genes *Pm8* and *Pml7* and chromosomal location of powdery mildew and leaf rust resistance genes in the common wheat cultivar 'Amigo'. Plant Breeding 116: 119-122.
73. **HSAM S.L.K., HUANG X.Q., ERNST F., HARTL L., ZELLER F.J. 1998.** Chromosomal location of genes for resistance to powdery mildew in common wheat (*Triticum aestivum* L. em Thell.). Theor Appl Genet 96: 1129-1134.
74. **HSAM S.L.K., MOHLER V., HARTL L., WENZEL G., ZELLER F.J. 2000.** Mapping of powdery mildew and leaf rust resistance genes on the wheat-rye translocated chromosome T1BL·1RS using molecular and biochemical markers. Plant Breeding 119: 87-89.
75. **HSAM S.L.K., HUANG X.Q., ZELLER F.J. 2001.** Chromosomal location of genes for resistance to powdery mildew in common wheat (*Triticum aestivum* L. em Thell.) 6. Alleles at the *Pm5* locus. Theor Appl Genet 102: 127-133.
76. **HSAM S.L.K., LAPOCHKINA I.F., ZELLER F.J. 2003**. Chromosomal location of genes for resistance to powdery mildew in common wheat (*Triticum aestivum* L. em Thell.). 8. Gene *Pm32* in a wheat-*Aegilops speltoides* translocation line. Euphytica 133: 367-370.
77. **HUA W., LIU Z., ZHU J., XIE CH.,YANG T., ZHOU Y., DUAN X.,SUN Q., LIU Z. 2009.** Identification and genetic mapping of *pm42*, a new recessive wheat powdery mildew resistance gene derived from wild emmer (*Triticum turgidum* var. *dicoccoides*). Theor Appl Genet 119: 223-230.
78. **HUANG X.Q., HSAM S.L.K., ZELLER F.J. 1997.** Chromosomal location of genes for resistance to powdery mildew in common wheat (*Triticum aestivum* L. em. Thell.) 4. Gene *Pm24* in Chinese landrace Chiyacao. Theor Appl Genet 95: 950-953.
79. **HUANG X.Q.,. HSAM S.L.K., ZELLER F.J., WENZEL G., MOHLER V. 2000**. Molecular mapping of the wheat powdery mildew resistance gene *Pm24* and marker validation for molecular breeding. Theor Appl Genet 101: 407-414.
80. **HUANG X.Q., HSAM S.L.K., ZELLER F.J. 2002.** Chromosomal location of genes for resistance to powdery mildew in Chinese wheat lines Yieyan 94-1-1 and Siyan 94-2-1. Hereditas 136: 212-218.

81. **HUANG X.Q., WANG L.X., XU M.X., RÖDER M.S. 2003.** Microsatellite mapping of the powdery mildew resistance gene *Pm5e* in common wheat (*Triticum aestivum* L.). Theor Appl Genet 106: 858–865.
82. **HUANG X.Q., HSAM S.L.K., MOHLER V., RÖDER M.S., ZELLER F.J. 2004.** Genetic mapping of three alleles at the *Pm3* locus conferring powdery mildew resistance in common wheat (*Triticum aestivum* L.). Genome 47: 1130-1136.
83. **HÜCKELHOVEN R. 2005.** Powdery mildew susceptibility and biotrophic infection strategies. FEMS Microbiol Lett 245: 9-17.
84. **JACCOUD D., PENG K., FEINSTEIN D., KILIAN A. 2001.** Diversity arrays: a solid state technology for sequence information independent genotyping. Nucleic Acids Res 29(4).
85. **JAKOBSON I., PEUSHA H., TIMOFEJEVA L., JÄRVE K. 2006.** Adult plant and seedling resistance to powdery mildew in a *Triticum aestivum* × *Triticum militinae* hybrid line. Theor Appl Genet 112: 760-769.
86. **JAKOBSON I., REIS D., TIIDEMA A., PEUSHA H., TIMOFEJEVA L., VALÁRIK M., KLADIVOVÁ M., ŠIMKOVÁ H., DOLEŽEL J., JÄRVE K. 2012.** Fine mapping, phenotypic characterization and validation of non-race-specific resistance to powdery mildew in a wheat–*Triticum militinae* introgression line. Theor Appl Genet 125: 609-623.
87. **JENKYN J. F. 1973.** Seasonal changes in incubation time of *Erysiphe graminis* f.sp. hordei. Ann Appl Biol 73(1): 15-18.
88. **JÄRVE K., PEUSHA H.O., TSYMBALOVA J., TAMM S., DEVOS K.M., ENNO T.M. 2000.** Chromosomal location of a *Triticum timopheevii* - derived powdery mildew resistance gene transferred to common wheat. Genome 43: 377-381.
89. **JIA J., DEVOS K.M., CHAO S., MILLER T.E., READER S.M., GALE M.D. 1996.** RFLP-based maps of the homoeologous group-6 chromosomes of wheat and their application in the tagging of *Pm12*, a powdery mildew resistance gene transferred from *Aegilops speltoides* to wheat. Theor Appl Genet 92: 559-565.
90. **JØRGENSEN J.H. 1973.** Gene *Pm6* for resistance to powdery mildew in wheat. Euphytica 22: 43.
91. **KELLER M., KELLER B., SCHACHERMAYR G., WINZELER M., SCHMID J. E., STAMP P., MESSMER M. M. 1999.** Quantitative trait loci for resistance against powdery mildew in a segregating wheat 3 spelt population. Theor Appl Genet 98: 903-912
92. **KISS A. 1971**. Origin of the preliminary realeased Hungarian haploid varieries, No. 57. and 64. Wheat Info Serv 32: 20-22.
93. **KLIMENKO I., RAZGULAYEVA N., GAU M., OKUMURA K., NAKAYA A., TABATA S., KOZLOV N.N., ISOBE S. 2010.** Mapping candidate QTLs related to plant persistency in red clover. Theor Appl Genet 120: 1253-1263.

94. **KORBAS M., MRÓWCZYŃSKI M. 2011**. Metodyka integrowanej ochrony pszenżyta ozimego i jarego. Instytut Ochrony Roślin, Państwowy Instytut Badawczy. ISBN 978-83-89867-68-1: 27-31.
95. **KONAREV V. G. 2001.** Morfogenez i molekuljarno-biologiczeskij analiz rastenij. Wyd. VIR, Sankt-Petersburg, 279.
96. **KOWALCZYK K. 2005.** Analiza wybranych komponentów plonu oraz porażenia przez mączniaka prawdziwego u mieszańców pszenicy zwyczajnej homo- i heterozygotycznych pod względem genów *SuPm8*. Annales UMCS, Sec. E, 60: 49-58.
97. **KOWALCZYK K., GRUSZECKA D., NOWAK M., LEŚNIOWSKA-NOWAK J. 2011.** Resistance of triticale hybrids with *Pm4b* and *Pm6* genes to powdery mildew. Acta Biol Cracov Bot 53(1): 57-62.
98. **KOZŁOWSKA M., KONIECZNY G. 2003.** Biologia odporności roślin na patogeny I szkodniki. Wydawnictwo Akademii Rolniczej im. Augusta Cieszkowskiego.
99. **KRUSKAL W.H., WALLIS W.A. 1952.** Use of ranks in one-criterion variance. J Am Stat Assoc 47(260): 583-621.
100. **KUMAR S., GILL B.S., FARIS J.D. 2007.** Identification and characterization of segregation distortion loci along chromosome 5B in tetraploid wheat. Mol Genet Genomics 278: 187-196.
101. **KWIATEK M., BŁASZCZYK L., WIŚNIEWSKA H., APOLINARSKA B. 2012.** *Aegilops-Secale* amphiploids: chromosome categorisation, pollen viability and identification of fungal disease resistance genes. J Appl Genetics 53: 37-40.
102. **LAN C., LIANG S., WANG Z., YAN J., ZHANG Y., XIA X., HE Z. 2009.** Quantitative Trait Loci Mapping for Adult-Plant Resistance to Powdery Mildew in Chinese Wheat Cultivar Bainong 64. Phytopathology Genetics and Resistance 99(10): 1121-1126.
103. **LANDER E.S., GREEN P., ABRAHAMSON J., BARLOW A., DALY M.J., LINCOLN S.E. NEWBURG L. 1987.** MAPMAKER: An interactive computer package for constructing primary genetic linkage maps of experimental and natural populations. Genomics 1: 174-181.
104. **LETTA T., MACCAFERRI M., BADEBO A., AMMAR K., RICCI A., CROSSA J., TUBEROSA R. 2013.** Searching for novel sources of field resistance to *Ug99* and Ethiopian stem rust races in durum wheat via association mapping. Theor Appl Genet 126(5): 1237-1256.
105. **LEWONTIN R.C. 1972.** The apportionment of human diversity. Evol Biol 6: 381-398.
106. **LI G., FANG T., ZHANG H., XIE CH., LI H., YANG T., NEVO E., FAHIMA T., SUN Q., LIU Z. 2009.** Molecular identification of a new powdery mildew resistance gene *Pm41* on chromosome 3BL derived from wild emmer (*Triticum turgidum* var. *dicoccoides*). Theor Appl Genet 119: 531-539.

107. **LI T., ZHANG Z., HU Y., DUAN X., XINZ. 2011.** Identification and molecular mapping of a resistance gene to powdery mildew from the synthetic wheat line M53. J Appl Genetics 52: 137-143.
108. **LIANG S.S., SUENAGA K., HE Z. H., WANG Z. L., LIU H. Y., WANG D. S., SINGH R. P., SOURDILLE P., XIA X. C. 2006.** Quantitative Trait Loci Mapping for Adult-Plant Resistance to Powdery Mildew in Bread Wheat. Phytopathology Genetics and Resistance 96(7): 784-789.
109. **LILLEMO M., ASALF B., SINGH R. P., HUERTA-ESPINO J., CHEN X. M., HE Z. H., BJØRNSTAD Å. 2008.** The adult plant rust resistance loci *Lr34/Yr18* and *Lr46/Yr29* are important determinants of partial resistance to powdery mildew in bread wheat line Saar. Theor Appl Genet 116: 1155–1166.
110. **LIND V. 1982.** Analysis of the resistance of wheat-rye addition lines to powdery mildew of wheat (*Erysiphe graminis* f. sp. *tritici*). Tagungsber Akad Landwirtsch Wiss DDR 198: 509-520.
111. **LINSCHAU M., OEHLER E. 1935**. Untersuchungen AM konstant Intermediären Additiven Rimpau'schen Weizen-Roggen-Bastard. Züchter, 7: 228-233.
112. **LIPKA U., FUCHS R., LIPKA V. 2008.** Arabidopsis non-host resistance to powdery mildews. Curr Opin Plant Biol 11: 404-411.
113. **LIU J., LIU D., TAO W., LI W., WANG S., CHEN P., CHENG S., GAO D. 2000.** Molecular marker-facilitated pyramiding of different genes for powdery mildew resistance in wheat. Plant Breeding 119: 21-24.
114. **LIU S., GRIFFEY C.A., SAGHAI MAROOF M.A. 2001.** Identification of Molecular Markers Associated with Adult Plant Resistance to Powdery Mildew in Common Wheat Cultivar Massey. Crop Sci 41: 1265-1275.
115. **LIU S.X., ANDERSON J.A. 2003.** Marker assisted evaluation of *Fusarium* head blight resistant wheat germplasm. Crop Science 43: 760-766.
116. **LIU Z., SUN Q., NI Z., YANG T. 1999.** Development of SCAR markers linked to the *Pm21* gene conferring resistance to powdery mildew in common wheat. Plant Breeding 118: 215-219.
117. **LIU Z., SUN Q., NI1 Z., NEVO E., YANG T. 2002.** Molecular characterization of a novel powdery mildew resistance gene *Pm30* in wheat originating from wild emmer. Euphytica 123: 21-29.
118. **LIU X., YOU J., GUO L., LIU X., HE Y., YUAN J., LIU G., FENG Z. 2011.** Genetic Analysis of Segregation Distortion of SSR Markers in F2 Population of Barley. J Agr Sci 3(2).
119. **LOEGERING W.G., SEARS E.R. 1963.** Distorted inheritance of stem-rust resistance of timstein wheat caused by a pollen killing gene. Can J Genet Cytol 5: 67-72.
120. **LOWE I., JANKULOSKI L., CHAO S., CHEN X., SEE D., DUBCOVSKY J. 2011.** Mapping and validation of QTL which confer partial resistance to broadly viru-

lent post-2000 North American races of stripe rust in hexaploid wheat. Online Resource 2. Theor Appl Genet 123: 143–157.

121. **LU H., ROMERO-SEVERSON J., BERNARDO R. 2002.** Chromosomal regions associated with segregation distortion in maize. Theor Appl Genet, 105(4): 622-628.
122. **LUKASZEWSKI A.J. 2006** Cytogenetically Engineered Rye Chromosomes 1R to Improve Bread-Making Quality of Hexaploid Triticale. Crop Sci 46: 2183-2194.
123. **LUKASZEWSKI A.J., KOPECKY D., LINC G. 2012.** Inversions of chromosome arms 4AL and 2BS in wheat invert the patterns of chiasma distribution. Chromosoma 121: 201-208.
124. **LUO P. G., LUO H. Y., CHANG Z. J., ZHANG H. Y., ZHANG M., REN Z. L. 2009.** Characterization and chromosomal location of *Pm40* in common wheat: a new gene for resistance to powdery mildew derived from *Elytrigia intermedium*. Theor Appl Genet 118: 1059-1064.
125. **LUTZ J., HSAM S.L.K., LIMPERTI E., ZELLER F.J. 1994.** Chromosomal location of powdery mildew resistance genes in *Triticum aestivum* L. (common wheat) 2. Genes *Pm2* and *Pm19* from *Aegilops squarrosa* L. Heredity 74: 152-156.
126. **ŁAPIŃSKI B. 2003.** Anomalny powrót do kariotypów rodzicielskich w pokoleniu F_2 mieszańców pszenżyta tetraploidalnego z żytem tetraploidalnym. Biuletyn Instytutu Hodowli i Aklimatyzacji Roślin, Radzików, Nr 228: 131-139.
127. **MA Z.Q., SORRELS M.E., TANKSLEY S.D. 1994**. RFLP markers linked to powdery mildew resistance genes *Pm1*, *Pm2*, *Pm3*, and *Pm4* in wheat. Genome 37: 871-875.
128. **MA X.F., GUSTAFSON J.P. 2006.** Timing and rate of genome variation in triticale following allopolyploidization. Genome 49(8): 950-958.
129. **MA X.F., GUSTAFSON J.P. 2008.** Allopolyploidization-accommodated Genomic Sequence Changes in Triticale. Ann Bot-London 101: 825-832.
130. **MA H., KONG Z., FU B., LI N., ZHANG L., JIA H., MA Z. 2011.** Identification and mapping of a new powdery mildew resistance gene on chromosome 6D of common wheat. Theor Appl Genet 123: 1099-1106.
131. **MALEPSZY S. 2009.** Biotechnologia roślin. Wydawnictwo Naukowe PWN, Warszawa, 290.
132. **MANGELSDORF P.C., JONES D.F. 1926.** The expression of Mendelian factors in the gametophyte of maize. Genetics 11: 423-455.
133. **MANLY K.F., ELLIOT R.W. 1991.** MapManager, a microcomputer program for analysis of data from recombinant inbred strains. Mammalian Genome 1: 123-126.
134. **MANNERS J.G. 1993.** Principles of Plant Pathology. Cambrige University Press. ISBN 0-521-43402-5.

135. **MAŃKOWSKI D.R, LAUDAŃSKI Z., JANASZEK M. 2011.** Przydatność wybranych miar podobieństwa dla danych binarnych do analiz wielocechowych w badaniach molekularnych. Biuletyn Instytutu Hodowli I Aklimatyzacji Roślin Nr 262: 155-173.
136. **MARONE D., LAIDO G., GADALETA A., COLASUONNO P., FICCO D.B.M., GIANCASPRO A., GIOVE S., PANIO G., RUSSO M.A., DE VITA P., CATTIVELLI L., PAPA R., BLANCO A., MASTRANGELO A.M. 2012.** A high-density consensus map of A and B wheat genomes. Theor Appl Genet 125: 1619–1638.
137. **MATER Y., BAENZIGER S., GILL K., GRAYBOSCH R., WHITCHER L., BAKER C., SPECHT J., DWEIKAT I. 2004.** Linkage mapping of powdery mildew and greenbug resistance genes in recombinant 1RS from 'Amigo' and 'Kavkaz' wheat-rye translocations of chromosome 1RS.1AL. Genome 47: 292-298.
138. **MATYSIK P., NITA Z. 2008.** Postęp w hodowli odpornościowej pszenicy ozimej na przykładzie zaawansowanych rodów hodowlanych. Progress in Plant Protection/Postępy w Ochronie Roślin 48(1): 41-46.
139. **MAXWELLA J. J., LYERLYB J. H., SRNICC G., PARKSD R., COWGERD C., MARSHALLD D., BROWN-GUEDIRAE G., MURPHY J. P. 2010.** *MlAB10*: A *Triticum turgidum* Subsp. *dicoccoides* Derived Powdery Mildew Resistance Gene Identified in Common Wheat. Crop Sci 50(6): 2261-2267.
140. **MCCLINTOCK B. 1984.** The significance of responses of the genome to challenge. Science 226: 792-801.
141. **MCINTOSH R.A., HART G.E., DEVOS K.M., GALE M.D., ROGERS W.J. 1998.** Catalogue of gene symbols for wheat. In: Slinkard AE (ed): Proceedings of 9th International Wheat Genetics Symposium, University Extension Press, University of Saskatchewan, Vol 5.
142. **MCINTOSH R.A., DEVOS K.M., DUBCOVSKY J., ROGERS W.J., MORRIS C.F., APPELS R., ANDERSON O.D. 2005.** CATALOGUE OF GENE SYMBOLS FOR WHEAT: 2005 Supplement.
143. **MCINTOSH R.A., YAMAZAKI Y., DUBCOVSKY J., ROGERS J., MORRIS C., SOMERS D.J., APPELS R., DEVOS K.M. 2010.** CATALOGUE OF GENE SYMBOLS FOR WHEAT: 2010 Supplement.
144. **MEISTER G. 1928**. Das Problem der Speziesbastardierung im Lichte der experimentellen Methode. Z. Indukt. Abstamm.-Vererbungsl. Suppi. Band 2. Verh. 5. Tnt. Kongr. Vererb. Wissensch. 1094-1117.
145. **MERGOUM M, GOMÉZ-MCPHERSONS H. 2004**. "Triticale Improvement and production". FAO Plant Production and Protection Paper 179.
146. **MERKER A. 1976.** Cytogenetic Effect of Heterochromatin in Hexaploid Triticale. Hereditas 83: 215-222.
147. **MICHELMORE R.W., PARAN I., KESSELI R.V. 1991.** Identification of markers linked to disease - resistance genes by bulk segregant analysis: a rapid method to detect

markers in specific genomic regions by using segregating populations. Proc Natl Acad Sci USA 88: 9828-9832.

148. **MILCZARSKI P., MASOJĆ P. 2003.** Interval mapping of genes controlling growth of rye plants. Plant Breeding and Seed Science, Vol. 48 (2/2): 135-142.
149. **MILCZARSKI P., BOLIBOK-BRĄGOSZEWSKA H., MYŚKÓW B., STOJAŁOWSKI S., HELLER-USZYŃSKA K., GÓRALSKA M., BRĄGOSZEWSKI P., USZYŃSKI G., KILIAN A., RAKOCZY-TROJANOWSKA M. 2011.** A High Density Consensus Map of Rye (*Secale cereale* L.) Based on DArT Markers. PLoS ONE 6(12).
150. **MILLIGAN B. G. 1992.** Plant DNA isolation. In: Molecular analysis of populations: a practical approach. IRL Press, Oxford, UK, 59-88.
151. **MINGEOT D., CHANTRET N., BARET P.V., DEKEYSER A., BOUKHATEM N., SOURDILLE P., DOUSSINAULT G., JACQUEMIN J.M. 2002.** Mapping QTL involved in adult plant resistance to powdery mildew in the winter wheat line RE714 in two susceptible genetic backgrounds. Plant Breeding 121: 133-140.
152. **MIRANDA L. M., MURPHY J. P., MARSHALL D., LEATH S. 2006.** *Pm34*: a new powdery mildew resistance gene transferred from *Aegilops tauschii* Coss. to common wheat (*Triticum aestivum* L.). Theor Appl Genet 113: 1497-1504.
153. **MIRANDA L. M., MURPHY J. P., MARSHALL D., COWGER C., LEATH S. 2007.** Chromosomal location of *Pm35*, a novel *Aegilops tauschii* derived powdery mildew resistance gene introgressed into common wheat (*Triticum aestivum* L.). Theor Appl Genet 8: 1451-1456.
154. **MIRZAGHADERI G. 2010.** A simple metaphase chromosome preparation from meristematic root tip cells of wheat for karyotyping or in situ hybridization. Afr J Biotechnol 9(3): 314-318.
155. **MORGANTE M., HANAFEY M., POWELL W. 2002.** Microsatellites are preferentially associated with nonrepetitive DNA in plant genomes. Nat Genet 30: 194-200.
156. **MOHLER V., JAHOOR A. 1996.** Allele-specific amplification of polymorphic sites for the detection of powdery mildew resistance loci in cereals. Theor Appl Genet 93: 1078-1082.
157. **MOHLER V., BAJER A., FLACH K., SCHWEIZER G., HARTL L. 2011**. Genetic analysis of powdery mildew resistance in German winter wheat cultivar Cortez. Plant Breeding 130: 35-40.
158. **MORITZ O. 1933**. Serologische Untersuchungen an Getreidebastarden. Ber. Deutsch. Bot. Ges. Bd. LJ, I Generalversamml. Heft., 52-57.
159. **MÜNTZING A. 1955.** Mode of production and properties of Triticale – Strain with 70 chromosomes. Wheat Inf Serv 2: 1-12.

160. **NADZIAK J., BILIŃSKI Z.R. 2006.** Zmienność cech u odmian jęczmienia ozimego zgromadzonych w Banku Genów. Biuletyn Instytutu Hodowli i Aklimatyzacji Roślin nr 240/241: 99-109.
161. **NAKAJIMA G. 1950**. Genetical and cytological studies in breeding of amphiploid types between *Triticum* and *Secale*. 1. The external characters and chromosomes of fertile F1 *T. turgidum* (n=14) x *S. cereale* (n=7) and its F2 progenies. Jap J Genet 25: 139-148.
162. **NEI M., LI W.H. 1979.** Mathematical model for studying genetic variation in terms of restriction endonucleases. Proc Natl Acad Sci USA 76: 5269-5273.
163. **NIELSEN M.E., THORDAL-CHRISTENSEN H. 2012.** Recycling of *Arabidopsis* plasma membrane PEN1 syntaxin. Plant Signaling & Behavior 7: 1541-1543.
164. **NIU J.S., WANG B.Q., WANG Y.H., CAO A.Z., QI Z.J., SHEN T.M. 2008.** Chromosome location and microsatellite markers linked to a powdery mildew resistance gene in wheat line 'Lankao 90(6)'. Plant Breeding 127: 346-349.
165. **NIU J.S., JIA H.Y., YIN J., WANG B.Q., MA Z.Q., SHEN T.M. 2010.** Development of an STS Marker Linked to Powdery Mildew Resistance Genes PmLK906 and Pm4a by Gene Chip Hybridization. Agricultural Sciences in China 9(3): 331-336.
166. **NOWAKOWSKA J. A.** 2006. Zastosowanie markerów DNA (RAPD, SSR, PCR-RFLP i STS) w genetyce drzew leśnych, entomologii, fitopatologii i łowiectwie. LEŚNE PRACE BADAWCZE 1: 73-101.
167. **NÜRNBERGER T., BRUNNER F. 2002.** Innate immunity in plants and animals: emerging parallels between the recognition of general elicitors and pathogen-associated molecular patterns. Curr Opin Plant Biol 5: 318-324.
168. **NÜRNBERGER T., LIPKA V. 2005.** Non-host resistance in plants: new insights into an old phenomenon. Mol Plant Pathol 6(3): 335-345.
169. **OHM H.W., SHANER G.E. 1976.** Three components of slow-leaf-rusting at different growth stages in wheat. Phytopathology 66: 1356-1360.
170. **OLESZCZUK S., RABIZA-SWIDER J., ZIMNY J., LUKASZEWSKI A.J. 2011.** Aneuploidy among androgenic progeny of hexaploid triticale (X *Triticosecale* Wittmack). Plant Cell Rep 30: 575-586.
171. **OPALSKI K.S., TRESCH S., KOGEL K.H., GROSSMANN K., KOHLE H., HÜCKELHOVEN R. 2006.** Metrafenone: studies on the mode of action of a novel cereal powdery Mildew fungicide. Pest Manag Sci 62(l): 393-401.
172. **PAILLARD S., SCHNURBUSCH T., WINZELER M., MESSMER M., SOURDILLE P., ABDERHALDEN O., KELLER B., SCHACHERMAYR G. 2003.** An integrative genetic linkage map of winter wheat (*Triticum aestivum* L.) Theor Appl Genet 107: 1235-1242.
173. **PANSTRUGA R. 2003.** Establishing compatibility between plants and obligate biotrophic pathogens. Cur Opin Plant Biol 6: 320-326.

174. **PANSTRUGA R. 2005.** Serpentine plant *MLO* proteins as entry portals for powdery mildew fungi. Biochem Soc T 33(2): 389-392.
175. **PATERSON A.H., LANDER E.S., HEWITT J.D., PETERSON S., LINCOLN S.E., TANKSLEY S.D. 1988.** Resolution of quantitative traits into Mendelian factors by using acomplete linkage map of restriction fragment length polymorphisms. Nature 1988, 335(6192): 721-726.
176. **PARLEVLIET J.E. 1979.** Components of resistance that reduce the rate of epidemic development. Ann Rev Phytopathol 17: 203-222.
177. **PEREIRA M.G., LEE M., BRAMEL-COX P., WOODMAN W., DOEBLEY J., WHITKUS R. 1994.** Construction of an RFLP map in sorghum and comparative mapping in maize. Genome 37: 236-243.
178. **PERUGINI L. D., MURPHY J. P., MARSHALL D., BROWN-GUEDIRA G. 2008.** *Pm37*, a new broadly effective powdery mildew resistance gene from *Triticum timopheevii.* Theor Appl Genet 116: 417-425.
179. **PEUSHA H., HSAM S.L.K., ZELLER F.J. 1996.** Chromosomal location of powdery mildew resistance genes in common wheat (*Triticum aestivum* L. em. Thell.) 3. Gene *Pm22* in cultivar Virest. Euphytica 91: 149-152.
180. **PEUSHA H., ENNO T., PRIILINN O. 2000.** Chromosomal location of powdery mildew resistance genes and cytogenetic analysis of meiosis in common wheat cultivar Meri. Hereditas 132(1): 29-34.
181. **PIETRUSIŃSKA A. 2010.** Wykorzystanie markerów molekularnych do wprowadzania genów odporności na rdzę brunatną (*Puccinia recondita* f. sp. *tritici)* i mączniaka prawdziwego (*Blumeria graminis* f. sp. *tritici*) do pszenicy ozimej. Biuletyn Instytutu Hodowli i Aklimatyzacji Roślin 256: 31-44.
182. **PISSAREV V. 1966**. Different Approaches in Triticale Breeding. In Proc. 2nd Int. Wheat Genetics Symp., Lund, Sweden. Hereditas Suppl 2: 279-290.
183. **PRIMROSE S.B. 1995.** Principles of genome analysis: A Guide to Mapping and Sequencing DNA from Different Organisms. Blackwell Science Limited, 197-198.
184. **PRITCHARD J. K., STEPHENS M., AND DONNELLY P. 2000.** Inference of population structure using multilocus genotype data. Genetics 155: 945–959.
185. **QI L., CAO M., CHEN P., LI W., LIU D. 1996.** Identification, mapping, and application of polymorphic DNA associated with resistance gene *Pm21* of wheat. Genome, 39(1): 191-197.
186. **RAKOCZY-TROJANOWSKA M., BOLIBOK H. 2004.** Characteristics and a comparison of three classes of microsatellite-based markers and their application in plants. Cell Mol Biol Lett 9: 221-238.
187. **RAYMOND M., ROUSSET F. 1995.** GENEPOP (version 1.2): population genetics software for exact tests and ecumenicism. J. Heredity 86: 248-249.

188. **READER S .M., MILLER T.E. 1991.** The introduction into bread wheat of a major gene for resistance to powdery mildew from wild emmer wheat. Euphytica 53: 57-60.
189. **REN T.H., YANG Z.J., YAN B.J., ZHANG H.Q., FU S.L., REN Z.L. 2009.** Development and characterization of a new 1BL·1RS translocation line with resistance to stripe rust and powdery mildew of wheat. Euphytica 169: 207-313.
190. **RENNEIR O., KUPPER, W. 1921.** Artkreuzungen in der Gattung Epilobium. Bet D Bot Ges 39: 201-206.
191. **RESZKA E., SONG Q., ARSENIUK E., CREGAN P.B., UENG P.P. 2007.** The QTL Controlling Partial Resistance to *Stagonospora nodorum* Blotch Disease in Winter Triticale Bogo. Plant Path Bull 16: 161-167.
192. **REYAZUL ROUF MIR R.R., ZAMAN-ALLAH M., SREENIVASULU N., TRETHOWAN R., VARSHNEY RK. 2012.** Integrated genomics, physiology and breeding approaches for improving drought tolerance in crops. Theor Appl Genet 125: 625-645.
193. **RIMPAU W. 1891**. Kreuzungsprodukte Landwirthschaftlicher Kulturplanzen. Landwirstschasftlishe Jahrbuecher, 20: 335-371.
194. **RINGELMANN A., RIEDEL M., RIEDERER M., HILDEBRANDT U. 2009**. Two sides of a leaf blade: *Blumeria graminis* needs chemical cues in cuticular waxes of *Lolium perenne* for germination and differentiation. Planta 230: 95–105.
195. **RONG J.K., MILLET E., MANISTERSKI J., FELDMAN M. 2000.** A new powdery mildew resistance gene: Introgression from wild emmer into common wheat and RFLP-based mapping. Euphytica 115: 121-126.
196. **RUBIALES D., RAMIREZ M.C., CARVER T.L. W., NIKS R. E. 2001.** Abnormal germling development by brown rust and powdery mildew on cer barley mutants. Hereditas 135: 271-276.
197. **RUPERT E.A., RUPERT J.A., BEATTY K.D. 1973**. Cytological selection for fertility among triticales. Proc. 4th Int. Wheat Genet . Symp., Univ. of Missouri, Columbia, Mo.
198. **SÁNCHEZ-MONGE E. 1959**. Hexaploid triticale. In Proc. 1st Int. Wheat Genetics Symp., Winnipeg, Manitoba, Canada, 181-194.
199. **SÁNCHEZ-MONGE E. 1973.** Development of triticales in Western Europe. In: R. MacIntyre & M. Campbell,eds. Triticale, Proc. Int. Symp., El Batan, Mexico: 31-39.
200. **SCHLEGEL G., SCHLEGEL R. 1989.** A compendium of reciprocal intervarietal translocations in hexaploid wheat. Genet. Resour. Crop Evol. 37: 163-176.
201. **SCHMOLKE M., MOHLER V., HARTL L., ZELLER F.J., HSAM S.L.K. 2012.** A new powdery mildew resistance allele at the *Pm4* wheat. Mol Breeding 29: 449-456.
202. **SHANER G. 1973.** Evaluation of slow-mildewing resistance of 'Knox' wheat in the field. Phytopathology 63: 867-872.

203. **SHANER G., FINNEY R.E. 1977.** The Effect of Nitrogen Fertilization on the Expression of Slow-Mildewing Resistance in 'Knox' Wheat. Phytophatology 67: 1051-1056.
204. **SHI A.N., LEATH S., MURPHY J.P. 1998.** A major gene for powdery mildew resistance transferred to common wheat from wild einkorn wheat. Phytopathology 88: 144-147.
205. **SCHLEGEL R., KORZUN V. 2013.** Genes, markers and linkage data of rye (*Secale cereale* L.). ^{7th}Updated Inventory, V., 1-111.
206. **SILKOVA O.G., ADONINA I.G., KRASILOVA N.M., SHCHAPOVA A.I., SHUMNY V.K. 2012.** Chromosome Pairing in Wheat–Rye ABDR Hybrids Depends on the Microsporogenesis Pattern. Russ J Genet 48(6), 592-598.
207. **SINGRÜN CH., HSAM S.L.K., HARTL L., ZELLER F.J., MOHLER V. 2003.** Powdery mildew resistance gene *Pm22* in cultivar Virest is a member of the complex *Pm1* locus in common wheat (*Triticum aestivum* L. em Thell.). Theor Appl Genet 106: 1420-1424.
208. **SINGRÜN CH., HSAM S.L., ZELLER F.J., WENZEL G., MOHLER V. 2004.** Localization of a novel recessive powdery mildew resistance gene from common wheat line RD30 in the terminal region of chromosome 7AL Theor Appl Genet 109: 210-214.
209. **SLOTKIN R.K., MARTIENSSEN R. 2007.** Transposable elements and the epigenetic regulation of the genome. Nat Rev Genet 8: 272-285.
210. **SODKIEWICZ, W., APOLINARSKA, B., SODKIEWICZ, T., WIŚNIEWSKA, H. 2011.** Effect of chromosomes of the wheat D genome on traits of hexaploid substitution triticale. Cereal Res Commun 39(3): 445-452.
211. **SOMERS D.J., ISAAC P., EDWARDS K. 2004.** A high-density wheat microsatellite consensus map for bread wheat (*Triticum aestivum* L.) Theor Appl Genet 109: 1105-1114.
212. **SONG K.M., LU P., TANG K.L., OSBORN T.C. 1995.** Rapid genome change in synthetic polyploids of *Brassica* and its implications for poliploid evolution. Proc Natl Acad Sci U.S.A. 92(17): 7719-7723.
213. **SONG W., XIE H., LIU Q., XIE CH., NI Z., YANG T., SUN Q., LIU Z. 2007.** Molecular identification of *Pm12*-carrying introgression lines in wheat using genomic and EST-SSR markers. Euphytica 158: 95-102.
214. **SOURDILLE P., SINGH S., CADALEN T., BROWN-GUEDIRA G.L., GAY G., QI L., GILL B.S., DUFOUR P., MURIGNEUX A., BERNARD M. 2004.** Microsatellite-based deletion bin system for the establishment of genetic-physical map relationships in wheat (*Triticum aestivum* L.). Functional and Integrative Genomics 4: 12-25.
215. **SPIELMEYER W., MCINTOSH R. A., KOLMER J., LAGUDAH E. S. 2005**. Powdery mildew resistance and *Lr34/Yr18* genes for durable resistance to leaf and stripe rust cosegregate at a locus on the short arm of chromosome 7D of wheat. Theor Appl Genet 111: 731-735.

216. **SRICHUMPA P., BRUNNER S., KELLER B., YAHIAOUI N. 2005.** Allelic Series of Four Powdery Mildew Resistance Genes at the *Pm3* Locus in Hexaploid Bread Wheat. Plant Physiol 139: 885-895.
217. **STAM P. 1993.** Construction of integrated genetic linkage maps by means of a new computer package: JOINMAP. Plant J 3: 739-744.
218. **STASKAWICZ B.J. 2001.** Genetics of Plant-Pathogen Interactions Specifying Plant Disease Resistance. Plant Physiol 125: 73-76.
219. **STATSOFT (2006).** Elektroniczny Podręcznik Statystyki PL, Kraków, WEB: http://www.statsoft.pl/textbook/stathome.html.
220. **STĘPIEŃ Ł., CHEŁKOWSKI J., WENZEL G., MOHLER V. 2004.** Combined use of linked markers for genotyping the *Pm1* locus in common wheat. Cell Mol Biol Lett 9: 819-827.
221. **STRZEMBICKA A. 2007.** Występowanie mączniaka prawdziwego (*Blumeria graminis* sp.) na pszenżycie w Polsce. Konferencja Naukowa „Nauka dla hodowli roślin uprawnych". Zakopane, 29.01-02.02.2007, Streszczenia, 42.
222. **SUGIYAMA S., YOSHINO T., HIROSE T., OHTANI T. 2012.** Karyotyping of barley chromosomes by a new fluorescence banding technique combined with scanning probe microscopy. Scanning 34: 186-190.
223. **SZWEYKOWSKA A., SZWEYKOWSKI J. 1998.** BOTANIKA. Tom Drugi. SYSTEMATYKA. Wydawnictwo Naukowe PWN: 507-508.
224. **SUN X.L., LIU D., ZHANG H.Q., HUO N.X., ZHOU R.H. JIA J.Z. 2006.** Identification and mapping of two new genes conferring resistancr to powdery mildew from *Aegilops tauschii* (Coss.) schmal. J Integr Plant Biol 48: 1204-1209.
225. **SZECHYŃSKA-HEBDA M., WĘDZONY M., TYRKA M., CHRUPEK M., CZYCZYŁO-MYSZA I., DUBAS E., ŻUR I., GOLEMIEC E. 2011.** Identifying QTLs for cold-induced resistance to Microdochium nivale in winter triticale. Plant Genetic Resources: Characterization and Utilization 9(2): 296-299.
226. **SZYP-BORKOWSKA I. 2005.** Mapowanie loci cech ilościowych jako nowe narzędzie w hodowli selekcyjnej drzew leśnych. Leśne Prace Badawcze 1: 99-107.
227. **ŠVEC M., MIKLOVICOVA M. 1998.** Structure of populations of wheat powdery mildew (*Erysiphe graminis* DC f.sp. *tritici* Marchal) in Central Europe in 1993–1996: I. Dynamics of virulence. Eur J Plant Pathol 104: 537-544.
228. **TAKEMOTO D., HARDHAM A.R. 2004.** The Cytoskeleton as a Regulator and Target of BioticInteractions in Plants. Plant Physiol 136: 3864-3876.
229. **TANG Z.X., FU S.L., REN Z.L., ZHOU J.P., YAN B.J. ZHANG H.Q. 2008.** Variation of tandem repeat, regulatory element, and promotor regions revealed by wheat-rye amphiploids. Genome 51(6): 399-408.
230. **TARKOWSKI C. 1989**. Biologia pszenżyta. Wyd. Nauk. PWN, Warszawa. 382.

231. **TAYLOR D.R., INGVARSSON P.K. 2003.** Common features of segregation distortion in plants and animals. Genetica 117(1): 27-35.
232. **TE BEEST D.E., PAVELEY N.D., SHAW M.W., VAN DEN BOSCH F. 2008**. Disease–Weather Relationships for Powdery Mildew and Yellow Rust on Winter Wheat. Ecology and Epidemiology, 98(5): 609-607.
233. **THE T.T, MCINTOSH R.A., BENNETT F.G.A. 1979.** Cytogenetical Studies in Wheat. IX. Monosomic Analyses, Telocentric Mapping and Linkage Relationships of Genes *Sr21*, *Pm4* and *Mle*. Aust J Bioi Sci 32: 115-125.
234. **THORDAL-CHRISTENSEN H., ZHANG Z., WEI Y., COLLINGE D.B. 1997.** Subcellular localization of H_2O_2 in plants. H_2O_2 accumulation in papillae and hypersensitive response during the barley-powdery mildew interaction. Plant J 11: 1187-1194.
235. **TIUMIAKOV N. 1930**. Fertility and comparative morphology of the rye-wheat hybrid of balanced type. Proc. USSR Congr. Genet. Plant-Anim Breed 2: 497-508.
236. **TOSA Y., TSUJIMOTO H., OGURA H. 1987.** A gene involved in the resistance of wheat to wheatgrass powdery mildew fungus. Genome 29(6): 850-852.
237. **TOSA Y., TSUJIMOTO H., OGURA H. 1988.** Identification of a gene for resistance to wheatgrass powdery mildew fungus in the common wheat cultivar Chinese Spring. Genome 30(4): 612-614.
238. **TOSA Y., SAKAI K. 1990.** The genetics of resistance of hexaploid wheat to the wheatgrass powdery mildew fungus. Genome 33: 225-230.
239. **TRUJILLO M., KOGEL K-H., HÜCKELHOVEN R. 2004.** Superoxide and hydrogen peroxide play different roles in non-host interactions of cereals and inappropriate *formae specials* of *Blumeria graminis*. Mol Plant-Microbe Interact 17: 304-312.
240. **TSCHERMAK-SEYSENEGG E. 1936**. Wirkliche, Abgeleitete und Fragliche Weizen-Roggen-Bastarde (Triticale-Formen), Wien.
241. **TUCKER D. M., GRIFFEY C. A., LIU S., BROWN-GUEDIRA G., MARSHALL D. S., SAGHAI MAROOF M. A. 2007.** Confirmation of Three Quantitative Trait Loci Conferring Adult Plant Resistance to Powdery Mildew in Two Winter Wheat Populations. Euphytica 155: 1–13.
242. **TYRKA M., BEDNAREK P.T., KILIAN A., WĘDZONY M., HURA T., BAUER E. 2011.** Genetic map of triticale compiling DArT, SSR and AFLP markers. Genome 54(5): 391-401.
243. **WAKULIŃSKI W., ZAMORSKI CZ., NOWICKI B. 2007.** Podatność odmian i linii hodowlanych pszenżyta na porażenie przez *Blumeria graminis* (DC) Speer. Progress in Plant Protection 47(2): 361-365.
244. **WANG C., ZHENG Q., LI H., WANG H., LI B., ZHANG X., XU Y., AN D. 2009**. Molecular cytogenetic characterization of a new T2BL1RS wheat-rye chromosome translocation line resistant to stripe rust and powdery mildew. Plant Dis 93(2): 124-129.

245. **WANG J., LI H., ZHANG L., MENG L. 2012a**. Users' Manual of QTL IciMapping Version 3.2. The Quantitative Genetics Group, Institute of Crop Science, Chinese Academy of Agricultural Sciences (CAAS), Beijing 100081, China, and Genetic Resources Program, International Maize and Wheat Improvement Center (CIMMYT), Apdo. Mexico.
246. **WANG S., BASTEN C. J., ZENG Z.B. 2012b.** Windows QTL Cartographer 2.5. Department of Statistics, North Carolina State University, Raleigh, NC (http://statgen.ncsu.edu/qtlcart/WQTLCart.htm)
247. **WANG X.Y., QI Z.J., MA Z.Q., CHEN P.D., LIU D.J. 2000.** Identyfication of RAPD Markets Tightly linked to Wheat Powdery Mildew Resistance Gene *Pm6*. Acta Genetica Sinica 27(12): 1072-1079.
248. **WANG Z.L., LI L.H., HE Z.H., DUAN X.Y., ZHOU Y.L., CHEN X.M., LILLEMO M., SINGH R.P., WANG H., XIA X.C. 2005.** Seedling and adult plant resistance to powdery mildew in Chinese Bread Wheat Cultivars and Lines. Plant Dis 89: 457-463.
249. **WĄSEK I., RAPACZ M., GOŁĘBIOWSKA-PIKANIA G., WĘDZONY M. 2013.** QTL związane z zimotrwałością pszenżyta (× Triticosecale Wittmack) – wyniki wstępne. Konferencja Naukowa „Nauka dla hodowli i nasiennictwa roślin uprawnych", Zakopane 4-8.02.2013r, 121-122.
250. **WENZL P., LI H., CARLING J., ZHOU M., RAMAN H., PAUL E., HEARNDEN P., MAIER C., XIA L, CAIG V., OVESNÁ J., CAKIR M., POULSEN D., WANG J., RAMAN R., SMITH K.P., MUEHLBAUER G.J., CHALMERS K.J., KLEINHOFS A., HUTTNER E., KILIAN A. 2006.** A high-density consensus map of barley linking DArT markers to SSR, RFLP and STS loci and phenotypic traits. BMC Genomics 7: 206.
251. **WILSON A.S. 1974**. On wheat and rye hybrids. Trans. Proc. Bot. Soc., 12, 286:288.
252. **VAN DER PLANK J.E. 1963**. Plant Diseases, Epidemics and Control. Academic Press, New York, 223-232, 249-259.
253. **VAN OOIJEN J.W. 2004.** MapQTL ® 5, Software for the mapping of quantitative train loci in experimental populations. Kyazma B.V., Wageningen, Netherlands.
254. **VAN OOIJEN J.W. 2006.** JoinMap 4, Software for the calculation of genetic linkage maps in experimental populations. Kyazma B.V., Wageningen, Netherlands, 59.
255. **VAN OOIJEN J.W. 2009.** MapQTL ® 6, Software for the mapping of quantitative trait loci in experimental populations of diploid species. Kyazma B.V., Wageningen, Netherlands, 64.
256. **VIEGAS W., NEVES N., SILVA M., CAPERTA A., MORAIS-CECI´LIO L. 2002**. Nucleolar dominance: a 'David and Goliath' chromatin imprinting process. Cur Genomics 3: 563-576.

257. **VON RÖPENACK E., PARR A., SCHULZE-LEFERT P. 1998.** Structural Analyses and Dynamics of Soluble and Cell Wall-bound Phenolics in a Broad Spectrum Resistance to the Powdery Mildew Fungus in Barley. J Biol Chem 273(15): 9013-9022.
258. **XIAO M., SONG F., JIAO J., WANG X., XU H., LI H. 2013.** Identification of the gene *Pm47* on chromosome 7BS conferring resistance to powdery mildew in the Chinese wheat landrace Hongyanglazi. Theor Appl Genet 126: 1397-1403.
259. **XIE CH., SUN Q., NI Z., YANG T., NEVOE., FAHIMA T. 2003.** Chromosomal location of a *Triticum dicoccoides*-derived powdery mildew resistance gene in common wheat by using microsatellite markers. Theor Appl Genet 106: 341-345.
260. **XIE W., BEN-DAVID R., ZENG B., DINOOR A., XIE C., SUN Q., RO¨DER M.S., FAHOUM A., FAHIMA T. 2011.** Suppressed recombination rate in 6VS/6AL translocation region carrying the *Pm21* locus introgressed from *Haynaldia villosa* into hexaploid wheat. Mol Breeding 29: 399-412.
261. **XIE W., BEN-DAVID R., ZENG B., DISTELFELD A., RÖDER M.S., DINOOR A., FAHIMA T. 2012.** Identification and characterization of a novel powdery mildew resistance gene *PmG3M* derived from wild emmer wheat, *Triticum dicoccoides.* Theor Appl Genet 124: 911-922
262. **XU H., YAO G., XIONG L., YANG L., JIANG Y., FU B., ZHAO W., ZHANG Z., ZHANG C., MA Z. 2008.** Identifcation and mapping of *pm2026*: a recessive powdery mildew resistance gene in an einkorn (*Triticum monococcum* L.) accession. Theor Appl Genet 117, 471-477.
263. **XU W.G., LI C.X., HU L., ZHANG L., ZHANG J.Z., DONG H.B., WANG G.S. 2010.** Molecular mapping of powdery mildew resistance gene *PmHNK* in winter wheat (*Triticum aestivum* L.) cultivar Zhoumai 22. Mol Breeding 26: 31-38.
264. **XU Y., ZHU L., XIAO J., HUANG N., MCCOUCH S.R. 1997.** Chromosomal regions associated with segregation distortion of molecular markers in F2, backcross, doubled haploid, and recombinant inbred populations in rice (*Oryza sativa* L.). Mol Gen Genet 253(5): 535-545.
265. **XUE F., WANG C., LI C., DUAN X., ZHOU Y., ZHAO N., WANG Y., JI W. 2012.** Molecular mapping of a powdery mildew resistance gene in common wheat landrace Baihulu and its allelism with *Pm24*. Theor Appl Genet, DOI 10.1007/s00122-012-1923-6.
266. **YAHIAOUI N., BRUNNER S., KELLER B. 2006**. Rapid generation of new powdery mildew resistance genes after wheat domestication. The Plant Journal 47: 85-98.
267. **YAHIAOUI N., KAUR N., KELLER B. 2009.** Independent evolution of functional Pm3 resistance genes in wild tetraploid wheat and domesticated bread wheat. The Plant Journal 57: 846-856.
268. **YAO G.Q., ZHANG J.L., YANG L.L., XU H.X., JIANG Y.M., XIONG L., ZHANG C.Q., ZHANG Z.Z., MA Z.Q., SORRELLS M.E. 2007.** Genetic mapping of

two powdery mildew resistance genes in einkorn (*Triticum monococcum* L.) accessions. TheorAppl Genet 114: 351-358.

269. **ZELLER F.J., LUTZ J., STEPHAN U. 1993.** Chromosome location of genes for resistance to powdery mildew in common wheat (*Triticum aestivum* L.) 1. *Mlk* and other alleles at the *Pm3* locus. Euphytica 68: 223-229.
270. **ZELLER F.J., KONG L., HARTL L., MOHLER V., HSAM S.L.K. 2002.** Chromosomal location of genes for resistance to powdery mildew in common wheat (*Triticum aestivum* L. em Thell.) 7. Gene *Pm29* in line Pova. Euphytica 123: 187-194.
271. **ZHANG H., GUAN H., LI J., ZHU J., XIE C., ZHOU Y., DUAN X., YANG T., SUN Q., LIU Z. 2010.** Genetic and comparative genomics mapping revealsthat a powdery mildew resistance gene *Ml3D232* originating from wild emmer co-segregates with an NBS-LRR analog in common wheat (*Triticum aestivum* L.). Theor Appl Genet 121: 1613–1621.
272. **ZHANG K., WANG J., ZHANG L., RONG C., ZHAO F., PENG T., LI H., CHENG D., LIU X., QIN H., ZHANG A., TONG Y., WANG D. 2013.** Association Analysis of Genomic Loci Important for Grain Weight Control in Elite Common Wheat Varieties Cultivated with Variable Water and Fertiliser Supply. PLoS ONE 8(3): e57853. doi:10.1371/journal.pone.0057853.
273. **ZHANG X.Q., WANG X.P., ROSS K., HU H., GUSTAFSON J.P. 2001.** Rapid introduction of disease resistance from rye intocommon wheat by anther culture of a 6x triticale 9 nullitetrasomic wheat. Plant Breeding 120: 39-42.
274. **ZHANG Z., HENDERSON C., PERFECT E., CARVER T.L.W., THOMAS B.J., SKAMNIOTI P., GURR S.J. 2005.** Of genes and genomes, Needles and haystacks: *Blumeria graminis* and functionality. Mol Plant Pathol 6(5): 561-575.
275. **ZHOU N., TOOTLE T.L., GLAZEBROOK J. 1999.** Arabidopsis PAD3, a Gene Required for Camalexin Biosynthesis, Encodes a Putative Cytochrome P450 Monooxygenase. The Plant Cell 11: 2419–2428.
276. **ZHOU J., ZHANG H., YANG Z., LI G., HU L., LEI M., LIU CH., ZHANG Y., REN Z. 2012.** Characterization of a new T2DS.2DL-?R translocation triticale ZH-1 with multiple resistance to diseases. Genet Resour Crop Evol 59: 1161-1168.
277. **ZHU Z., ZHOU R., KONG X., DONG Y., JIA J. 2005.** Microsatellite markers linked to 2 powdery mildew resistance genes introgressed from *Triticum carthlicum* accession PS5 into common wheat. Genome 48(4): 585-590.
278. **ZILLINSKY F.J., BORLAUG N. 1971.** Progress in developing triticale as an economic crop. CIMMYT Res. Bull. 17. Mexico, DF, CIMMYT, 27.
279. **ZILLINSKY F.J. 1974**. The development of triticale. Advan In Agron 26, 315-348.
280. **ZILLINSKY F.J. 1985**. Triticale – an update on field, adaptation, and Word production. In R.A. Forsberg, Ed. Triticale, 1-7.

STRONY INTERNETOWE

http://www.coboru.pl
http://www.coboru.pl/Polska/odm_szczegoly.aspx?nrodm=1828
http://www.danko.pl/grenado
http://www.diversityarrays.com/genotypingserv.html
https://www.integratedbreeding.net/supplementary-toolbox/genetic-mapping-and-qtl/icimapping
http://www.rye-gene-map.de
http://www.shigen.nig.ac.jp/wheat/komugi/genes/macgene/supplement2005.pdf.
http://www.statsoft.pl/textbook/stathome.html.

8. STRESZCZENIE

Pszenżyto (X *Triticosecale* Wittmack) jest stabilnym amfiploidem, powstałym w wyniku międzyrodzajowej hybrydyzacji, po której następuje podwojenie chromosomów, formy matecznej gatunku *Triticum* (AABB) oraz formy ojcowskiej gatunku *Secale* (RR). Przez wiele lat pszenżyto było uważane za zboże mało podatne na choroby, jednak w ostatnim 10-leciu nasilenie chorób na pszenżycie zwiększało się. W 2004 roku nastąpiło załamanie odporności pszenżyta na mączniaka, szczególnie u odmiany 'Lamberto'.

Celowym i ekonomicznym sposobem ochrony pszenżyta przed chorobami powodowanymi przez grzyby patogeniczne jest uprawa odmian odpornych. Wykorzystanie narzędzi biologii molekularnej, w tym markerów DNA, umożliwia poznanie genetycznego podłoża odporności pszenżyta na infekcję *Blumeria graminis*, przez co wspomaga selekcję odmian odpornych. Konstrukcja map genetycznych oraz identyfikacja loci cech ilościowych pozwala na lokalizację potencjalnych miejsc w genomie powiązanych z daną cechą.

W niniejszej pracy mapę genetyczną pszenżyta skonstruowano dla dwóch populacji powstałych poprzez skrzyżowanie odmian 'Lamberto' (wrażliwa) oraz 'Grenado' (odporna) w dwóch kierunkach. Wykorzystano systemy markerowe DArT oraz SSR. Ocena fenotypowa, przeprowadzona w stadium siewki oraz rośliny dojrzałej, oparta była na ocenie stopnia porażenia populacji mapującej patogennym grzybem – *Blumeria graminis*. W celu zidentyfikowania rejonów/markerów genomu związanych z odpornością na infekcję wykorzystano analizy: Kruskal-Wallisa, SMA (dla oceny inokulacyjnej) oraz dodatkowo IM oraz CIM (dla oceny polowej).

Wynikiem pracy jest mapa genetyczna dwukierunkowej populacji pszenżyta ozimego, o długości 1 813.6 cM, złożona z 547 markerów DArT oraz 7 markerów SSR. Zidentyfikowane zostały translokacje niehomeologiczne 5BS.3BL oraz 7A.1A. W stadium rośliny dojrzałej zidentyfikowano dwa główne efekty związane z odpornością na *Blumeria graminis* – *Q.Pm.lgl.1R* oraz *Q.Pm.lgl.6R*, wyjaśniające odpowiednio 15% oraz 33.4%. Do istotnych efektów należą także *Q.Pm.lgl.2A2*, *Q.Pm.lgl.3A* oraz *Q.Pm.lgl.1B*. U roślin w stadium siewki zidentyfikowano markery sprzężone z cechą w grupach sprzężeń 1R oraz 6R.

Wytypowano markery znajdujące się w sąsiedztwie opisanych markerów sprzężonych z genami *Pm50* i *Pm4* na chromosomie 2A, oraz *Pm39* na chromosomie 1B. Wskazuje to na możliwe występowanie w dwukierunkowej populacji 'Lamberto' i 'Grenado' w/w genów. Uzyskane wyniki dostarczyły nowych danych na temat wpływu kierunku krzyżowania odmian pszenżyta na dziedziczenie i/lub ekspresję genów.

Informacje dotyczące podłoża genetycznego odporności, w tym rejonów genomu populacji 'Lamberto' i 'Grenado' związanych z odpornością na *Blumeria graminis*, mogą stanowić podstawę do opracowania wydajnego systemu selekcyjnego hodowli roślin odpornych.

9. SUMMARY

Triticale (X *Triticosecale* Wittmack) is an amphiploid stably carrying the genomes of wheat (AABB or AABBDD) and rye (RR). Triticales are the fertile progenies of an intergeneric hybridization between a female parent from the genus *Triticum* and male parent from the genus *Secale*, followed by chromosome doubling. The economic importance of triticale systematically grows thanks to its better performance in less favorable environments. In recent years, resistance to pathogenic fungus – *Blumeria graminis*, that causes powdery mildew, significantly decreased in triticale.

Deliberate and economical way to protect triticale against diseases caused by pathogenic fungi is the cultivation of resistant varieties. The identification of natural sources of resistance and breeding resistant varieties is the most effective way to control powdery mildew disease. Phenotypic selection based on molecular markers linked to genes for resistance can also facilitate resistance breeding. All triticale breeding programs require saturated genetic maps to locate quantitative traits of resistance. Genetic map construction and analysis of quantitative trait loci allows for the location of potential sites in the genome associated with the interesting trait.

In the present study, bidirectional crosses between 'Lamberto' and 'Grenado' as susceptible and resistant parent, respectively, were developed in order to obtain F_2 and F_3 mapping populations. Genetic linkage maps based on genotyping of 'Lamberto' × 'Grenado' (LG) and 'Grenado' × 'Lamberto' (GL) populations with DArT and SSR markers were constructed. Both populations were inoculated and evaluated in controlled conditions and field tests. QTLs were identified by single marker analysis, interval mapping, composite interval mapping analyses and validated by Kruskal-Wallis test.

The result of this study is a genetic map of winter triticale of total length 1 813.6 cM with 554 loci (547 DArT markers and 7 SSR markers). Translocations of chromosomes fragments from different homeologic groups (5BS.3BL and 7A.1A) were identified. Two main, stable QTLs on chromosomes 1R (*Q.Pm.lgl.1R*) and 6R (*Q.Pm.lgl.6R*) were identified, explaining 15% and 33.4% of variation, respectively. Three DArT markers mapped on 6R chromosome (*rPt-398825*, *tPt-513060*, *rPt-411235*) were associated with resistance to powdery mildew. Minor effects in adult plant stage were also identified in 2A2, 3A and 1B linkage groups. The possible occurrence of powdery mildew resistance genes: *Pm4*, *Pm 50* (on chromosome 2A) and *Pm39* (on chromosome 1B) was discussed.

Genomic regions/markers of the bidirectional population 'Lamberto' and 'Grenado' associated with resistance to *Blumeria graminis* constitute a basis for development of efficient selection system.

10. ANEKS

Załącznik nr 1. Charakterystyka markerów molekularnych DArT oraz SSR w populacji F_2 'Lamberto' i 'Grenado'.

Tabela Z.1.1. Zestawienie oznaczeń DArT wykonanych na populacji dwukierunkowej F_2 'Lamberto' i 'Grenado', częstotliwość występowania markerów oraz wyniki analizy segregacji.

Nr	Marker	Lokalizacja chromosomowa	Pozycja na chromosomie (cM)	Liczba alleli[b]					Test Chi[2]	Poziom istotności[a]
				A	B	C	D	M		
1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11
1	*wPt-0196*	1A	0	27	0	88	0	16	0.14	-
2	*wPt-6709*	1A	1.466	0	35	0	95	1	0.26	-
3	*wPt-2527*	1A	2.008	23	0	96	0	12	2.04	-
4	*wPt-6280*	1A	4.334	0	35	0	93	3	0.38	-
5	*wPt-4676*	1A	6.102	24	0	105	0	2	2.81	*
6	*wPt-3198*	1A	8.142	0	35	0	94	2	0.31	--
7	*wPt-4666*	1A	13.672	21	0	102	0	8	4.12	**
8	*wPt-6122*	1A	13.809	21	0	101	0	9	3.95	**
9	*wPt-8068*	2A1	0	0	59	0	68	4	31.18	*******
10	*wPt-6711*	2A1	0.664	0	55	0	67	9	26.24	*******
11	*wPt-0568*	2A1	0.695	0	56	0	69	6	26.14	*******
12	*wPt-7026*	2A1	18.317	0	35	0	81	15	1.66	*
13	*wPt-1657*	2A1	21.053	0	33	0	91	7	0.17	-
14	*wPt-5251*	2A1	30.29	0	34	0	93	4	0.21	-
15	*wPt-8826*	2A1	38.712	44	0	75	0	12	9.10	****
16	*wPt-3244*	2A1	47.315	0	28	0	96	7	0.39	-
17	*wPt-3114*	2A1	54.397	0	33	0	96	2	0.02	-
18	*tPt-8937*	2A1	54.481	0	33	0	95	3	0.04	-
19	*wPt-9302*	2A2	0	0	38	0	84	9	2.46	-
20	*wPt-7649*	2A2	3.214	0	38	0	81	12	3.05	*
21	*wPt-0623*	2A2	3.298	0	39	0	78	14	4.33	**
22	*wPt-9160*	3A	0	30	0	98	0	3	0.17	-
23	*wPt-0398*	3A	0.874	29	0	98	0	4	0.32	-
24	*wPt-3978*	3A	10.447	31	0	94	0	6	0.00	-

Tabela Z.1.1 Kontynuacja

1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11
25	*wPt-1339*	3A	14.825	26	0	87	0	18	0.24	-
26	*wPt-4725*	3A	36.688	23	0	105	0	3	3.38	*
27	*wPt-2127*	3A	40.367	25	0	95	0	11	1.11	-
28	*wPt-3697*	3A	42.991	28	0	90	0	13	0.10	-
29	*wPt-4620*	3A	43.067	27	0	97	0	7	0.69	-
30	*wPt-2202*	3A	58.981	0	38	0	86	7	2.11	-
31	*wPt-11619*	3A	61.426	0	35	0	92	4	0.44	-
32	*wPt-6728*	4A	0	31	0	96	0	4	0.02	-
33	*wPt-9860*	4A	0.615	0	35	0	95	1	0.26	-
34	*wPt-0817*	4A	0.634	0	35	0	95	1	0.26	-
35	*wPt-1091*	4A	2.168	29	0	97	0	5	0.26	-
36	*wPt-3810*	4A	2.554	29	0	95	0	7	0.17	-
37	*wPt-5572*	4A	4.674	0	34	0	94	3	0.17	-
38	*wPt-1375*	4A	4.7	0	34	0	92	5	0.26	-
39	*wPt-6995*	4A	4.712	0	34	0	94	3	0.17	-
40	*wPt-1642*	4A	5.051	0	34	0	93	4	0.21	-
41	*wPt-9000*	4A	5.46	0	35	0	94	2	0.31	-
42	*tPt-513019*	4A	6.189	33	0	90	0	8	0.22	-
43	*wPt-5096*	5A	0	28	0	103	0	0	0.92	-
44	*tPt-4184*	5A	16.962	32	0	96	0	3	0.00	-
45	*tPt-6495*	5A	20.168	37	0	92	0	2	0.93	-
46	*wPt-4270*	6A1	0	34	0	78	0	19	1.71	-
47	*wPt-8443*	6A1	1.012	39	0	66	0	26	8.26	*******
48	*wPt-9832*	6A1	4.963	0	30	0	88	13	0.01	-
49	*tPt-0877*	6A1	11.57	30	0	97	0	4	0.13	-
50	*wPt-9584*	6A1	16.059	0	36	0	84	11	1.60	-
51	*wPt-3965*	6A1	20.479	27	0	100	0	4	0.95	-
52	*wPt-3524*	6A1	23.716	0	32	0	97	2	0.00	-
53	*wPt-0689*	6A	24.659	0	31	0	99	1	0.09	-
54	*wPt-7027*	6A1	24.777	0	31	0	96	4	0.02	-
55	*wPt-9679*	6A1	24.922	0	31	0	100	0	0.12	-
56	*tPt-2833*	6A1	25.025	0	31	0	99	1	0.09	-

Tabela Z.1.1 Kontynuacja

1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11
57	*wPt-5652*	6A1	25.147	0	31	0	93	7	0.00	-
58	*wPt-6904*	6A1	27.504	32	0	96	0	3	0.00	-
59	*wPt-2822*	6A1	32.301	0	34	0	92	5	0.26	-
60	*wPt-7623*	6A1	34.865	27	0	99	0	5	0.86	-
61	*wPt-7663*	6A1	36.197	0	33	0	97	1	0.01	-
62	*wPt-2582*	6A2	0	0	33	0	94	4	0.07	-
63	*wPt-4445*	6A2	4.793	29	0	86	0	16	0.00	-
64	*wPt-9976*	6A2	6.622	29	0	82	0	20	0.08	-
65	*wPt-11612*	6A2	10.136	0	33	0	91	7	0.17	-
66	*tPt-7761*	6A2	19.152	0	41	0	79	11	5.38	**
67	*tPt-3786*	6A2	26.327	0	33	0	87	11	0.40	-
68	*wPt-8954*	6A2	28.664	39	0	77	0	15	4.60	**
69	*wPt-7775*	6A2	32.631	0	32	0	98	1	0.01	-
70	*wPt-3964*	7A/1A	0	0	18	0	106	7	7.27	***
71	*tPt-513474*	7A/1A	0.641	0	17	0	104	10	7.74	***
72	*wPt-4748*	7A/1A	1.202	0	16	0	111	4	10.42	****
73	*tPt-514247*	7A/1A	5.368	41	0	73	0	17	7.31	***
74	*wPt-9207*	7A/1A	11.801	0	31	0	100	0	0.12	-
75	*wPt-2044*	7A/1A	16.475	0	30	0	88	13	0.01	-
76	*rPt-4199*	7A/1A	17.093	0	27	0	86	18	0.07	-
77	*wPt-3561*	7A/1A	24.385	0	33	0	91	7	0.17	-
78	*wPt-6447*	7A/1A	30.541	31	0	79	0	21	0.59	-
79	*wPt-2523*	7A/1A	40.686	0	33	0	97	1	0.01	-
80	*wPt-8192*	7A/1A	43.506	35	0	87	0	9	0.89	-
81	*wPt-9496*	7A/1A	44.571	0	36	0	95	0	0.43	-
82	*wPt-0002*	7A/1A	46.194	34	0	88	0	9	0.54	-
83	*wPt-3572*	7A/1A	47.415	0	35	0	88	8	0.78	-
84	*wPt-8418*	7A/1A	48.927	33	0	98	0	0	0	-
85	*wPt-5590*	7A/1A	48.961	33	0	94	0	4	0.07	-
86	*wPt-0744*	7A/1A	49	33	0	95	0	3	0.04	-
87	*wPt-2368*	7A/1A	50.145	0	36	0	94	1	0.5	-
88	*wPt-4172*	7A/1A	53.08	34	0	93	0	4	0.21	-

Tabela Z.1.1 Kontynuacja

1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11
89	*wPt-6273*	7A/1A	54.985	38	0	81	0	12	3.05	*
90	*wPt-3836*	7A/1A	56.18	34	0	90	0	7	0.39	-
91	*wPt-0393*	7A/1A	59.467	0	34	0	95	2	0.13	-
92	*wPt-6668*	7A/1A	60.803	37	0	85	0	9	1.85	-
93	*wPt-1441*	7A/1A	63.229	0	34	0	97	0	0.06	-
94	*wPt-4835*	7A/1A	70.641	31	0	83	0	17	0.29	-
95	*tPt-512944*	7A/1A	72.6	0	31	0	94	6	0	-
96	*wPt-4126*	7A/1A	97.133	0	30	0	90	11	0	-
97	*wPt-8961*	7A/1A	104.366	0	28	0	88	15	0.05	-
98	*wPt-2208*	7A/1A	107.776	0	31	0	88	12	0.07	-
99	*tPt-512820*	7A/1A	132.763	0	39	0	88	4	2.21	-
100	*wPt-1310*	7A/1A	133.564	33	0	76	0	22	1.62	-
101	*wPt-6853*	7A/1A	133.786	30	0	91	0	10	0	-
102	*wPt-4489*	7A	0	31	0	87	0	13	0.10	-
103	*wPt-1958*	7A	13.769	32	0	94	0	5	0.01	-
104	*wPt-7947*	7A	13.861	0	44	0	82	5	6.61	**
105	*wPt-2501*	7A	13.861	0	43	0	83	5	5.60	**
106	*wPt-0745*	7A	13.99	32	0	95	0	4	0.00	-
107	*wPt-5533*	7A	17.723	0	38	0	92	1	1.24	-
108	*wPt-7919*	7A	17.791	0	38	0	92	1	1.24	-
109	*wPt-7763*	7A	17.818	0	39	0	90	2	1.88	-
110	*wPt-0494*	7A	18.597	0	38	0	90	3	1.50	-
111	*wPt-1116*	1B	0	0	39	0	81	11	3.60	*
112	*wPt-1139*	1B	1.642	0	35	0	83	13	1.37	-
113	*wPt-3176*	1B	8.086	0	31	0	100	0	0.12	-
114	*wPt-0655*	1B	8.253	0	31	0	97	3	0.04	-
115	*wPt-4366*	1B	8.337	0	31	0	100	0	0.12	-
116	*tPt-5675*	1B	8.448	0	31	0	100	0	0.12	-
117	*wPt-7593*	1B	11.429	39	0	86	0	6	2.56	-
118	*wPt-5740*	1B	12.112	0	34	0	90	7	0.39	-
119	*wPt-4343*	1B	13.147	0	33	0	90	8	0.22	-
120	*wPt-2575*	1B	13.566	40	0	81	0	10	4.19	**

Tabela Z.1.1 Kontynuacja

1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11
121	*wPt-7371*	1B	15.923	0	30	0	87	14	0.03	-
122	*wPt-0966*	1B	17.511	42	0	80	0	9	5.78	**
123	*wPt-9490*	1B	25.989	47	0	72	0	12	13.34	*******
124	*wPt-8267*	1B	30.736	41	0	75	0	15	6.62	**
125	*wPt-7094*	1B	32.622	39	0	81	0	11	3.60	*
126	*wPt-2540*	1B	32.794	40	0	84	0	7	3.48	*
127	*wPt-8320*	1B	33.573	40	0	81	0	10	4.19	**
128	*wPt-2751*	1B	34.073	41	0	85	0	5	3.82	*
129	*wPt-9524*	1B	34.225	41	0	88	0	2	3.17	*
130	*wPt-2859*	1B	34.657	41	0	78	0	12	5.67	**
131	*wPt-2075*	1B	36.23	44	0	70	0	17	11.24	******
132	*wPt-7905*	1B	36.39	42	0	76	0	13	7.06	***
133	*wPt-7359*	1B	40.541	39	0	75	0	17	5.16	**
134	*wPt-11939*	1B	40.903	43	0	81	0	7	6.19	**
135	*tPt-513967*	1B	45.827	46	0	75	0	10	10.93	*****
136	*tPt-5249*	1B	48.046	0	31	0	97	3	0.04	-
137	*wPt-0725*	1B	59.029	39	0	82	0	10	3.37	*
138	*wPt-2706*	1B	77.423	0	28	0	102	1	0.83	-
139	*wPt-5562*	1B	78.87	0	28	0	102	1	0.83	-
140	*wPt-2744*	1B	80.516	0	28	0	103	0	0.92	-
141	*wPt-7242*	1B	82.127	0	28	0	101	2	0.75	-
142	*wPt-5385*	1B	82.127	0	28	0	103	0	0.92	-
143	*tPt-513046*	1B	82.127	35	0	76	0	20	2.53	*
144	*wPt-3451*	1B	86.993	37	0	82	0	12	2.36	-
145	*wPt-1248*	1B	101.651	0	34	0	89	8	0.46	-
146	*wPt-6690*	1B	108.705	0	36	0	88	7	1.08	-
147	*wPt-8280*	1B	108.762	0	36	0	87	8	1.20	-
148	*wPt-0705*	1B	111.157	0	34	0	90	7	0.39	-
149	*wPt-3579*	1B	111.333	0	34	0	96	1	0.09	-
150	*wPt-5195*	2B1	0	0	39	0	83	9	3.16	*
151	*wPt-8479*	2B1	0.332	0	35	0	85	11	1.11	-
152	*rPt-398598*	2B1	10.242	0	33	0	87	11	0.40	-

Tabela Z.1.1 Kontynuacja

1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11
153	*tPt-4602*	2B1	11.693	35	0	81	0	15	1.66	-
154	*tPt-1663*	2B1	14.532	0	29	0	94	8	0.13	-
155	*tPt-513188*	2B1	15.887	35	0	84	0	12	1.24	-
156	*tPt-4246*	2B1	17.984	0	30	0	95	6	0.07	-
157	*wPt-2106*	2B1	22.507	32	0	82	0	17	0.57	-
158	*wPt-1964*	2B1	43.355	29	0	89	0	13	0.01	-
159	*rPt-509730*	2B1	46.496	29	0	84	0	18	0.03	-
160	*wPt-4125*	2B1	83.789	33	0	92	0	6	0.13	-
161	*wPt-7757*	2B1	83.884	33	0	92	0	6	0.13	-
162	*wPt-5672*	2B1	83.984	34	0	89	0	8	0.46	-
163	*wPt-6192*	2B1	84.049	33	0	92	0	6	0.13	-
164	*wPt-5556*	2B1	84.098	38	0	92	0	1	1.24	-
165	*tPt-9065*	2B1	101.051	0	34	0	86	11	0.71	-
166	*wPt-6174*	2B1	103.902	0	33	0	94	4	0.07	-
167	*wPt-8548*	2B1	103.97	0	33	0	95	3	0.04	-
168	*wPt-2117*	2B1	104.043	0	33	0	94	4	0.07	-
169	*wPt-0694*	2B2	0	0	42	0	87	2	3.93	**
170	*wPt-3755*	2B2	0.821	0	44	0	80	7	7.27	***
171	*wPt-0697*	2B2	2.21	25	0	99	0	7	1.55	-
172	*wPt-1127*	2B2	7.424	0	40	0	81	10	4.19	**
173	*wPt-2899*	2B2	13.108	34	0	85	0	12	0.81	-
174	*wPt-4223*	2B2	15.469	0	42	0	81	8	5.49	**
175	*wPt-9190*	2B2	19.113	0	42	0	72	17	8.53	****
176	*wPt-1068*	2B2	21.435	0	40	0	86	5	3.06	*
177	*wPt-3109*	2B2	41.514	34	0	75	0	22	2.23	-
178	*wPt-9812*	2B2	42.056	0	37	0	92	2	0.93	-
179	*wPt-4166*	2B2	42.48	34	0	87	0	10	0.62	-
180	*wPt-8284*	3B1	0	6	0	117	0	8	26.56	*******
181	*tPt-1366*	3B1	5.692	0	52	0	78	1	15.6	*******
182	*wPt-4209*	3B1	14.579	0	59	0	61	11	37.38	*******
183	*wPt-6973*	3B1	22.042	0	52	0	79	0	15.09	******
184	*wPt-8356*	3B1	23.206	30	0	97	0	4	0.13	-

Tabela Z.1.1 Kontynuacja

1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11
185	*wPt-1159*	3B1	26.007	0	46	0	79	6	9.28	****
186	*wPt-6802*	3B1	33.158	37	0	86	0	8	1.69	-
187	*wPt-1306*	3B2	0	0	23	0	102	6	2.9	*
188	*wPt-7514*	3B2	1.516	49	0	63	0	19	21	*******
189	*wPt-9488*	3B2	3.888	0	27	0	104	0	1.35	-
190	*wPt-9989*	3B2	4.086	0	27	0	104	0	1.35	-
191	*wPt-0343*	3B2	5.85	0	28	0	98	5	0.52	-
192	*wPt-7158*	3B2	8.647	46	0	78	0	7	9.68	****
193	*wPt-3480*	3B2	12.733	0	27	0	95	9	0.54	-
194	*wPt-9786*	3B2	13.091	0	27	0	97	7	0.69	-
195	*wPt-7705*	3B2	13.393	0	27	0	98	6	0.77	-
196	*wPt-8959*	3B2	15.352	0	29	0	99	3	0.38	-
197	*wPt-3342*	3B2	18.244	46	0	62	0	23	17.83	*******
198	*wPt-4991*	3B2	19.936	0	31	0	81	19	0.43	-
199	*tPt-7209*	3B2	22.392	47	0	82	0	2	8.99	****
200	*wPt-5943*	3B2	22.652	47	0	83	0	1	8.63	****
201	*wPt-9368*	3B2	23.384	0	25	0	105	1	2.31	-
202	*wPt-8021*	3B2	23.4	0	25	0	104	2	2.17	-
203	*wPt-2391*	3B2	23.407	0	25	0	104	2	2.17	-
204	*wPt-6956*	3B2	23.682	48	0	82	0	1	9.86	****
205	*wPt-4280*	4B	0	0	42	0	89	0	3.48	*
206	*tPt-513652*	4B	0.042	0	42	0	88	1	3.70	*
207	*tPt-513338*	4B	0.091	0	42	0	86	3	4.17	**
208	*wPt-1272*	4B	0.171	0	42	0	89	0	3.48	*
209	*wPt-1046*	4B	21.92	35	0	86	0	10	0.99	-
210	*wPt-9393*	4B	47.688	27	0	94	0	10	0.47	-
211	*tPt-5519*	4B	48.658	29	0	90	0	12	0.03	-
212	*wPt-6149*	4B	72.455	0	30	0	92	9	0.01	-
213	*wPt-8796*	4B	81.278	0	33	0	97	1	0.01	-
214	*wPt-6209*	4B	82.721	0	35	0	93	3	0.38	-
215	*wPt-3605*	4B	109.223	0	36	0	87	8	1.20	-
216	*wPt-5265*	4B	140.439	35	0	89	0	7	0.69	-

Tabela Z.1.1 Kontynuacja

1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11
217	*wPt-0498*	5B1	0	38	0	86	0	7	2.11	-
218	*wPt-2607*	5B1	18.569	48	0	73	0	10	13.89	******
219	*wPt-8106*	5B1	19.977	0	24	0	101	6	2.24	-
220	*wPt-4936*	5B1	25.353	42	0	85	0	4	4.41	**
221	*wPt-5792*	5B1	30.582	0	20	0	107	4	5.8	**
222	*wPt-5514*	5B1	31.685	0	21	0	106	4	4.85	**
223	*tPt-0228*	5B1	54.432	0	17	0	97	17	6.19	**
224	*wPt-5175*	5B1	55.283	42	0	88	0	1	3.7	*
225	*wPt-2992*	5B1	55.291	38	0	85	0	8	2.28	-
226	*wPt-5346*	5B1	55.299	40	0	85	0	6	3.27	*
227	*wPt-5914*	5B1	55.322	43	0	75	0	13	8.24	****
228	*wPt-6348*	5B1	55.921	43	0	68	0	20	11.17	*****
229	*wPt-0208*	5B1	56.612	45	0	83	0	3	7.04	***
230	*wPt-9569*	5B1	57.604	0	18	0	109	4	7.94	****
231	*wPt-1465*	5B1	57.894	44	0	75	0	12	9.1	****
232	*wPt-5120*	5B1	59.536	0	18	0	102	11	6.4	**
233	*wPt-3461*	5B1	64.645	43	0	86	0	2	4.78	**
234	*wPt-3844*	5B1	64.695	43	0	86	0	2	4.78	**
235	*wPt-4996*	5B1	64.771	43	0	84	0	4	5.31	**
236	*wPt-3289*	5B1	70.704	44	0	81	0	6	6.94	***
237	*wPt-0643*	5B2	0	31	0	95	0	5	0.01	-
238	*wPt-7400*	5B2	0.496	0	37	0	93	1	0.83	-
239	*wPt-1110*	5B2	0.5	0	37	0	93	1	0.83	-
240	*wPt-6048*	5B2	0.504	0	37	0	94	0	0.74	-
241	*wPt-6910*	5B2	0.508	0	37	0	93	1	0.83	-
242	*tPt-513453*	5B2	0.512	0	37	0	93	1	0.83	-
243	*tPt-6128*	5B2	0.878	32	0	86	0	13	0.28	-
244	*wPt-9406*	6B	0	0	37	0	93	1	0.83	-
245	*wPt-6154*	6B	0.042	0	36	0	90	5	0.86	-
246	*wPt-4031*	6B	0.076	0	37	0	93	1	0.83	-
247	*wPt-3800*	6B	0.714	30	0	91	0	10	0.00	-
248	*wPt-6293*	6B	0.84	0	35	0	95	1	0.26	-

Tabela Z.1.1 Kontynuacja

1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11
249	*tPt-513738*	6B	1.882	30	0	94	0	7	0.04	-
250	*wPt-1085*	6B	2.069	0	36	0	85	10	1.46	-
251	*wPt-4678*	6B	4.154	30	0	100	0	1	0.26	-
252	*wPt-8239*	6B	6.247	30	0	100	0	1	0.26	-
253	*wPt-0882*	6B	8.229	30	0	98	0	3	0.17	-
254	*wPt-8814*	6B	19.195	0	32	0	98	1	0.01	-
255	*wPt-4218*	6B	49.279	0	36	0	90	5	0.86	-
256	*wPt-6292*	6B	49.489	0	36	0	88	7	1.08	-
257	*wPt-2400*	6B	52.435	0	38	0	83	10	2.65	-
258	*tPt-513775*	6B	53.443	0	38	0	76	17	4.22	**
259	*wPt-9195*	6B	56.083	0	34	0	89	8	0.46	-
260	*wPt-4742*	6B	56.873	0	35	0	94	2	0.31	-
261	*wPt-7540*	6B	57.942	37	0	87	0	7	1.55	-
262	*wPt-6247*	6B	60.746	0	36	0	92	3	0.67	-
263	*wPt-9659*	6B	62.748	38	0	86	0	7	2.11	-
264	*tPt-1723*	6B	65.759	0	37	0	83	11	2.18	-
265	*wPt-7426*	6B	70.722	42	0	78	0	11	6.40	**
266	*wPt-8183*	6B	74.93	0	37	0	94	0	0.74	-
267	*tPt-513954*	6B	75.247	0	36	0	93	2	0.58	-
268	*wPt-2000*	6B	75.762	0	37	0	93	1	0.83	-
269	*wPt-2424*	6B	76.19	0	37	0	92	2	0.93	-
270	*tPt-513403*	6B	78.841	35	0	88	0	8	0.78	-
271	*wPt-6160*	6B	78.99	34	0	90	0	7	0.39	-
272	*wPt-2479*	6B	85.193	37	0	86	0	8	1.69	-
273	*wPt-2587*	6B	85.231	37	0	92	0	2	0.93	-
274	*tPt-3689*	6B	102.897	32	0	82	0	17	0.57	-
275	*tPt-9132*	6B	122.336	0	39	0	87	5	2.38	-
276	*wPt-1532*	6B	124.36	33	0	77	0	21	1.47	-
277	*wPt-1541*	6B	140.324	34	0	90	0	7	0.39	-
278	*wPt-4662*	6B	154.961	0	43	0	87	1	4.52	**
279	*wPt-8551*	6B	154.988	0	43	0	84	4	5.32	**
280	*wPt-5885*	6B	155.137	0	42	0	86	3	4.17	**

Tabela Z.1.1 Kontynuacja

1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11
281	*wPt-9256*	6B	156.985	0	42	0	89	0	3.48	*
282	*wPt-9241*	6B	158.359	0	40	0	91	0	2.14	-
283	*wPt-1761*	6B	158.405	0	40	0	91	0	2.14	-
284	*tPt-514268*	6B	158.47	0	40	0	87	4	2.86	*
285	*wPt-3058*	7B1	0	0	51	0	70	10	18.98	*******
286	*wPt-8989*	7B1	14.169	0	35	0	92	4	0.44	-
287	*wPt-0217*	7B1	16.962	0	32	0	99	0	0.02	-
288	*wPt-6104*	7B1	17.035	0	32	0	99	0	0.02	-
289	*wPt-9880*	7B1	17.123	0	32	0	99	0	0.02	-
290	*wPt-3190*	7B1	19.644	0	34	0	80	17	1.42	-
291	*wPt-7295*	7B1	22.468	0	32	0	99	0	0.02	-
292	*wPt-4038*	7B1	24.461	34	0	94	0	3	0.17	-
293	*wPt-4743*	7B1	24.518	34	0	95	0	2	0.13	-
294	*wPt-5585*	7B1	24.549	34	0	96	0	1	0.09	-
295	*wPt-4820*	7B1	25.19	0	31	0	88	12	0.07	-
296	*wPt-4863*	7B2	0	0	43	0	74	14	8.62	****
297	*wPt-1723*	7B2	22.463	42	0	86	0	3	4.17	**
298	*wPt-7318*	7B2	22.822	0	28	0	100	3	0.67	-
299	*wPt-8283*	7B2	23.627	42	0	88	0	1	3.70	*
300	*wPt-11598*	7B2	46.632	0	41	0	80	10	5.09	**
301	*wPt-6463*	7B2	53.258	37	0	84	0	10	2.01	-
302	*wPt-4025*	7B2	58.063	36	0	80	0	15	2.25	-
303	*wPt-1149*	7B2	58.651	0	40	0	86	5	3.06	*
304	*wPt-9467*	7B2	74.83	0	60	0	56	15	44.18	*******
305	*rPt-390103*	1R	8.964	0	41	0	75	15	6.62	**
306	*rPt-507968*	1R	15.94	21	0	102	0	8	4.12	**
307	*rPt-506976*	1R	19.844	0	47	0	75	9	11.90	*****
308	*rPt-505204*	1R	22.78	21	0	105	0	5	4.67	**
309	*rPt-411063*	1R	26.446	0	47	0	79	5	10.17	****
310	*rPt-4471*	1R	31.04	19	0	105	0	7	6.19	**
311	*rPt-401410*	1R	31.836	0	47	0	76	8	11.45	*****
312	*rPt-506135*	1R	37.89	19	0	106	0	6	6.40	**

Tabela Z.1.1 Kontynuacja

1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11
313	*rPt-402007*	1R	46.467	0	47	0	75	9	11.90	*****
314	*rPt-507719*	1R	46.471	0	47	0	79	5	10.17	****
315	*rPt-389887*	1R	60.927	0	41	0	82	8	4.56	**
316	*tPt-513067*	1R	62.758	0	46	0	75	10	10.93	*****
317	*rPt-505614*	1R	62.803	0	46	0	74	11	11.38	*****
318	*rPt-506896*	1R	63.697	21	0	101	0	9	3.95	**
319	*rPt-401574*	1R	65.496	0	44	0	85	2	5.71	**
320	*rPt-505853*	1R	67.062	0	47	0	84	0	8.27	****
321	*rPt-399769*	1R	67.07	0	47	0	80	4	9.77	****
322	*rPt-1040*	1R	67.777	18	0	111	0	2	8.40	****
323	*rPt-389363*	1R	69.938	0	44	0	84	3	6.00	**
324	*rPt-505936*	1R	74.306	20	0	91	0	20	2.89	*
325	*rPt-507504*	1R	78.776	20	0	101	0	10	4.63	**
326	*rPt-389670*	1R	83.124	0	46	0	82	3	8.17	****
327	*rPt-400883*	1R	83.193	0	47	0	83	1	8.63	****
328	*rPt-402101*	1R	83.307	0	47	0	83	1	8.63	****
329	*rPt-400535*	1R	83.372	0	47	0	82	2	8.99	****
330	*rPt-505577*	1R	84.871	0	47	0	77	7	11.01	*****
331	*rPt-399397*	1R	85.808	0	45	0	82	4	7.37	***
332	*rPt-389501*	1R	86.744	0	47	0	83	1	8.63	****
333	*rPt-506136*	1R	89.14	0	47	0	80	4	9.77	****
334	*rPt-390177*	1R	91.765	25	0	96	0	10	1.21	-
335	*rPt-507990*	1R	93.961	0	48	0	81	2	10.26	****
336	*rPt-506340*	1R	132.956	0	45	0	78	8	8.80	****
337	*rPt-509540*	1R	134.204	0	43	0	76	12	7.87	***
338	*tPt-514285*	1R	134.706	0	44	0	84	3	6.00	**
339	*rPt-389803*	1R	136.636	0	46	0	79	6	9.28	****
340	*rPt-401418*	1R	137.429	0	47	0	83	1	8.63	****
341	*rPt-398831*	1R	139.577	0	46	0	76	9	10.50	****
342	*rPt-399803*	1R	140.525	0	45	0	86	0	6.11	**
343	*rPt-401195*	1R	140.541	0	45	0	82	4	7.37	***
344	*rPt-507452*	1R	140.885	0	45	0	85	1	6.41	**

Tabela Z.1.1 Kontynuacja

1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11
345	*wPt-9317*	1R	141.149	0	42	0	79	10	6.09	**
346	*rPt-507103*	1R	141.165	0	46	0	84	1	7.48	***
347	*rPt-400290*	1R	141.18	0	45	0	83	3	7.04	***
348	*rPt-507848*	1R	141.191	0	46	0	83	2	7.82	***
349	*rPt-506299*	1R	141.222	0	46	0	83	2	7.82	***
350	*tPt-9878*	1R	143.642	26	0	97	0	8	0.98	-
351	*rPt-508726*	1R	144.84	0	39	0	73	19	5.76	**
352	*rPt-506878*	1R	146.374	0	47	0	82	2	8.99	****
353	*rPt-401363*	1R	147.83	21	0	96	0	14	3.10	*
354	*rPt-400476*	1R	150.271	28	0	97	0	6	0.45	-
355	*rPt-400397*	1R	152.054	29	0	94	0	8	0.13	-
356	*rPt-509435*	4R	0	0	42	0	79	10	6.09	**
357	*rPt-505608*	4R	3.813	41	0	89	0	1	2.96	*
358	*tPt-513580*	4R	6.809	0	33	0	89	9	0.27	-
359	*wPt-4487*	4R	11.24	40	0	89	0	2	2.48	-
360	*rPt-2478*	4R	12.53	40	0	87	0	4	2.86	*
361	*rPt-505625*	4R	15.572	0	13	0	94	24	9.42	****
362	*rPt-507026*	4R	18.17	41	0	80	0	10	5.09	**
363	*rPt-506134*	4R	19.27	40	0	90	0	1	2.31	-
364	*rPt-389465*	4R	22.898	0	29	0	89	13	0.01	-
365	*tPt-3067*	4R	24.547	41	0	81	0	9	4.82	**
366	*rPt-401589*	4R	25.494	0	30	0	97	4	0.13	-
367	*rPt-389763*	4R	25.826	40	0	90	0	1	2.31	-
368	*rPt-402590*	4R	25.96	40	0	81	0	10	4.19	**
369	*rPt-508693*	4R	26.242	40	0	90	0	1	2.31	-
370	*rPt-399305*	4R	27.242	0	32	0	92	7	0.04	-
371	*tPt-513858*	4R	27.407	0	32	0	93	6	0.02	-
372	*rPt-401029*	4R	28.938	39	0	73	0	19	5.76	**
373	*rPt-505802*	4R	30.232	0	32	0	90	9	0.10	-
374	*rPt-506829*	4R	30.262	0	31	0	90	10	0.02	-
375	*rPt-508131*	4R	31.69	40	0	79	0	12	4.71	**
376	*rPt-399323*	4R	33.443	0	32	0	91	8	0.07	-

Tabela Z.1.1 Kontynuacja

1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11
377	*tPt-513004*	4R	36.469	0	31	0	88	12	0.07	-
378	*wPt-8171*	4R	36.748	0	27	0	92	12	0.34	-
379	*rPt-7987*	4R	39.503	40	0	91	0	0	2.14	-
380	*rPt-507289*	4R	41.886	0	32	0	91	8	0.07	-
381	*rPt-401544*	4R	44.159	40	0	84	0	7	3.48	*
382	*rPt-505244*	4R	44.487	0	32	0	90	9	0.10	-
383	*rPt-506686*	4R	44.487	0	32	0	88	11	0.18	-
384	*rPt-401048*	4R	44.846	41	0	86	0	4	3.59	*
385	*tPt-1348*	4R	47.922	0	33	0	96	2	0.02	-
386	*rPt-8283*	4R	48.159	40	0	90	0	1	2.31	-
387	*rPt-506089*	4R	48.25	0	31	0	87	13	0.10	-
388	*rPt-401280*	4R	48.327	0	32	0	93	6	0.02	-
389	*wPt-7445*	4R	51.093	39	0	90	0	2	1.88	-
390	*rPt-402443*	4R	51.978	0	32	0	93	6	0.02	-
391	*rPt-506077*	4R	56.806	40	0	81	0	10	4.19	**
392	*rPt-400634*	4R	66.709	0	11	0	98	22	12.92	******
393	*rPt-506618*	4R	66.972	39	0	87	0	5	2.38	-
394	*rPt-389827*	4R	66.991	39	0	84	0	8	2.95	*
395	*rPt-508454*	4R	67.01	40	0	87	0	4	2.86	*
396	*rPt-411281*	4R	67.01	39	0	89	0	3	2.04	-
397	*rPt-400949*	4R	76.303	0	11	0	101	19	13.76	******
398	*rPt-389383*	4R	97.141	34	0	95	0	2	0.13	-
399	*rPt-509404*	4R	101.807	0	28	0	99	4	0.59	-
400	*rPt-505489*	4R	102.013	0	22	0	93	16	2.11	-
401	*rPt-509402*	4R	102.387	0	28	0	96	7	0.39	-
402	*rPt-509321*	4R	104.017	34	0	84	0	13	0.92	-
403	*rPt-390419*	4R	104.227	0	29	0	84	18	0.03	-
404	*tPt-4576*	4R	108.643	34	0	88	0	9	0.54	-
405	*rPt-506416*	4R	112.495	0	31	0	92	8	0.00	-
406	*rPt-401286*	4R	112.964	32	0	96	0	3	0.00	-
407	*rPt-505225*	4R	113.193	32	0	98	0	1	0.01	-
408	*rPt-389618*	4R	113.285	32	0	99	0	0	0.02	-

Tabela Z.1.1 Kontynuacja

1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11
409	*rPt-401945*	4R	113.472	32	0	98	0	1	0.01	-
410	*rPt-399521*	4R	113.724	32	0	93	0	6	0.02	-
411	*tPt-0429*	4R	116.532	0	30	0	93	8	0.02	-
412	*rPt-390411*	4R	117.456	32	0	92	0	7	0.04	-
413	*rPt-410866*	4R	117.624	0	30	0	90	11	0.00	-
414	*rPt-509344*	4R	119.682	36	0	83	0	12	1.75	-
415	*rPt-506862*	4R	121.962	0	29	0	95	7	0.17	-
416	*rPt-507481*	4R	122.703	35	0	88	0	8	0.78	-
417	*rPt-401699*	4R	123.195	34	0	76	0	21	2.05	-
418	*tPt-4626*	4R	123.691	34	0	91	0	6	0.32	-
419	*rPt-508016*	4R	123.729	34	0	83	0	14	1.03	-
420	*rPt-508284*	4R	123.752	34	0	90	0	7	0.39	-
421	*rPt-401323*	4R	124.241	33	0	97	0	1	0.01	-
422	*rPt-389414*	4R	125.359	0	33	0	83	15	0.74	-
423	*rPt-508446*	4R	125.398	0	33	0	80	18	1.06	-
424	*rPt-509308*	4R	126.883	0	33	0	86	12	0.47	-
425	*rPt-2841*	4R	127.673	33	0	89	0	9	0.27	-
426	*rPt-411344*	4R	130.722	0	32	0	96	3	0.00	-
427	*rPt-505852*	5R	0	0	16	0	105	10	8.95	****
428	*rPt-505737*	5R	8.073	26	0	83	0	22	0.08	-
429	*rPt-390151*	5R	12.101	0	36	0	82	13	1.91	-
430	*rPt-505700*	5R	13.407	0	34	0	91	6	0.32	-
431	*rPt-505436*	5R	17.573	31	0	86	0	14	0.14	-
432	*rPt-507354*	5R	21.981	0	33	0	90	8	0.22	-
433	*rPt-505734*	5R	22.645	33	0	84	0	14	0.64	-
434	*rPt-401063*	5R	25.251	0	37	0	91	3	1.04	-
435	*rPt-508518*	5R	26.411	0	36	0	86	9	1.32	-
436	*rPt-402087*	5R	30.136	34	0	85	0	12	0.81	-
437	*rPt-507194*	5R	30.765	0	36	0	86	9	1.32	-
438	*rPt-400368*	5R	31.491	35	0	84	0	12	1.24	-
439	*wPt-9917*	5R	35.714	0	38	0	87	6	1.94	-
440	*rPt-505551*	5R	41.225	32	0	91	0	8	0.07	-

Tabela Z.1.1 Kontynuacja

1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11
441	*rPt-410863*	5R	43.337	0	36	0	79	16	2.44	-
442	*rPt-401500*	5R	47.595	30	0	86	0	15	0.05	-
443	*rPt-506246*	5R	48.103	30	0	91	0	10	0.00	-
444	*rPt-508895*	5R	55.793	0	35	0	88	8	0.78	-
445	*rPt-508323*	5R	57.141	41	0	67	0	23	9.68	****
446	*rPt-508893*	5R	59.474	0	32	0	90	9	0.10	-
447	*rPt-401074*	5R	61.9	33	0	85	0	13	0.55	-
448	*rPt-506174*	5R	61.9	33	0	88	0	10	0.33	-
449	*rPt-505276*	5R	61.942	34	0	88	0	9	0.54	-
450	*tPt-514028*	5R	62.858	34	0	83	0	14	1.03	-
451	*rPt-401845*	5R	63.656	0	33	0	94	4	0.07	-
452	*rPt-509043*	5R	67.181	31	0	91	0	9	0.01	-
453	*rPt-390596*	5R	68.082	31	0	89	0	11	0.04	-
454	*rPt-389649*	5R	71.419	0	35	0	89	7	0.69	-
455	*rPt-509573*	5R	72.304	34	0	90	0	7	0.39	-
456	*rPt-2311*	5R	73.377	0	34	0	90	7	0.39	-
457	*rPt-509523*	5R	79.914	40	0	82	0	9	3.95	**
458	*rPt-508845*	5R	83.193	0	35	0	85	11	1.11	-
459	*rPt-506262*	5R	85.057	37	0	85	0	9	1.85	-
460	*rPt-506005*	5R	88.908	39	0	87	0	5	2.38	-
461	*rPt-509605*	5R	91.823	33	0	85	0	13	0.55	-
462	*rPt-506901*	5R	93.767	35	0	82	0	14	1.51	-
463	*rPt-506572*	5R	95.914	41	0	83	0	7	4.30	**
464	*rPt-398800*	5R	0	32	0	87	0	12	0.23	-
465	*rPt-507953*	5R	0.088	33	0	84	0	14	0.64	-
466	*rPt-411329*	5R	2.039	0	32	0	91	8	0.07	-
467	*rPt-505740*	5R	2.261	33	0	92	0	6	0.13	-
468	*rPt-398691*	5R	2.467	33	0	92	0	6	0.13	-
469	*rPt-399638*	5R	2.642	34	0	92	0	5	0.26	-
470	*rPt-507961*	5R	2.646	32	0	94	0	5	0.01	-
471	*rPt-506718*	5R	2.81	0	33	0	94	4	0.07	-
472	*rPt-507000*	5R	4.097	33	0	76	0	22	1.62	-

Tabela Z.1.1 Kontynuacja

1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11
473	*rPt-410845*	5R	24.624	0	33	0	92	6	0.13	-
474	*rPt-507500*	5R	32.192	31	0	83	0	17	0.29	-
475	*rPt-390233*	5R	44.597	0	28	0	99	4	0.59	-
476	*tPt-513104*	5R	45.067	0	28	0	102	1	0.83	-
477	*rPt-399984*	5R	45.475	0	28	0	98	5	0.52	-
478	*tPt-514014*	5R	45.88	31	0	87	0	13	0.10	-
479	*rPt-506433*	5R	45.887	0	28	0	96	7	0.39	-
480	*rPt-400237*	5R	46.762	31	0	83	0	17	0.29	-
481	*wPt-8731*	5R	55.141	30	0	92	0	9	0.01	-
482	*rPt-7200*	5R	55.236	30	0	88	0	13	0.01	-
483	*rPt-411085*	5R	55.282	29	0	88	0	14	0.00	-
484	*rPt-506584*	5R	55.373	30	0	90	0	11	0.00	-
485	*rPt-400153*	5R	55.419	30	0	94	0	7	0.04	-
486	*rPt-506128*	5R	55.454	30	0	94	0	7	0.04	-
487	*rPt-402644*	5R	55.519	30	0	91	0	10	0.00	-
488	*rPt-390294*	5R	56.725	0	34	0	84	13	0.92	-
489	*rPt-508925*	5R	61.091	0	36	0	94	1	0.50	-
490	*rPt-399290*	5R	68.02	0	34	0	88	9	0.54	-
491	*rPt-506050*	6R	0	0	37	0	86	8	1.69	-
492	*rPt-506014*	6R	3.22	25	0	97	0	9	1.32	-
493	*tPt-514229*	6R	6.807	0	37	0	90	4	1.16	-
494	*rPt-398480*	6R	11.83	30	0	88	0	13	0.01	-
495	*rPt-505345*	6R	20.589	26	0	97	0	8	0.98	-
496	*tPt-4479*	6R	49.457	0	32	0	92	7	0.04	-
497	*rPt-509330*	6R	61.949	37	0	88	0	6	1.41	-
498	*rPt-390577*	6R	62.282	0	32	0	96	3	0.00	-
499	*rPt-509249*	6R	63.687	0	34	0	92	5	0.26	-
500	*rPt-400302*	6R	63.702	0	34	0	89	8	0.46	-
501	*rPt-400767*	6R	63.916	0	34	0	88	9	0.54	-
502	*rPt-398551*	6R	65.071	0	37	0	79	15	2.94	*
503	*rPt-389289*	6R	66.661	0	34	0	83	14	1.03	-
504	*rPt-389311*	6R	67.589	35	0	83	0	13	1.37	-

Tabela Z.1.1 Kontynuacja

1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11
505	*rPt-400855*	6R	70.662	0	31	0	94	6	0.00	-
506	*rPt-402342*	6R	71.261	0	31	0	93	7	0.00	-
507	*rPt-389450*	6R	73.025	0	34	0	85	12	0.81	-
508	*tPt-7287*	6R	76.983	0	35	0	87	9	0.89	-
509	*rPt-401505*	6R	78.177	0	36	0	83	12	1.75	-
510	*rPt-505252*	6R	80.745	34	0	86	0	11	0.71	-
511	*rPt-8205*	6R	86.141	0	35	0	89	7	0.69	-
512	*rPt-399777*	6R	87.12	0	35	0	93	3	0.38	-
513	*rPt-399587*	6R	87.384	0	35	0	93	3	0.38	-
514	*rPt-506099*	6R	91.52	0	34	0	81	16	1.28	-
515	*rPt-509333*	6R	93.279	0	38	0	83	10	2.65	-
516	*rPt-506178*	6R	101.599	32	0	85	0	14	0.34	-
517	*rPt-411335*	6R	106.26	0	41	0	85	5	3.82	*
518	*rPt-399242*	6R	106.501	0	40	0	77	14	5.27	**
519	*rPt-5060*	6R	110.479	28	0	84	0	19	0.00	-
520	*rPt-390413*	6R	117.006	0	38	0	81	12	3.05	*
521	*rPt-390495*	6R	120.536	33	0	88	0	10	0.33	-
522	*rPt-400800*	6R	121.796	0	40	0	87	4	2.86	*
523	*rPt-505267*	6R	121.918	0	39	0	90	2	1.88	-
524	*rPt-508374*	6R	124.495	0	40	0	87	4	2.86	*
525	*wPt-7108*	6R	124.809	0	38	0	86	7	2.11	-
526	*rPt-399855*	6R	125.508	0	41	0	79	11	5.38	**
527	*rPt-401486*	6R	125.784	0	40	0	87	4	2.86	*
528	*tPt-513901*	6R	127.686	0	39	0	87	5	2.38	-
529	*rPt-401241*	6R	128.235	0	39	0	86	6	2.56	-
530	*rPt-401011*	6R	128.626	0	40	0	88	3	2.67	-
531	*rPt-401346*	6R	130.659	0	41	0	84	6	4.06	**
532	*tPt-4669*	6R	131.747	0	39	0	80	12	3.83	*
533	*rPt-7385*	6R	136.504	33	0	80	0	18	1.06	-
534	*wPt-9864*	6R	142.374	0	28	0	89	14	0.07	-
535	*rPt-398825*	6R	155.581	36	0	69	0	26	4.83	**
536	*tPt-513060*	6R	159.833	0	31	0	96	4	0.02	-

Tabela Z.1.1 Kontynuacja

1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11
537	*rPt-411235*	6R	168.637	31	0	81	0	19	0.43	-
538	*rPt-506473*	6R	173.374	0	40	0	86	5	3.06	*
539	*rPt-399597*	6R	174.209	0	38	0	86	7	2.11	-
540	*tPt-513023*	6R	174.901	0	39	0	89	3	2.04	-
541	*rPt-401470*	6R	175.088	0	39	0	92	0	1.59	-
542	*rPt-402480*	6R	175.375	0	39	0	84	8	2.95	*
543	*rPt-508388*	6R	176.479	0	41	0	78	12	5.67	**
544	*rPt-508786*	6R	183.175	33	0	76	0	22	1.62	-
545	*tPt-7900*	6R	195.325	0	33	0	93	5	0.10	-
546	*rPt-399399*	6R	199.374	38	0	86	0	7	2.11	-
547	*rPt-505612*	6R	201.062	0	33	0	93	5	0.10	-

[a] - Poziom istotności * - 0.1, ** - 0.05, *** - 0.01, **** - 0.005, ***** - 0.001, ****** - 0.0005

[b] – Liczebność alleli: A – homozygota typu ‘Grenado’, B – homozygota typu ‘Lamberto’, C – heterozygota lub homozygota typu ‘Lamberto’, D – heterozygota lub homozygota typu ‘Grenado’, M – dane brakujące.

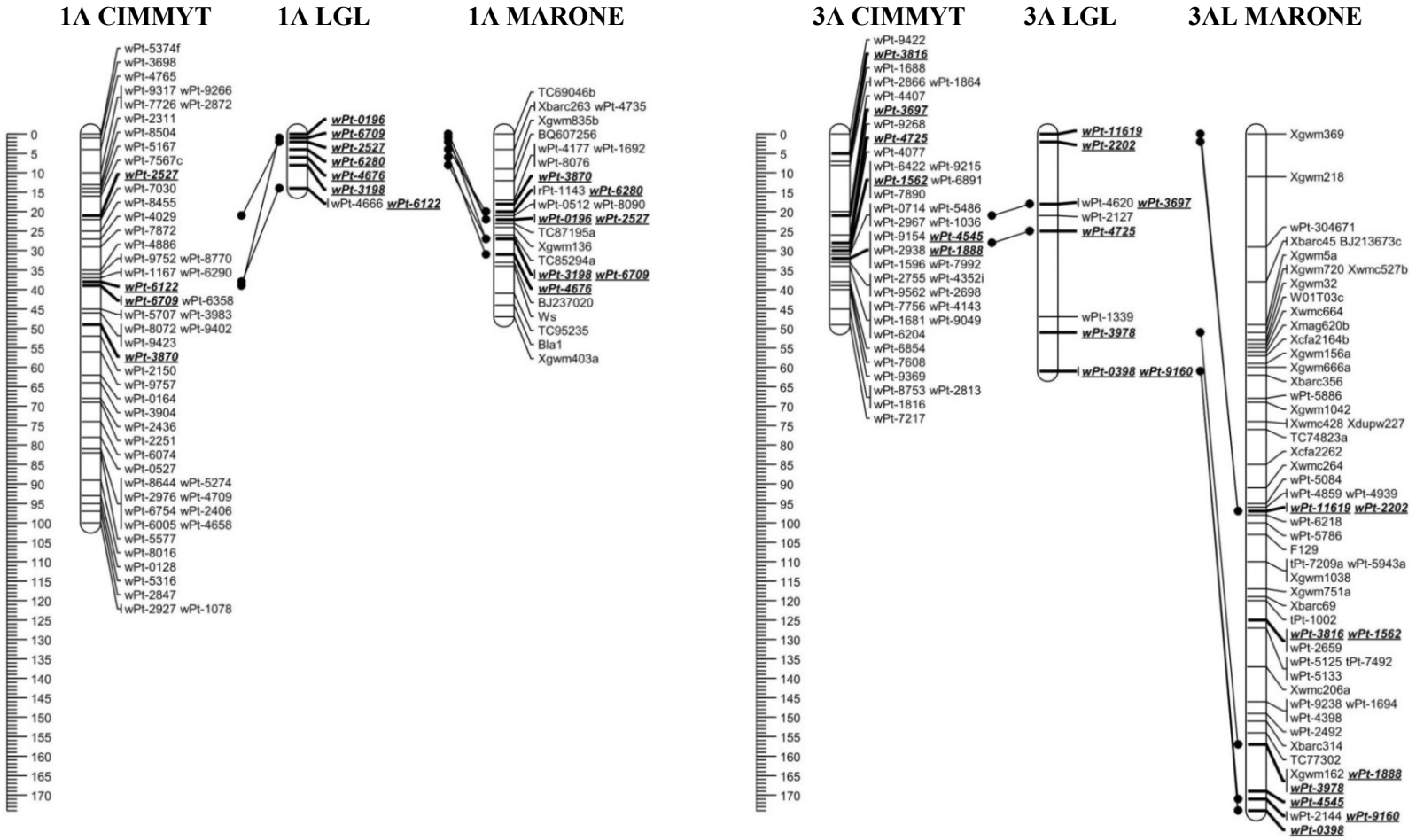
Tabela Z.1.2. Zestawienie oznaczeń SSR zlokalizowanych w grupie sprzężeń 1R dwukierunkowej F_2 ‘Lamberto’ i ‘Grenado’, częstotliwość występowania markerów oraz wyniki analizy segregacji.

Nr	Marker	Lokalizacja chromosomowa	Pozycja na chromosomie (cM)	Liczba alleli[b]					Test Chi^2	Poziom istotności[a]
				A	B	C	D	M		
1	*scm247*	1R	0	21	20	18	72	6.4237	0.0113	**
2	*scm127_2*	1R	53.43	13	0	50	68	0.6402	0.4236	-
3	*scm142*	1R	76.308	39	0	29	63	11.2941	0.0008	*****
4	*scm21*	1R	97.713	12	30	19	70	1.623	0.2027	-
5	*scm4*	1R	101.391	12	24	22	73	5.1724	0.0229	*
6	*scm1*	1R	108.883	12	27	23	69	4.9355	0.0263	*
7	*scm127_1*	1R	124.083	17	27	17	70	0.8033	0.3701	-

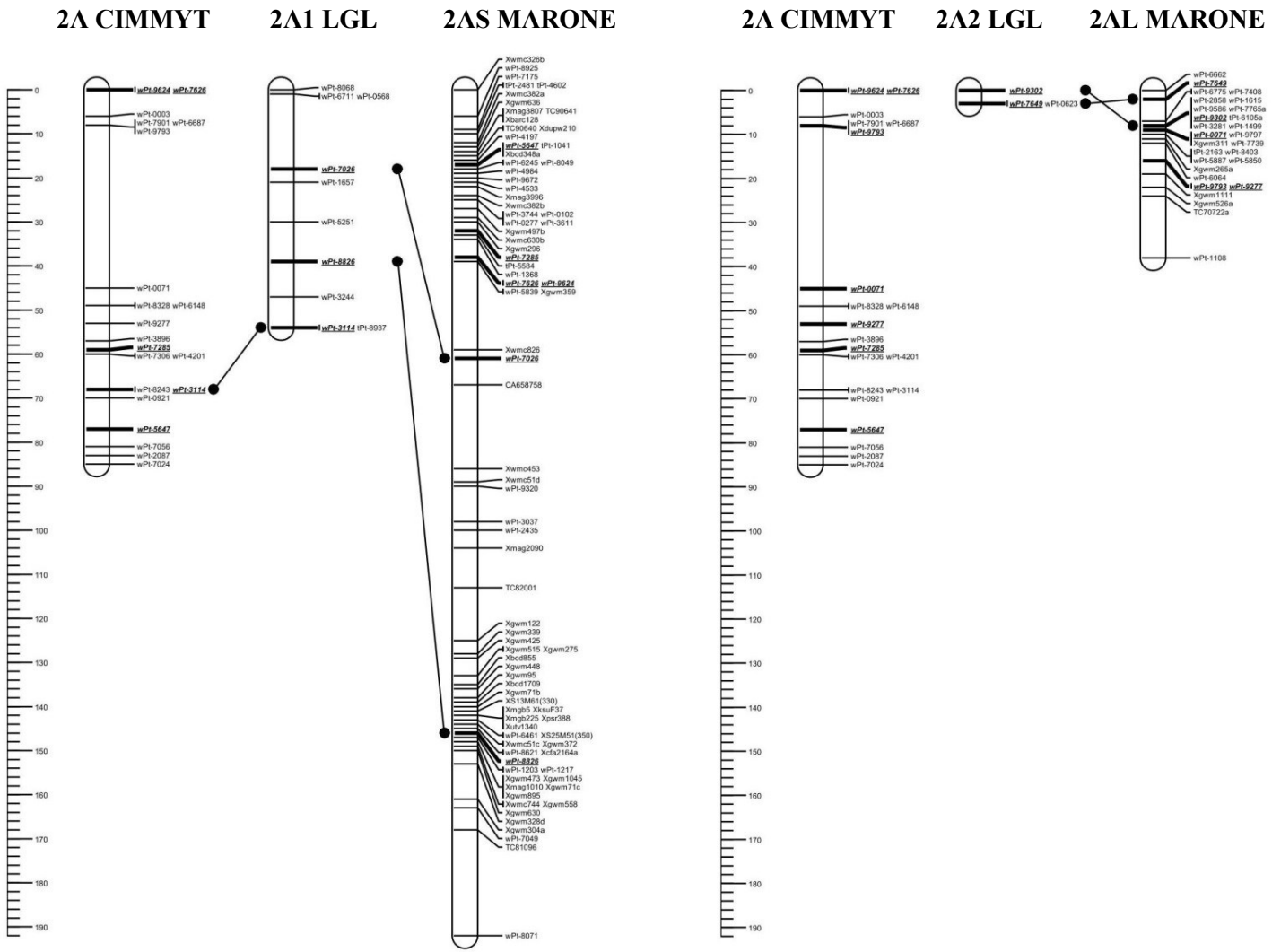
[a] - Poziom istotności * - 0.1, ** - 0.05, *** - 0.01, **** - 0.005, ***** - 0.001, ****** - 0.0005

[b] – Liczebność alleli: A – homozygota typu ‘Grenado’, B – homozygota typu ‘Lamberto’, C – heterozygota lub homozygota typu ‘Lamberto’, D – heterozygota lub homozygota typu ‘Grenado’, M – dane brakujące.

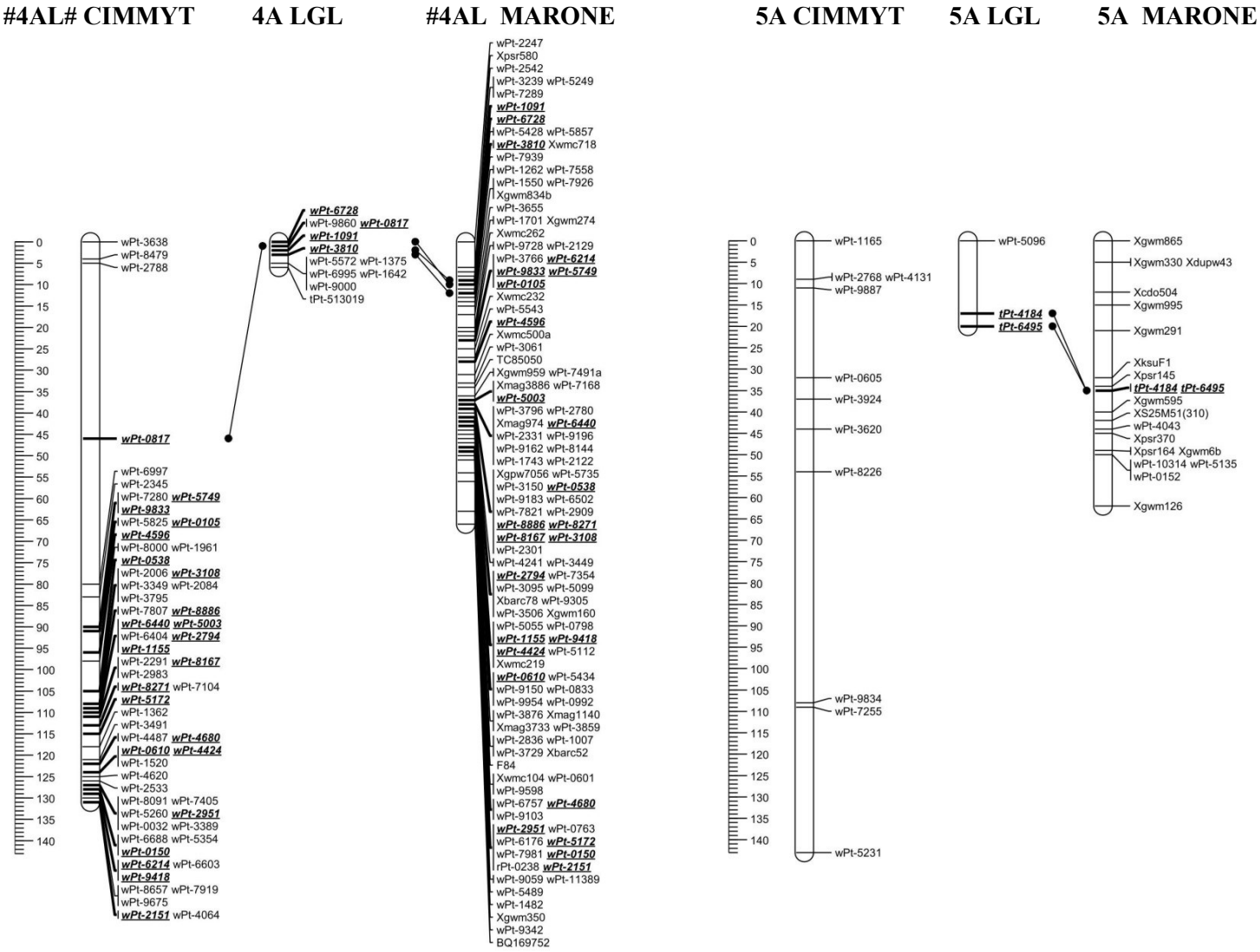
Załącznik nr 2. Mapa genetyczna genomu A dwukierunkowej populacji F_2 pszenżyta 'Lamberto' i 'Grenado' w porównaniu z mapami referencyjnymi: konsensusową CIMMYT pszenicy oraz konsensusową genomu A i B pszenicy twardej – Marone i in. (2012).



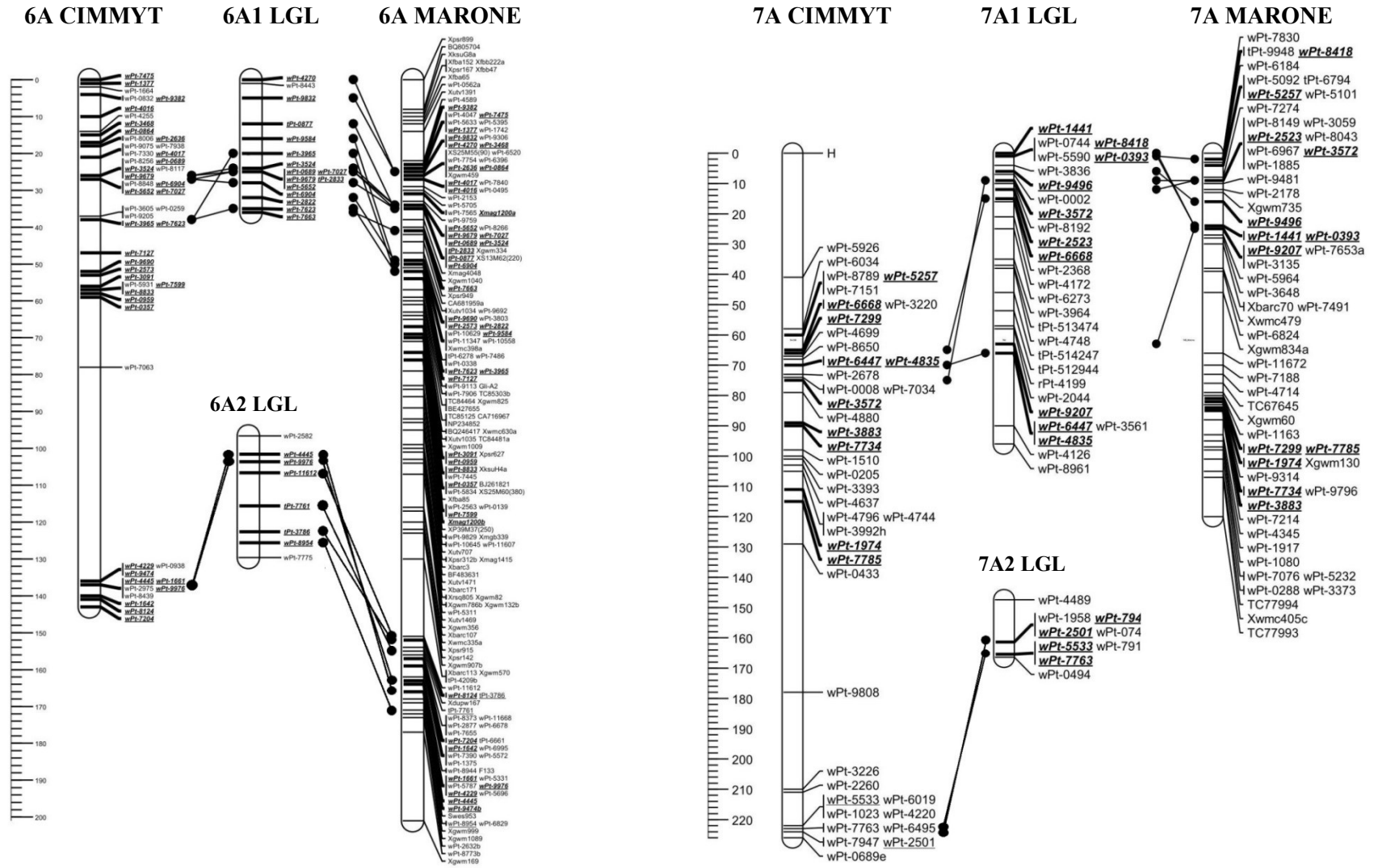
Ryc. Z2.1. Analiza porównawcza chromosomów 1A i 3A pomiędzy dwukierunkową populacją F_2 pszenżyta 'Lamberto' i 'Grenado' (LGL), zintegrowaną mapą CIMMYT pszenicy zwyczajnej oraz mapą konsensusową pszenicy twardej Marone i in. (2012).



Ryc. Z2.2. Analiza porównawcza chromosomu 2A (grupy sprzężeń 2A1 i 2A2) pomiędzy dwukierunkową populacją F_2 pszenżyta ‘Lamberto’ i ‘Grenado’ (LGL), zintegrowaną mapą CIMMYT pszenicy zwyczajnej oraz mapą konsensusową pszenicy twardej Marone i in. (2012).

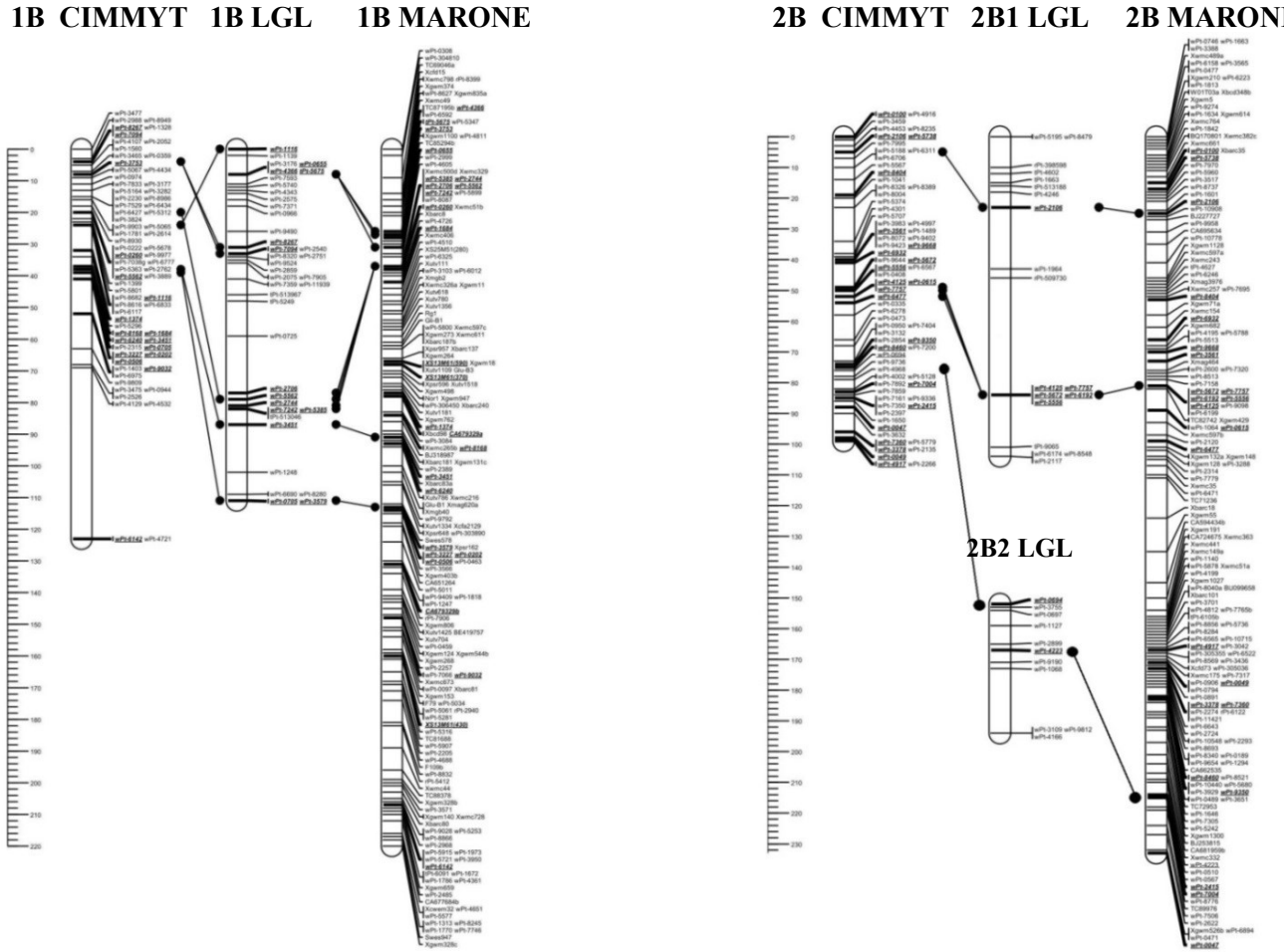


Ryc. Z2.3. Analiza porównawcza chromosomów 4A i 5A pomiędzy dwukierunkową populacją F_2 pszenżyta ‘Lamberto’ i ‘Grenado’ (LGL), zintegrowaną mapą CIMMYT pszenicy zwyczajnej oraz mapą konsensusową pszenicy twardej Marone i in. (2012).

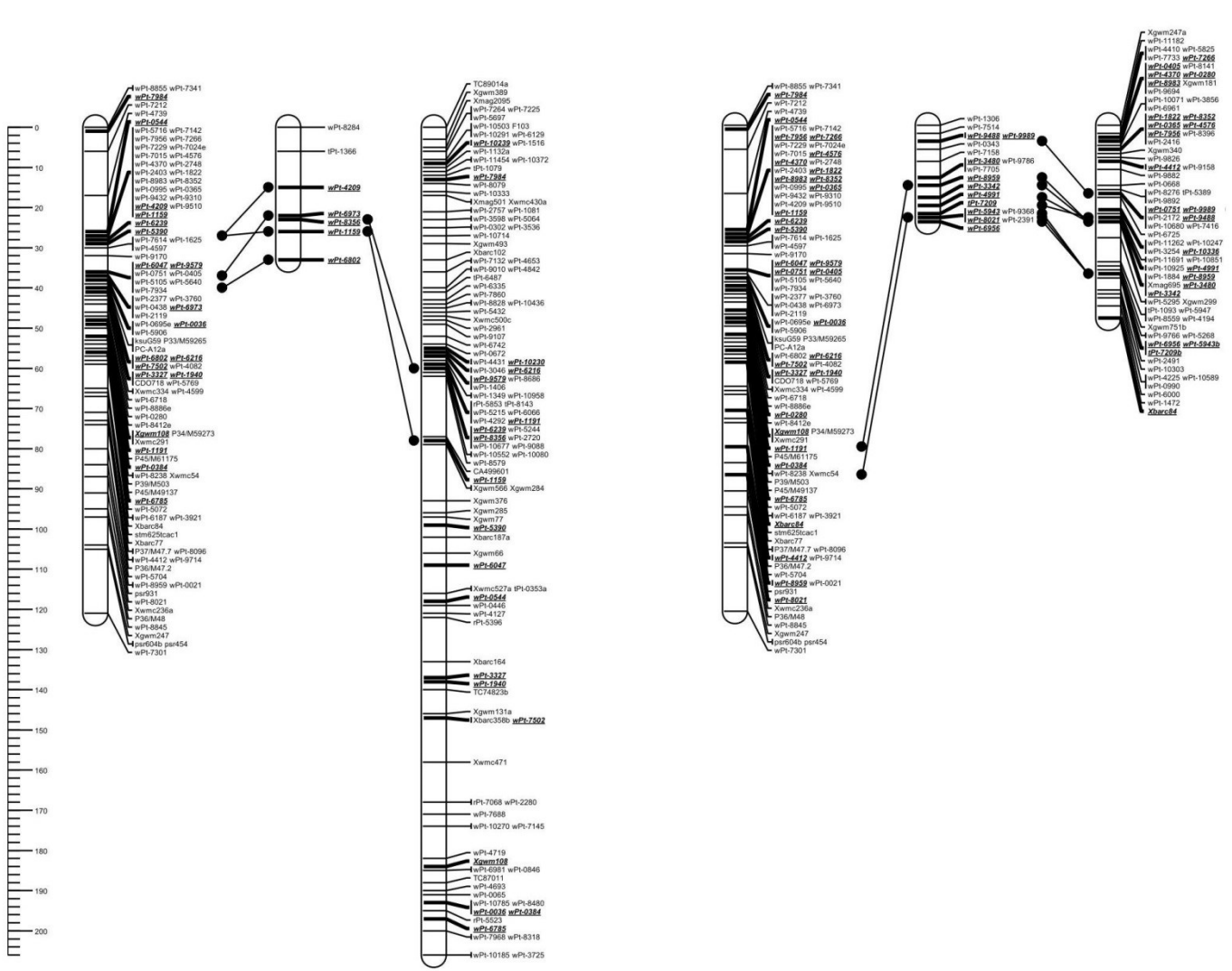


Ryc. Z2.4. Analiza porównawcza chromosomów 6A (grupy sprzężeń 6A1 i 6A2) oraz 7A (grupy sprzężeń 7A1 i 7A2) pomiędzy dwukierunkową populacją F_2 pszenżyta 'Lamberto' i 'Grenado' (LGL), zintegrowaną mapą CIMMYT pszenicy zwyczajnej oraz mapą konsensusową pszenicy twardej Marone i in. (2012).

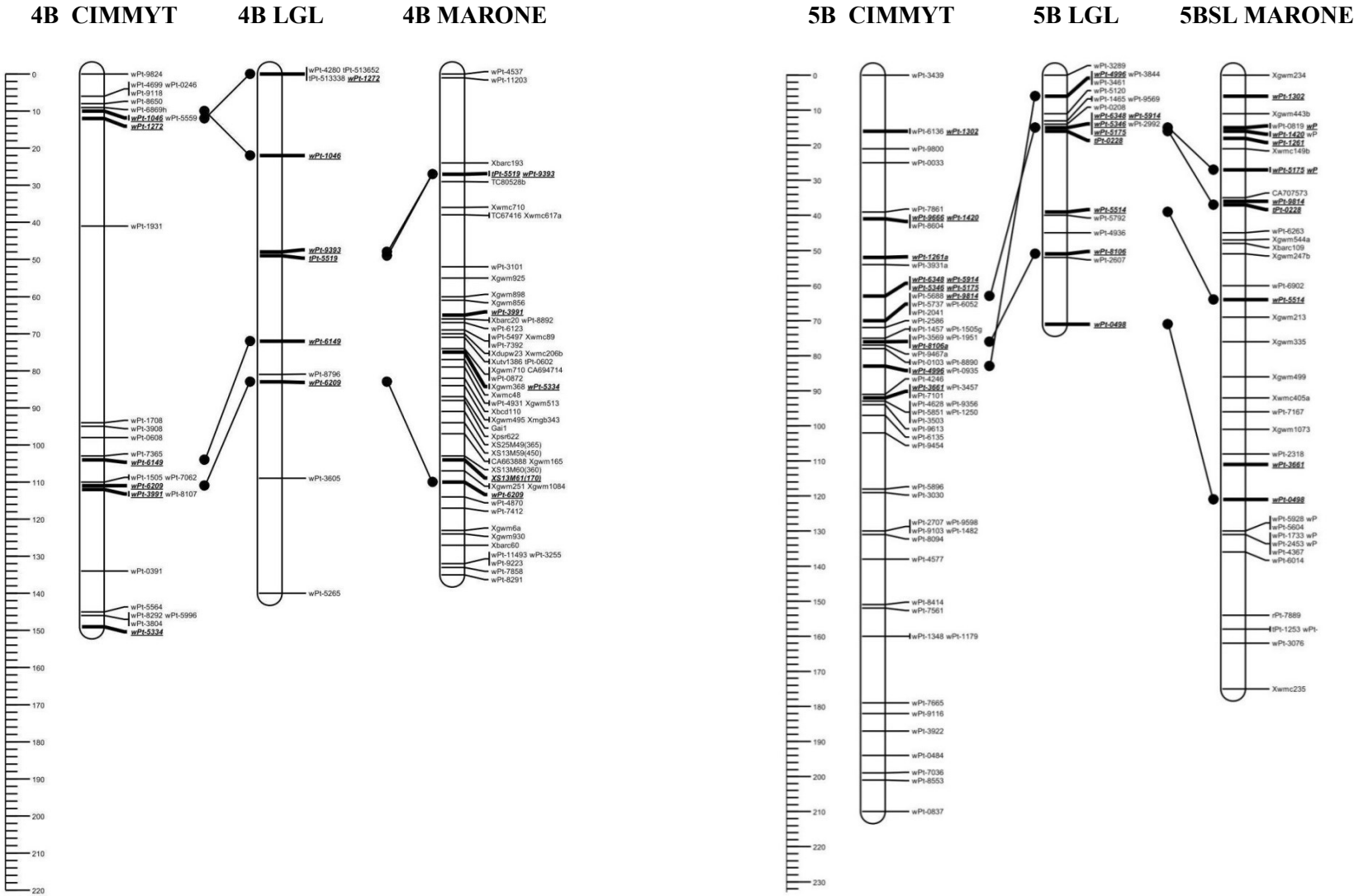
Załącznik nr 3. Mapa genetyczna genomu B dwukierunkowej populacji F_2 pszenżyta 'Lamberto' i 'Grenado' w porównaniu z mapami referencyjnymi: konsensusową pszenicy - CIMMYT oraz mapą konsensusową genomu A i B pszenicy twardej autorstwa Marone i in. (2012).



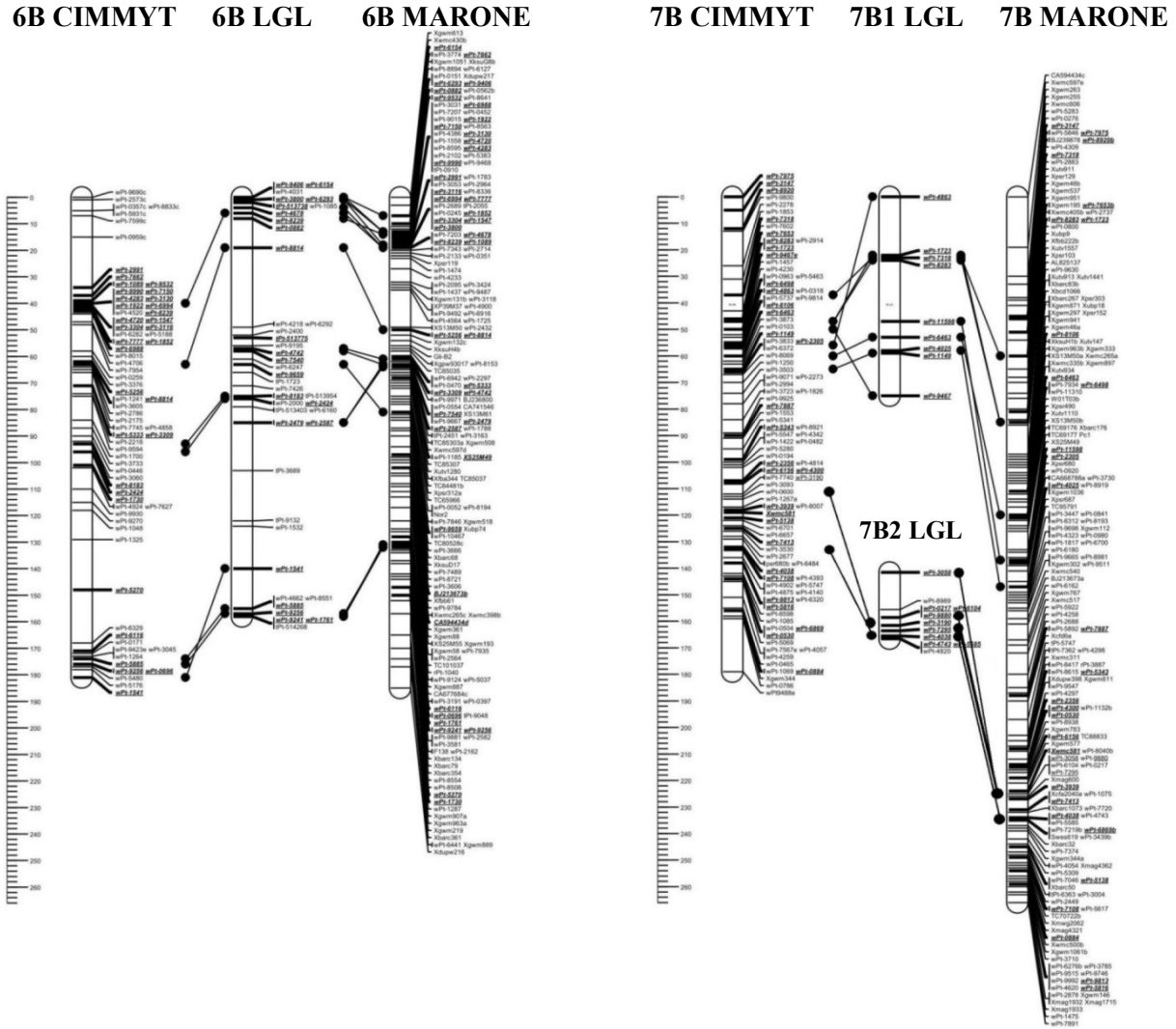
Ryc. Z3.1. Analiza porównawcza chromosomów 1B oraz 2B (grupy sprzężeń 2B1 i 2B2) pomiędzy dwukierunkową populacją F_2 pszenżyta 'Lamberto' i 'Grenado' (LGL) zintegrowaną mapą CIMMYT pszenicy zwyczajnej oraz mapą konsensusową pszenicy twardej Marone i in. (2012).



Ryc. Z3.2. Analiza porównawcza grup sprzężeń chromosomu 3B – 3B1 i 3B2, pomiędzy dwukierunkową populacją F_2 pszenżyta ‘Lamberto’ i ‘Grenado’ (LGL) zintegrowaną mapą CIMMYT pszenicy zwyczajnej oraz mapą konsensusową pszenicy twardej Marone i in. (2012).

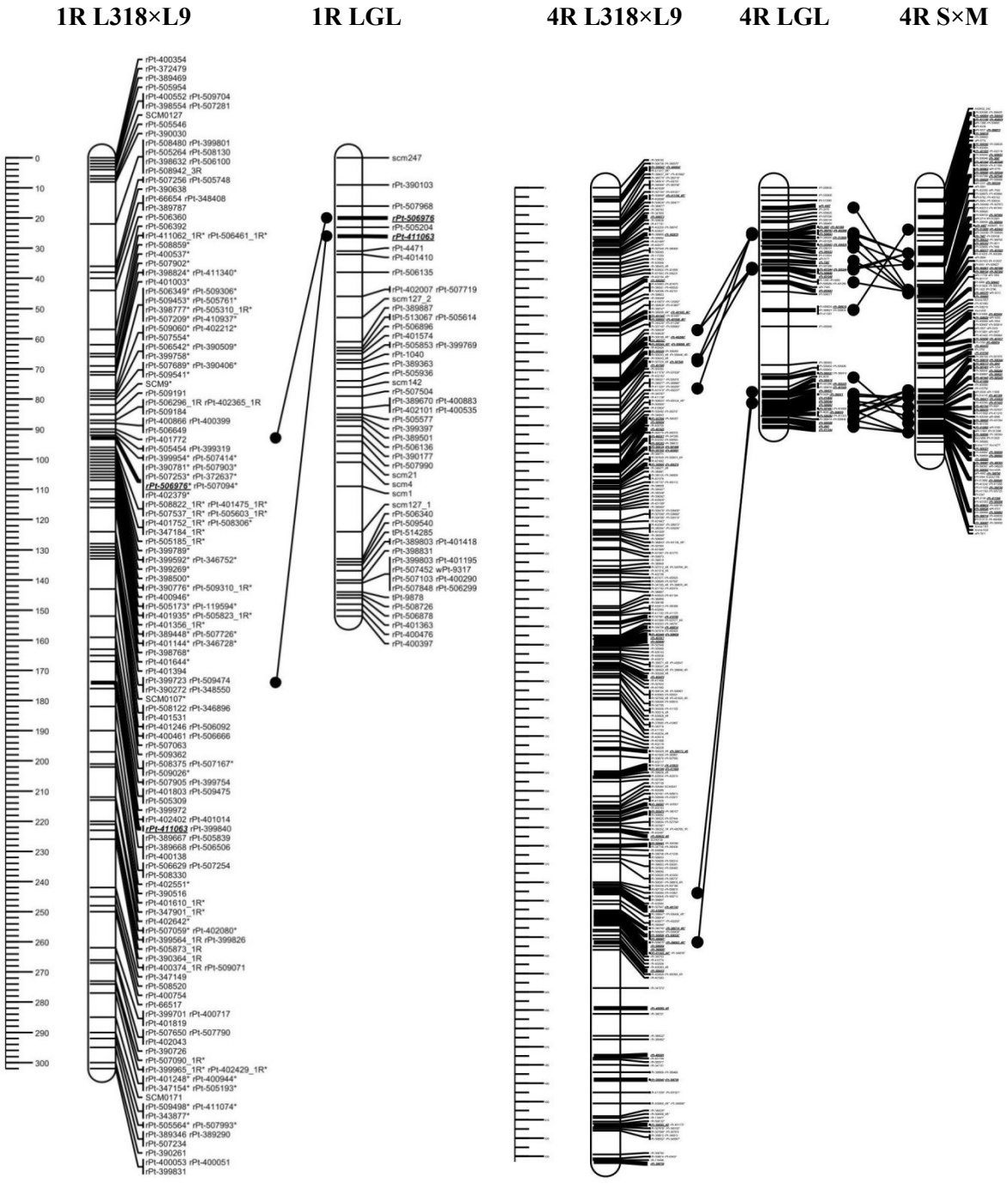


Ryc. Z3.3. Analiza porównawcza chromosomów 4B i 5B, pomiędzy dwukierunkową populacją F_2 pszenżyta ‘Lamberto’ i ‘Grenado’ (LGL) zintegrowaną mapą CIMMYT pszenicy zwyczajnej oraz mapą konsensusową pszenicy twardej Marone i in. (2012).

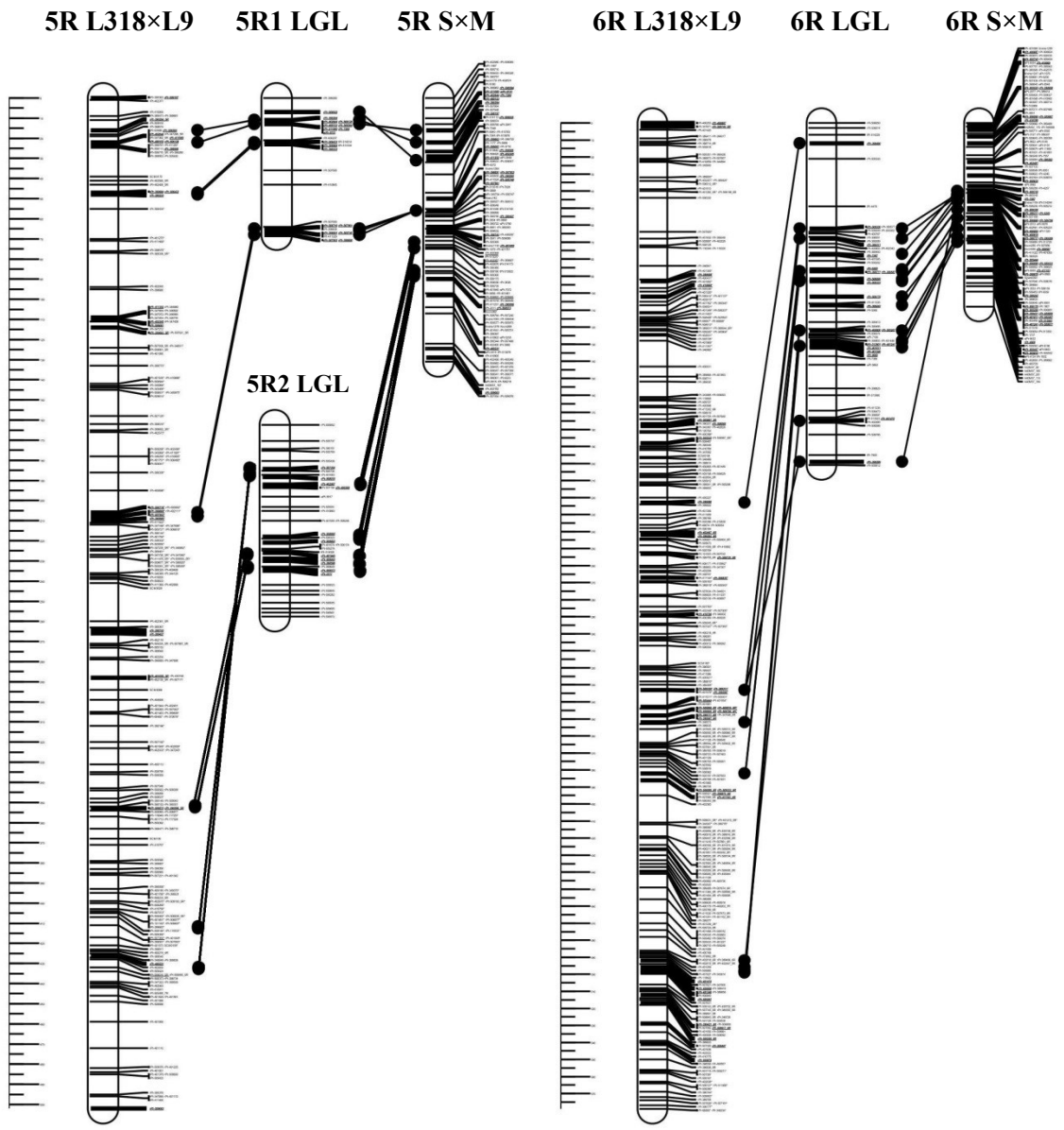


Ryc. Z3.4. Analiza porównawcza chromosomów 6B oraz 7B (grupy sprzężeń 7B1 i 7B2), pomiędzy dwukierunkową populacją F_2 pszenżyta 'Lamberto' i 'Grenado' (LGL) zintegrowaną mapą CIMMYT pszenicy zwyczajnej oraz mapą konsensusową pszenicy twardej Marone i in. (2012).

Załącznik nr 4. Mapa genetyczna genomu R dwukierunkowej populacji F_2 pszenżyta 'Lamberto' i 'Grenado' w porównaniu z mapami referencyjnymi: mapą żyta ozimego L318×L9 [BOLIBOK-BRĄGOSZEWKA i in. 2009] oraz mapą pszenżyta 'Saka3006'×'Modus' – S×M [TYRKA i in. 2011].



Ryc. Z4.1. Analiza porównawcza chromosomów 1R i 4R pomiędzy dwukierunkową populacją F_2 pszenżyta 'Lamberto' i 'Grenado' (LGL), mapą żyta ozimego – L318×L9 [BOLIBOK-BRĄGOSZEWKA i in. 2009], oraz mapą pszenżyta 'Saka3006'×'Modus' – S×M [TYRKA i in. 2011].



Ryc. Z4.2. Analiza porównawcza chromosomu 5R (grupy sprzężeń 5R1 i 5R2) oraz 6R pomiędzy dwukierunkową populacją F_2 pszenżyta 'Lamberto' i 'Grenado' (LGL), mapą żyta ozimego – L318×L9 [BOLIBOK-BRĄGOSZEWKA i in. 2009], oraz mapą pszenżyta 'Saka3006'×'Modus' – S×M [TYRKA i in. 2011].