**Streszczenie zadania za 2020 r. w Programie Badań Podstawowych w Produkcji Roślinnej.**

***Numer zadania (4-1-01-4-03) - tytuł zadania Tolerancja na stresy abiotyczne - genotypowanie pszenicy w oparciu o strategię genów kandydujących***

**Cel zadania:**

1. Analiza regionów mikrosatelitarnych leżących na skafoldzie 404129\_5BL w bliskim sąsiedztwie genu *TaInv1* w pozostałych odmianach pszenic, w których badano tolerancję mikrosporogenezy na suszę.
2. Zestawienie wyników polimorfizmu SSR z wynikami żywotności pyłku i wypełnienia kłosów oraz próby konwersji markerów SSR na markery PCR.

**Wyniki:**

Genomowa sekwencja regionu SSR pszenicy nr 23-404 została sekwencjonowana w 31 genotypach wybranych z badanej listy odmian (Załącznik 1). Przedstawione są sekwencje regionu SSR 23-404 z zaznaczeniem regionów powtórzeń motywu GA i porównaniem do sekwencji referencyjnej z bazy EnsemblePlants. Region nr 23-404 był sekwencjonowany kilkakrotnie. Najpierw przy użyciu starterów użytych do amplifikacji wykonano sekwencjonowanie forward i revers a następnie jeszcze raz przy użyciu starterów revers zagnieżdżonych w obszarze 3’ relatywnie blisko regionu SSR z powtórzeniami GA. Skumulowane wyniki wszystkich sekwencjonowań porównanie ich ze sobą i z sekwencją referencyjną przy użyciu Clustal W (LaserGene DNAStar) wskazuje na dużą liczbą powtórzeń motywu GA w tym regionie SSR i jednocześnie bardzo duże zróżnicowanie liczby tych powtórzeń w różnych genotypach. W niektórych genotypach ten region SSR jest przedzielony sekwencjami innymi niż GA (forma niedoskonała sekwencji SSR). Bardzo wysoki stopień zawiązywania ziarniaków w kłosach w warunkach stresu suszy (średnia z lat 2014-2015 to 123%) był obserwowany w odmianie Rusalka, w której SSR 23-404 był bardzo krótki (GA)12 znacznie krótszy niż w pozostałych odmianach. Inny bardzo krótki SSR (GA)17 zidentyfikowano w odmianie Albena. Rośliny tej odmiany w warunkach suszy również wykazały wysoką żywotność pyłku 100% i wysoki stopień zawiązywania ziarniaków 78%. Ta sekwencja mikrosatelitarna może być potencjalnym markerem pszenicy tolerancji na stres suszy. Sekwencje nukleotydowe starterów projektowano do genomowego DNA zawierającego sekwencje mikrosatelitarną (AG)18. Na sekwencji docelowej sekwencję startera forward zaznaczono kolorem żółtym a sekwencje komplementarna do startera revers kolorem szarym. Sekwencje regionu SSR 35-404 oraz lista zaprojektowanych 30 par starterów do tego regionu jest w Załączniku 5. Ze względu na obecność sekwencji mikrosatelitarnej z licznymi powtórzeniami motywu (AG) część starterów forward i revers jest powtórzona w różnych kombinacjach z innymi starterami. Trzy pary starterów użyto do amplifikacji fragmentu z regionu SSR 35-404. We wszystkich przypadkach uzyskano fragment DNA o długości zbliżonej do oczekiwanego. Dla pierwszej pary było to 151 pz, dla pary drugiej 160 pz i dla pary trzeciej starterów 155 pz. Efektem reakcji PCR z użyciem pierwszej pary była synteza fragmentów o długości podobnej do oczekiwanych oraz dodatkowo długich fragmentów o długości powyżej 400 pz. Wynikiem amplifikacji przy użyciu pary drugiej był „czysty” amplikon o długości zbliżonej do oczekiwanego bez żadnych amplikonów niespecyficznych. W obydwu przypadkach bardzo wyraźny był polimorfizm długości amplikonów odzwierciedlający zmienność długości regionu mikrosatelitarnego.

**Wnioski:**

1. Poznano sekwencje nukleotydowe regionów mikrosatelitarnych 23-404 oraz 34-404 w 30 genotypach pszenicy. Obydwa regiony leżą na skafoldzie genomu pszenicy w bliskim sąsiedztwie genu kodującego inwertazę.
2. Obydwa regiony mikrosatelitarne zbudowane są wielokrotnych powtórzeń motywu dwunukleotydowego AG lub GA. Wykazano, że liczba tych powtórzeń jest różna w badanych genotypach.
3. Wykazano duże różnice w zmienności tych SSR. Liczba powtórzeń motywu AG w SSR 35-404 wynosiła od 17 do 21.
4. Długość SSR 23-404 była znacznie bardziej zróżnicowana, liczba powtórzeń (GA) wynosiła od 12 do 59. Ponadto w dwóch genotypach SSR 23-404 został podzielony przez krótkie wstawki innych sekwencji. Cechy te wskazują na bardzo dużą dynamikę zmian molekularnych w tym SSR i z tego względu może on być markerem molekularnym cech kodowanych przez sprzężone z nim geny.
5. Dwunukleotydowy motyw (GA) w SSR 23-404 wykazał bardzo wysoki polimorfizm długości (od 12 do 59) w 31 testowanych genotypach pszenicy. Ponadto, w dwóch genotypach ten SSR występował w tzw. formie niedoskonałej. Wskazuje to na bardzo dużą dynamikę zmian molekularnych i potencjalną przydatność jako markera molekularnego cech kodowanych przez sprzężone z nim geny.
6. Dwa najkrótsze SSR 23-404 zidentyfikowano w odmianach Rusalka i Albena. Były to odpowiednio (GA)12 i (GA)17. Odmiany te (wyniki Zad. 8 lata 2015-2017) charakteryzują się wysoką lub bardzo wysoką tolerancją na suszę ocenianą wysokim współczynnikiem wypełnienia kłosów i żywotnością pyłku w roślinach poddanych temu stresowi.
7. **Zmienność SSR 23-404 może być markerem wyższej tolerancji na suszę wynikającej z dużej żywotności pyłku i wysokiego współczynnika wypełnienia kłosów w roślinach poddanych stresowi suszy.**