

SPRAWOZDANIE MERYTORYCZNE

z realizacji zadania na rzecz postępu biologicznego w produkcji roślinnej w 2014 roku

A. INFORMACJE OGÓLNE

Tytuł zadania Mapowanie sprzężeniowe i asocjacyjne owsa zwyczajnego
Numer zadania (w załączniku nr 9 do rozporządzenia Ministra Rolnictwa i Rozwoju Wsi z dnia 18 maja 2010 r. w sprawie stawek dotacji przedmiotowych dla różnych podmiotów wykonujących zadania na rzecz rolnictwa (Dz. U. Nr 91, poz. 595, z późn. zm.)) 30
Planowany okres realizacji zadania 12 miesięcy
Planowane nakłady w zł 200 000

B. DANE WNIOSKODAWCY

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

**Stanisław Baran, Prof. dr hab. inż., Prorektor ds. Nauki i Współpracy z Zagranicą,
Uniwersytet Przyrodniczy w Lublinie
ul. Akademicka 13, 20-950 Lublin
Telefon: 81-445-60-66; Fa×: 81-533-35-49, e-mail: biuro.rektora@up.lublin.pl**

C. INFORMACJA O WYKONAWCACH

1. Zespół badawczy

kierownik zadania		
imię i nazwisko	stopień i tytuł naukowy	miejsce zatrudnienia
Edyta Paczos-Grzęda	dr	Uniwersytet Przyrodniczy w Lublinie Instytut Genetyki, Hodowli i Biotechnologii Roślin
wykonawcy zadania		
imię i nazwisko	stopień i tytuł naukowy	miejsce zatrudnienia
Piotr Bednarek	dr hab., prof. IHAR	IHAR Radzików Zakład Biochemii i Fizjologii Roślin
Aneta Koroluk	mgr inż.	Uniwersytet Przyrodniczy w Lublinie Instytut Genetyki, Hodowli i Biotechnologii Roślin

2. Kierownik zadania (imię, nazwisko, tytuł lub stopień naukowy, adres do korespondencji, telefon bezpośredni i do sekretariatu jednostki organizacyjnej zatrudniającej kierownika zadania, e-mail kierownika; telefon do oraz dane osoby, z którą można się kontaktować w razie nieobecności kierownika zadania)

Edyta Paczos-Grzęda, dr
Uniwersytet Przyrodniczy w Lublinie
Instytut Genetyki, Hodowli i Biotechnologii Roślin
ul. Akademicka 15
20-934 Lublin
tel. bezp. (81) 445-68-66, kom. 504098872, sekretariat (81) 445-68-84
edyta.paczos@up.lublin.pl

osoba, z którą można się kontaktować w razie nieobecności kierownika zadania

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

D. OPIS ZADANIA

1. Cele zadania

Lp.	Cel	Czy cel został zrealizowany
1	Wyprowadzanie kolejnych populacji mapujących w oparciu o najlepsze polskie materiały	TAK
2	Precyzyjne fenotypowanie i genotypowanie za pomocą markerów DNA wczesnych pokoleń mieszańców	TAK
3	Kontynuowanie rozmnożeń materiałów przeznaczonych do uzyskania zaawansowanych międzyodmianowych i międzygatunkowych rekombinacyjnych linii wsobnych	TAK
4	Fenotypowanie linii i odmian przeznaczonych do mapowania asocjacyjnego oraz stopniowe przygotowywanie materiału do całogenomowych analiz polimorfizmu DNA.	TAK
5	Opracowanie mapy genetycznej bazującej na populacji mapującej E326 pokolenia F ₂ wyprowadzonej w oparciu o krzyżowania biparentalne 'Bingo' × 'Pennline 116'	TAK
6	Zlokalizowanie na opracowanej mapie genetycznej loci wybranych cech ilościowych	TAK
7	Identyfikacja markerów genetycznych sprzężonych z obecnością genu <i>Dw6</i> w oparciu o analizę matryc DArTseq po uwzględnieniu obserwacji rozszczepień w obrębie linii F ₃ populacji mapującej E310	TAK

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

3. 1. Określenie sposobu dziedziczenia cech poprzez fenotypowanie mieszańców F₁ oraz kontynuacja rozmnożeń populacji mapujących.

Cel tematu badawczego 1

Celem tematu było określenie sposobu dziedziczenia cech poprzez fenotypowanie mieszańców F₁. Zadanie to obejmowało również uzyskanie nowych kombinacji mieszańcowych w celu wyprowadzenia kolejnych populacji mapujących oraz rozmnożenie następnych pokoleń mieszańców międzyodmianowych oraz międzygatunkowych w kierunku uzyskania RIL.

Wyniki

W celu uzyskania kolejnych populacji mapujących przeprowadzono krzyżowania par konkretnych osobników rodzicielskich. Kryterium doboru form rodzicielskich była próba włączenia do form hodowlanych konkretnych genów m.in. *Dw6* i *Dw7*. W krzyżowaniach wykorzystano 35 form matecznych oraz 30 form ojcowskich. Zapylono 5132 kwiatki w 419 wiechach uzyskując 676 ziarniaków F₁ o zdefiniowanym pochodzeniu (Tab.1). Efektywność krzyżowania wyniosła średnio 13%. Od 0% dla cv. 'Szakal' i STH9488 do 54% dla OA1306 i 58% dla cv. 'Krezus' jako form matecznych. Prowadzono również krzyżowania wsteczne mieszańców F₁, BC₁, BC₂ i BC₆ uzyskanych w roku poprzednim. Wykastrowano 342 kwiatki uzyskując 82 ziarniaki. Efektywność backcrossów niemal dwukrotnie przewyższyła efektywność krzyżowań prostych wynosząc 24%.

Uzyskane w efekcie krzyżowania ziarniaki reprezentują 121 kombinacji mieszańcowych (Tab. 2).

Tab. 1. Efektywność krzyżowań prostych i wstecznych.

Forma mateczna	Liczba zapylnych kwiatków	Liczba zawiązanych ziarniaków	Efektywność krzyżowania [%]
Bingo	986	48	5
Krezus	64	37	58
Bajka	15	1	7
Sławko	51	13	25
Chwat	84	30	36
Szakal	11	0	0
Kasztan	1098	34	3
0.4044	126	9	7
Rp 9008	136	26	19
0.2942	107	14	13
STH 7309	157	7	4
CHD 3843/02	116	12	10
Finley	110	15	14
Sam	42	8	19
Arab	199	38	19
Rajtar	194	14	7
Breton	91	7	8
HiFi	161	49	30
Kanota	125	14	11
Leggett	260	56	22
OA1306	134	72	54
Potoroo	45	3	7
Quoll	174	16	9
Rebel	63	25	40
Ronald	177	43	24
STH 9471	35	1	3
STH 9488	11	0	0
Amant	18	2	11
E447	58	11	19
E448	69	20	29
E449	43	16	37
E450	43	8	19
E544	42	10	24
E545	30	4	13
E546	57	13	23
SUMA	5132	676	13

Tab. 3. Wyniki fenotypowania mieszańców F1.

Nr kombinacji	Nr rośliny	Forma mateczna	Forma ojcowska	Wysokość	Liczba pędów produkcyj.	Liczba niedogonów	Data wiechowania	Długość wiechy głównej [cm]	Liczba kłosek	Liczba ziarniaków	Masa ziarniaków [g]	MTZ [g]	Masa pozostałych ziarniaków z rośliny [g]
440	1	408	Bingo 1	116	8	5	12.06	21	99	287	10.24	35.68	42.34
440	2	408	Bingo 1	102	5	2	14.06	22	85	135	4.21	31.19	11.83
440	3	408	Bingo 1	116	5	2	10.06	21	89	198	7.03	35.51	18.86
441	1	416	Bingo 1	127	5	2	12.06	23	80	176	6.7	38.07	24.08
442	1	425	Santor	120	5	0	16.06	21	81	131	4.15	31.68	15.41
442	2	425	Santor	111	3	2	17.06	20	50	108	3.21	29.72	6.06
443	3	426	Hetman	127	5	1	15.06	26	113	215	7.07	32.88	19.49
443	1	426	Hetman	122	6	5	21.06	27	106	237	7.6	32.07	25.64
443	2	426	Hetman	118	3	0	18.06	25	87	162	5.52	34.07	7.53
444	3	407 2	Bingo 3	117	4	4	10.06	21	50	143	7.23	50.56	15.35
444	2	407 2	Bingo 3	116	7	3	11.06	21	77	180	7.07	39.28	26.88
445	1	408 1	Bingo 3	110	4	1	10.06	20	40	129	5.14	39.84	14
446	1	408 2	Bingo 3	108	8	2	7.06	22	71	152	5.74	37.76	16.3
446	2	408 2	Bingo 3	96	4	2	7.06	20	65	110	4.52	41.09	0
447	2	409 1	SE4 1	118	3	1	19.06	25	65	120	4.3	35.83	5.03
447	1	409 1	SE4 1	138	3	0	21.06	29	114	209	7.1	33.97	8.88
448	1	409 2	Celer	110	4	3	14.06	22	87	138	5.96	43.19	15.13
448	3	409 2	Celer	115	3	4	14.06	25	98	177	7.46	42.15	7.48
448	2	409 2	Celer	120	4	1	18.06	27	99	164	6.62	40.37	11.62
449	1	411 1	Bingo 1	122	7	3	10.06	25	91	212	8.17	38.54	34.83
449	1	411 1	Bingo 1	120	4	2	11.06	21	68	139	6.7	48.20	10.89
449	2	411 1	Bingo 1	116	4	3	11.06	23	72	134	5.7	42.54	12.27
450	1	411 1	Celer 1	120	3	0	13.06	28	109	195	7.49	38.41	6.96
450	2	411 1	Celer 1	118	2	1	17.06	24	67	119	4.94	41.51	6.67
450	3	411 1	Celer 1	105	2	2	11.06		90	164	6.72	40.98	1.14
451	1	417 2	Kasztan 1	130	3	2	13.06	22	59	155	5.74	37.03	8.31
451	2	417 2	Kasztan 1	114	4	4	8.06	23	56	130	4.94	38.00	9.63

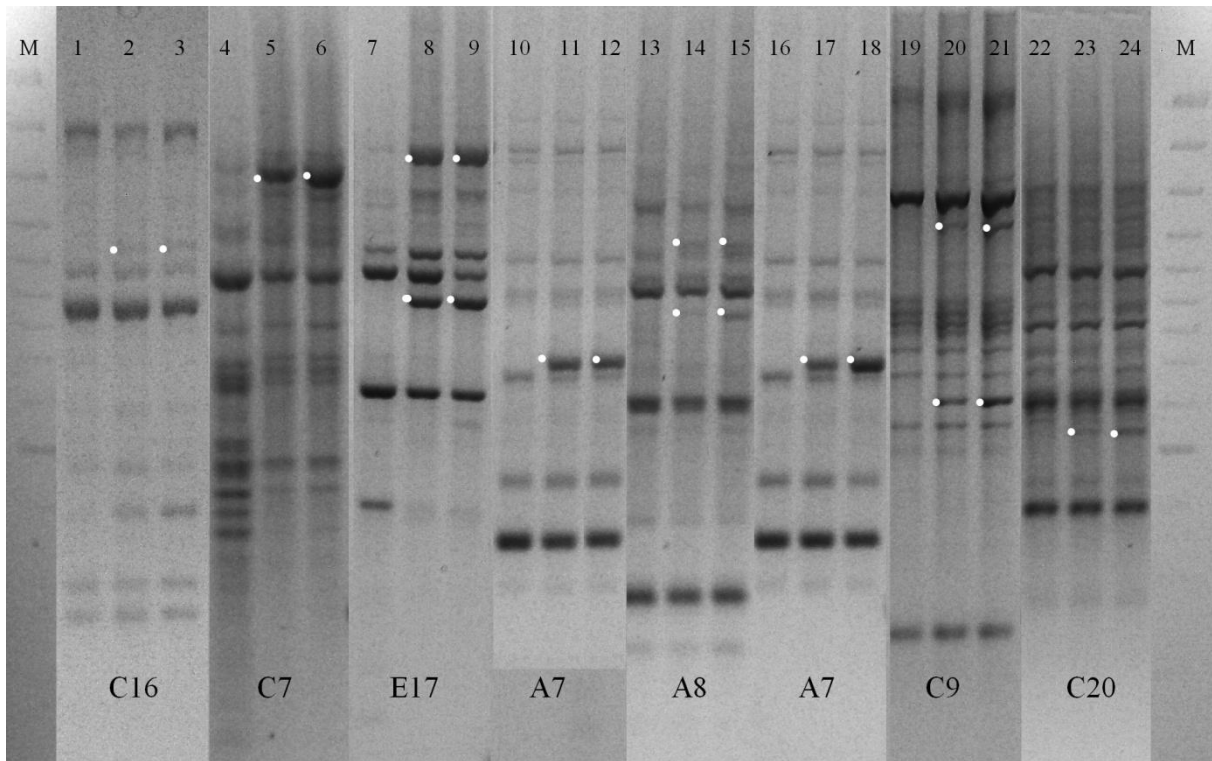
Nr kombinacji	Nr rośliny	Forma mączna	Forma ojcowska	Wysokość	Liczba pędów produkcyj.	Liczba niedogonów	Data wiechowania	Długość wiechy głównej [cm]	Liczba kłosek	Liczba ziarniaków	Masa ziarniaków [g]	MTZ [g]	Masa pozostałych ziarniaków z rośliny [g]
452	3	417 7	Bingo 1	109	3	1	10.06	24	71	135	4.92	36.44	5.08
452	2	417 7	Bingo 1	130	5	3	11.06	21	87	203	6.21	30.59	17.24
452	1	417 7	Bingo 1	122	5	5	11.06	28	136	259	18.33	70.77	16.31
453	1	422 1	Bingo 8	126	5	5	16.06	21	69	179	6.83	38.16	30.01
455	1	424 2	Cekin	134	3	4	13.06	30	92	212	7.81	36.84	11.31
455	2	424 2	Cekin	122	4	2	13.06	30	102	247	9.11	36.88	16.02
456	1	425 2	Santor	112	4	3	17.06	21	66	120	4.17	34.75	9.61
457	1	426 2	Hetman	115	3	1	18.06	24	76	135	4.86	36.00	7.22
457	2	426 2	Hetman	118	2	2	16.06	25	58	142	4.55	32.04	3.5
458	2	427 2	Sam	131	4	3	14.06	29	146	350	11.83	33.80	23.8
458	1	427 2	Sam	130	2	3	14.06	29	139	336	10.84	32.26	6.37
459	3	427 2	Sam	115	2	0	18.06	23	60	99	3.17	32.02	3.07
459	1	427 2	Sam	128	2	0	15.06	25	88	133	4.95	37.22	7.46
459	2	427 2	Sam	112	3	2	15.06	26	78	136	4.29	31.54	5.73
460	1	427 3	Sam	140	3	3	13.06	26	115	289	10.3	35.64	18.61
460	2	427 3	Sam	129	3	2	11.06	29	160	330	10	30.30	15.47
461	1	428 1	Sam 2	125	5	3	14.06	26	116	257	8.79	34.20	19.95
462	3	428 2	Sam 1	130	2	1	13.06	24	110	226	8.01	35.44	5.67
462	2	428 2	Sam 1	124	3	0	15.06	24	92	181	6.12	33.81	5.75
462	1	428 2	Sam 1	138	3	1	16.06	29	114	222	7.54	33.96	13.16
463	1	428 3	Sam	92	1	1	25.06	17	29	65	1.81	27.85	0
465	3	428 5	Sam	130	1	2	16.06	27	106	239	8.22	34.39	0
465	2	428 5	Sam	128	3	2	13.06	25	99	224	7.64	34.11	6.63
465	1	428 5	Sam	142	2	5	12.06	31	158	441	15.42	34.97	9.38
466	1	428 7	Sam	134	2	1	14.06	30	109	289	9.7	33.56	6.92
502	1	DC 2112/05 1	HiFi 4	134	5	3		28	101	208	7.75	37.26	18.7
503	1	DC 2112/05 1	Leggett 1	124	3	2	14.06	22	105	175	6.14	35.09	11.74
503	2	DC 2112/05 1	Leggett 1	130	4	4	21.06	23	61	155	6.47	41.74	20.71
504	1	DC 2112/05 3	Leggett 1	128	4	2		22	77	161	6.71	41.68	16.21

Nr kombinacji	Nr rośliny	Forma mączna	Forma ojcowska	Wysokość	Liczba pędów produkcyj.	Liczba niedogonów	Data wiechowania	Długość wiechy głównej [cm]	Liczba kłosek	Liczba ziarniaków	Masa ziarniaków [g]	MTZ [g]	Masa pozostałych ziarniaków z rośliny [g]
504	2	DC 2112/05 3	Leggett 1	114	3	1		22	78	139	5.81	41.80	8.65
508	1	DC 2112/05 1	Quoll	77	4	1	8.06	22	54	109	4.5	41.28	10.26
508	2	DC 2112/05 1	Quoll	77	4	3		19	50	107	3.71	34.67	11.13
510	1	DC 2112/05 1	Wallaroo 1	113	6	4	8.06	22	39	109	4.89	44.86	23.59
510	2	DC 2112/05 1	Wallaroo 1	97	6	0	7.06	16	18	39	1.65	42.31	6.83
511	1	DC 2112/05 6	K7	150	8	10	12.06	28	92	207	9.05	43.72	55.03
512	1	Gehl 1	1028 1	145	4	1	14.06	25	81	286	6.77	23.67	12.59
513	1	Gehl 2	Nagus	131	4	1	14.06	25	67	142	3.44	24.23	7.31
514	1	HiFi 1	Arden 1	132	4	3	12.06	25	95	200	6.9	34.50	14.57
515	1	HiFi 1	Bingo 1	135	4	3	11.06	25	87	186	6.92	37.20	17.28
516	1	HiFi 1	Bingo 14	135	4	4	14.06	22	58	136	5.12	37.65	14.33
516	2	HiFi 1	Bingo 14	137	4	7	13.06	23	63	186	7.14	38.39	23.27
517	1	HiFi 1	DC 2112/05 2	138	7	5	11.06	27	67	140	5.98	42.71	38.17
519	1	HiFi 3	DC 06011-8 3	125	3	1	13.06	24	77	113	4.01	35.49	8.3
520	1	HiFi 1	DC 06011-8 5	126	3	4	13.06	25	80	149	5.52	37.05	8.06
520	2	HiFi 1	DC 06011-8 5	120	3	0	13.06	24	70	138	4.7	34.06	6.09
521	1	HiFi 4	Rajtar	142	4	5	13.06	27	98	194	7.52	38.76	15.95
521	2	HiFi 4	Rajtar	132	5	2	13.06	26	102	201	7.13	35.47	22.92
522	1	HiFi 1	Budrys	137	6	6	16.06	27	118	248	8.78	35.40	28.76
522	2	HiFi 1	Budrys	126	2	2	17.06	22	52	127	4.54	35.75	2.36
523	1	HiFi 1	Celer	127	3	3	14.06	23	68	151	5.75	38.08	7.39
523	2	HiFi 1	Celer	132	3	3	13.06	27	81	167	6.47	38.74	10.09
523	3	HiFi 1	Celer	120	2	1	13.06	24	70	116	4.61	39.74	3.28
524	1	Leggett 1	DC 2112/05 2	123	4	3	13.06	22	72	166	6.93	41.75	9.19
536	1	Pennlo 5	DC 06011-8 1	99	3	2	8.06	25	117	195	6.67	34.21	5.23
536	2	Pennlo 5	DC 06011-8 1	100	2	3	8.06	26	116	230	7.35	31.96	5.46
536	3	Pennlo 5	DC 06011-8 1	93	2	0	8.06	24	91	156	5.05	32.37	3.13
542	1	Bingo 2	417	86	6	6	18.06	24	89	153	4.94	32.29	27.17
543	1	Bingo 2	437	118	2	2	13.06	21	51	130	4.65	35.77	4.51

Nr kombinacji	Nr rośliny	Forma mateczna	Forma ojcowska	Wysokość	Liczba pędów produkcyj.	Liczba niedogonów	Data wiechowania	Długość wiechy głównej [cm]	Liczba kłosków	Liczba ziarniaków	Masa ziarniaków [g]	MTZ [g]	Masa pozostałych ziarniaków z rośliny [g]
544	1	Bingo 13	409 2	104	4	4	14.06	20	68	80	3.08	38.50	2.52
545	1	Bingo 14	411 3	130	4	4	11.06	24	92	176	6.9	39.20	13.52
545	2	Bingo 14	411 3	108	1	1	13.06	21	48	95	3.79	39.89	1.1
545	3	Bingo 14	411 3	110	3	2	13.06	18	40	70	2.45	35.00	4.65
546	1	Bingo 15	411 3	112	5	4	11.06	20	52	81	3.49	43.09	5.38
546	2	Bingo 15	411 3	112	3	3	13.06	23	71	71	2.69	37.89	7.85
547	1	Bingo 16	422 1	121	9	6	16.06	25	63	119	4.01	33.70	30.23
547	2	Bingo 16	422 1	124	3	4	16.06	22	78	150	5.05	33.67	5.42
547	3	Bingo 16	422 1	130	6	3	15.06	24	80	169	5.55	32.84	25.1
561	1	Bingo 8	HiFi 1	142	6	3	11.06	24	86	195	7.36	37.74	29.03
561	2	Bingo 8	HiFi 1	142	3	3	12.06	24	85	196	6.99	35.66	10.15
561	3	Bingo 8	HiFi 1	130	3	1	12.06	21	56	118	4.31	36.53	4.99
562	1	Bingo 1	Leggett 1	126	5	0	9.06	23	69	147	6.24	42.45	15.54
572	1	Bingo 12	Wallaroo 1	110	8	1	5.06	20	34	78	3.17	40.64	16.9
579	1	Wallaroo 3	Bingo A	102	1	1	14.06	17	17	46	1.83	39.78	1.23
580	1	Wallaroo 4	STH 9210 1	92	14	5	6.06	20	49	141	4.17	29.57	33.5

W celu potwierdzenia mieszańcowego pochodzenia wybranych 20 kombinacji przeprowadzono reakcję PCR z wykorzystaniem starterów RAPD. Analizy przeprowadzono dla wytypowanych mieszańców oraz ich form rodzicielskich. Liczba analizowanych starterów była zależna od polimorfizmu pomiędzy formami rodzicielskimi. Im niższy polimorfizm tym więcej starterów przetestowano.

Poszukiwano odcinków DNA, które ulegały amplifikacji zarówno u form ojcowskich, jak i mieszańców, natomiast nie były obecne u form matecznych (Fot.1.). Zidentyfikowano 289 takich produktów, średnio 14 na kombinację, od 4 dla kombinacji E445 do 23 dla E512 (Tab. 4).



Fot.1. Produkty RAPD uzyskane w wyniku amplifikacji u wybranych mieszańców oraz form rodzicielskich przy użyciu starterów A-7, A-8, C-7, C-9, C-16, C-20, E17. Białymi punktami oznaczono produkty potwierdzające mieszańcowy charakter kombinacji. Oznaczenia poszczególnych ścieżek: M – marker,

C16: 1 – 417, 2 – 444 – 417 × S17, 3 – S17

C7: 4 – D8, 5 – 511 – D8 × K7, 6 – K7

E17: 7 – D8, 8 – 511 – D8 × K7, 9 – K7

A7: 10 – S1, 11 – 562 – S1 × Leggett, 12 – Leggett

A8: 13 – S1, 14 – 562 – S1 × Leggett, 15 – Leggett

A7: 16 – S1, 17 – 449 – S1 × 411, 18 – 411

C9: 19 – S1, 20 – 449 – S1 × 411, 21 – 411

C20: 22 – S1, 23 – 440 – 408 × S1, 24 – 408

Tab. 4. Produkty RAPD potwierdzające mieszańcowy charakter roślin pokolenia F1.

Starter	Kombinacja mieszańcowa																			Suma mieszańców potwierdzonych przez starter		
	508 (D8×Quoll)	508 (D8×Quoll)	445 (408×S1)	512 (Gehl×Siwiek)	513 (Gehl×Nagus)	572 (Bingo× Wallaroo)	579 (Wallaroo× Bingo)	580 (Wallaroo× STH9210)	444 (407×S1)	444 (407×S1)	451 (417×S17)	451 (417×S17)	452 (417×S1)	452 (417×S1)	452 (417×S1)	562 (S1×Leggett)	449 (411 × S1)	449 (411 × S1)	440 (408 × S1)		511 (D8×K7)	
A7	650	650	0	1200	750	650	0	0	0	0	0	0	0	0	0	700	700	700	0	-	8	
A8	0	0	0	0	850	0	700	0	0	0	850	850	850	850	850	880 1100	0	0	0	0	-	8
A16	890	0	1400	1350	0	0	0	1000	890 1050	890 1050	0	1350	0	0	0	0	0	0	0	0	-	7
A18	1100	1100	0	0	0	1050	0	0	0	0	1900	1900	0	0	0	1050	0	0	0	0	-	6
B8	0	0	-	0	0	0	1400	780	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	-	2
B11	0	0	0	0	0	0	0	750	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	-	1
B19	0	0	380 500	0	0	780 850 1000	0	0	0	1000	1000	1000	0	0	0	0	0	0	0	0	-	5
C7	0	0	0	400	650	850 2000	1200	1200 1500	1200	1200	850	850	0	1100	1100	0	0	0	0	1500	-	12
C9	0	0	1500	1500	0	1500	1300	1300	0	0	0	0	0	0	0	0	650 1300	650 1300	0	0	-	7
C13	0	0	0	900 1400	0	0	0	0	900	900	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	-	3
C14	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	500	500	0	0	0	0	1100	1100	0	0	-	4
C16	800	800	0	1000	0	0	0	0	0	0	1100	1100	0	0	0	600	0	600	600	0	-	8
C20	0	0	0	550 1100	550	0	0	0	0	0	0	0	920	0	920	0	0	0	550	0	-	5
D7	0	0	0	680	0	0	0	0	0	0	0	0	980	980	980	0	0	0	0	0	-	4
D10	0	0	500	520	2200	2200	800	800	0	0	780	780	0	800	800	0	0	0	800	1900 2500	-	12
D12	1100	1100	0	0	0	0	-	-	1300	1300	1000 1500	1000 1500	-	-	-	0	0	0	0	0	-	6
D20	1500	0	-	0	0	800 1500	0	0	0	1600	0	900 1400	1400	1400	1400	0	0	0	1500 2000	0	-	8
E6	900 1800	900 1800	-	-	0	950 1200	0	0	1200	1200	-	-	-	-	-	0	0	0	950 1400	0	-	6
E9	0	0	-	0	0	0	1500	1500	0	0	1520	1520	0	0	0	0	0	0	1200 1600	1200 1450	-	6

Starter	Kombinacja mieszańcowa																			Suma mieszańców potwierdzonych przez starter		
	508 (D8×Quoll)	508 (D8×Quoll)	445 (408×S1)	512 (Gehl×Siwek)	513 (Gehl×Nagus)	572 (Bingo× Wallaroo)	579 (Wallaroo× Bingo)	580 (Wallaroo× STH9210)	444 (407×S1)	444 (407×S1)	451 (417×S17)	451 (417×S17)	452 (417×S1)	452 (417×S1)	452 (417×S1)	562 (S1×Leggett)	449 (411 × S1)	449 (411 × S1)	440 (408 × S1)		511 (D8×K7)	
E11	2000	2000	-	0	0	1400	0	1200	0	0	0	0	0	0	0	0	1000 1100 1200	0	1000 1200	700 2000	7	
E17	0	0	-	1100	0	650 1400	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1400	1400	950 1000	900 1900	6	
F2	0	0	-	2500 3000	0	1500 1900 2500 3000	0	0	0	0	0	0	950	950	950	0	0	0	0	-	5	
F3	680 1000	0	0	780 1000	2200	1000	500 1100	500 1100	0	0	1200	1200	0	0	0	0	0	0	0	0	-	8
F8	0	0	0	1400	2000	0	0	0	0	0	700	700	0	0	0	0	0	0	800	-	5	
H3	600	600	0	600 1200	0	780	1100	600	0	0	500 800	500 800	600 800	0	600 800	0	0	0	700 950	-	11	
H11	1020	1020	0	0	0	1020 2800	0	0	1000	1000	0	1000 1200 1600	0	0	0	1600	0	1100	1500	-	9	
H14	1300	1300	-	1900	0	1300	0	2000	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	-	5
H19	0	0	-	0	0	0	650	-	0	1400	0	0	1000	1000	1000	0	0	0	0	0	-	5
I3	0	0	-	550	0	0	-	1000	0	0	1000	1000	850	850	850	0	0	0	1400	-	8	
I11	0	0	-	800 900	570	450	550 710	1500	0	0	520 750	520 750	0	0	0	0	0	0	-	-	7	
I13	1200	1200	-	1200	0	1250	0	0	450 1800	450 1800	1250	1250	0	0	0	0	0	0	0	0	-	8
I18	0	0	-	-	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	-	0
K9	0	0	0	500	0	0	650	650	0	0	-	-	-	-	-	0	0	0	0	0	-	3
K10	930	930	0	630	0	1050	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	-	4
K16	650	0	-	750, 1400	0	750	0	1800	750	750	0	0	1400	1400	1400	0	0	0	0	0	-	9
Q19	0	0	0	1400	0	1300	0	0	1400	1400	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	-	4
W19	1400	1400	0	950, 1300	0	950	1500	0	0	0	1600	1600	0	1600	1600	0	0	0	950	-	10	
Suma produktów	18	13	5	31	8	31	14	17	11	14	19	26	10	10	13	6	8	7	19	9	289	
Suma starterów	16	12	4	23	8	21	12	15	9	12	16	19	9	10	12	5	5	6	13	5	232	

Celem zadania było również rozmnożenie kolejnych pokoleń mieszańców międzyodmianowych oraz międzygatunkowych w kierunku uzyskania RIL. Rozmnożono odpowiednio 656, 276 oraz 600 linii pokoleń F3, F4 i F5. W sumie zebrano 1436 pojedynczych izolatorów reprezentujących poszczególne linie.

Tab. 5. Rozmnożenie kolejnych pokoleń mieszańców.

Populacja	Rodowód	Liczebność roślin w pokoleniu			Suma roślin w populacji
		F3	F4	F5	
32	Sam × A.fatua 216	156	-	156	312
52	A.sterilis 66 × Sam	150	96	158	308
56	A.fatua 216 × Sam	166	-	286	452
101	STH 9787 × Bingo	184	180	-	364
Suma		656	276	600	1436

Wnioski

1. Uzyskane mieszańce F₁ mogą okazać się ciekawym materiałem badawczym ze względu na szereg cech pochodzących od zróżnicowanych dawców.
2. Metoda RAPD jest dostatecznie czułym narzędziem badawczym umożliwiającym potwierdzenie międzyodmianowego pochodzenia mieszańców F₁.
3. Linie wsobne wyprowadzone na bazie krzyżowań międzygatunkowych, ze względu na fragmentację genomów dawcy i biorcy oraz ich poziom wsobności są doskonałym narzędziem do badania natury cech zawartych w tych materiałach.

3. 2. Fenotypowanie wczesnych pokoleń populacji mapujących.

Cel tematu badawczego 2

Celem tematu była analiza rozszczepleni pod względem wysokości poprzez fenotypowanie populacji mapujących F₂ i F₃. W przypadku populacji F₂ przeanalizowano również: długość poszczególnych międzywęźli, długość wiechy, liczba kłosek, liczba i masa ziarniaków z wiechy oraz wczesność.

Wyniki

Szczegółowemu fenotypowaniu poddano 7 populacji mapujących (Tab. 6), których liczebność wynosiła od 65 do 273 osobników. W sumie fenotypowano 910 roślin.

Populacje E326, E337 i E366 zostały rozmnożone w celu powiększenia populacji z roku poprzedniego. Wykorzystano ziarniaki z tych samych roślin mieszańcowych co rok wcześniej.

Tab. 6. Fenotypowane populacje F₂.

Populacja mapująca pokolenie F ₂	Kombinacja mieszańcowa	Gen karłowatości	Liczba wysianych ziarniaków	Liczba fenotypowanych roślin
E326	Bingo × Penline 116	Dw7	108	90
E337	Bingo × North Carolina	Dw7	94	77
E366	Bingo × Palestine Dwarf	Dw7	80	65
E414	Kanota × Heyne Dwarf	?	200	186
E423	STH 8827 × STH 9210	Dw6	300	273
E431	Bingo S1 × Heyne Dwarf	?	101	98
E437	Heyne Dwarf × STH 8827	?/Dw6	150	121

Szczegóły analizy statystycznej analizowanych populacji F2 przedstawiono w tabelach (Tab. 7-13).

Tab. 7. Analiza statystyczna wyników fenotypowania populacji 326.

Cecha	Ilość	Minimum	Maksimum	Średnia	Odchylenie
Płodność kłoska	90	0.5	3.8	1.9	0.5
MTZ	90	8.5	39.8	27.6	8.8
Masa ziarniaków	90	0.1	9.0	2.0	1.4
Liczba ziarniaków	90	13.0	270.0	68.6	42.2
Liczba kłosków	90	13.0	108.0	36.6	18.5
Pnw*	90	2.0	28.0	15.6	5.8
Długość wiechy	90	6.0	23.0	13.2	4.0
Długość dokłosa	90	19.0	54.0	35.7	7.7
Wysokość	90	42.0	113.0	78.5	15.3

*Pnw – odległość podstawy wiechy od podstawy liścia flagowego

Tab. 8. Analiza statystyczna wyników fenotypowania populacji 337.

Cecha	Ilość obserwacji	Minimum	Maksimum	Średnia	Odchylenie standardowe
Płodność kłoska	77	0.1	2.5	1.4	0.6
MTZ	77	10.0	44.1	25.4	12.0
Masa ziarniaków	77	0.0	5.5	1.2	1.1
Pnw	77	-7.0	23.0	5.5	7.2
Liczba ziarniaków	77	1.0	105.0	39.1	23.7
Liczba kłosków	77	6.0	66.0	28.6	13.6
Długość wiechy	77	5.0	30.0	13.1	4.2
Długość dokłosa	77	6.0	52.0	23.7	9.6
Średnica II międzywęźla	77	0.4	8.0	4.8	1.3
L-ba dni do kłoszenia	77	52.0	99.0	68.6	8.8
Liczba niedogonów	77	0.0	9.0	2.4	1.8
Płodność kłoska	77	0.1	2.5	1.4	0.6
Liczba pędów produk.	77	1.0	8.0	3.0	1.6
Wysokość	77	27.0	95.0	61.9	19.3

Tab. 9. Analiza statystyczna wyników fenotypowania populacji 366.

Cecha	Ilość obserwacji	Minimum	Maksimum	Średnia	Odchylenie standardowe
Płodność kłoska	65	0.0	2.1	0.9	0.6
MTZ	65	0.0	38.9	24.2	12.8
Masa ziarniaków	65	0.0	5.2	1.0	1.0
Liczba ziarniaków	65	0.0	170.0	34.7	33.1
Liczba kłosków	65	8.0	84.0	36.7	19.0
Pnw	65	-10.0	22.0	2.5	5.9
Długość wiechy	65	5.0	28.0	13.2	4.5
Długość dokłosa	65	9.0	47.0	20.6	7.2
Średnica II międzywęźla	65	0.3	7.8	5.1	1.7
L-ba dni do kłoszenia	64	37.0	99.0	74.0	10.0
Liczba niedogonów	65	0.0	7.0	0.8	1.1
Liczba pędów produk.	65	1.0	10.0	1.7	1.5
Wysokość	65	32.0	118.0	63.2	16.7

Tab. 10. Analiza statystyczna wyników fenotypowania populacji 414.

Cecha	Ilość obserwacji	Minimum	Maksimum	Średnia	Odchylenie standardowe
Płodność kłoska	186	0.7	4.3	2.3	0.5
MTZ	186	18.5	42.4	30.4	7.3
Masa ziarniaków	186	0.2	3.9	2.2	0.8
Liczba ziarniaków	186	13.0	142.0	72.8	24.6
Liczba kłosek	186	9.0	58.0	31.2	9.0
Pnw	186	12.0	45.0	31.2	6.2
Długość wiechy	186	10.0	37.0	21.6	3.3
Długość dokłosa	186	12.0	73.0	54.4	8.2
Średnica II międzywęzła	186	1.8	6.2	4.6	0.7
L-ba dni do kłoszenia	186	33.0	68.0	40.6	4.3
Liczba niedogonów	186	1.0	25.0	6.0	3.2
Liczba pędów produk.	186	1.0	15.0	5.2	2.5
Wysokość	186	91.0	155.0	128.8	12.4

Tab. 11. Analiza statystyczna wyników fenotypowania populacji 423.

Cecha	Ilość obserwacji	Minimum	Maksimum	Średnia	Odchylenie standardowe
Płodność kłoska	273	0.9	3.6	2.2	0.4
MTZ	273	20.7	46.4	32.7	4.0
Masa ziarniaków	273	1.0	10.3	4.9	1.6
Liczba ziarniaków	273	46.0	270.0	150.3	45.8
Liczba kłosek	273	23.0	120.0	67.3	17.6
Pnw	273	0.0	19.0	8.8	3.5
Długość wiechy	273	14.0	29.0	20.7	2.5
Długość dokłosa	273	9.2	43.0	32.5	4.6
Średnica II międzywęzła	273	2.3	8.7	6.3	0.9
L-ba dni do kłoszenia	273	43.0	79.0	49.8	4.3
Liczba niedogonów	273	0.0	9.0	2.7	1.8
Liczba pędów produk.	273	1.0	9.0	2.9	1.2
Wysokość	273	54.0	112.0	82.1	8.3

Tab. 12. Analiza statystyczna wyników fenotypowania populacji 431.

Cecha	Ilość obserwacji	Minimum	Maksimum	Średnia	Odchylenie standardowe
Płodność kłoska	98	0.4	3.0	2.1	0.5
MTZ	98	20.6	47.3	36.2	4.3
Masa ziarniaków	98	0.1	8.9	3.7	1.7
Liczba ziarniaków	98	4.0	269.0	100.9	46.8
Liczba kłosek	98	11.0	104.0	46.7	17.1
Pnw	98	16.0	44.0	29.8	5.5
Długość wiechy	98	9.0	30.0	20.5	3.8
Długość dokłosa	98	30.0	66.0	52.8	7.5
Średnica II międzywęźla	98	3.0	8.2	5.5	0.9
L-ba dni do kłoszenia	98	34.0	55.0	41.2	3.7
Liczba niedogonów	98	0.0	19.0	4.2	3.3
Liczba pędów produk.	98	1.0	20.0	5.1	2.9
Wysokość	98	75.0	150.0	124.5	14.2

Tab. 13. Analiza statystyczna wyników fenotypowania populacji 437.

Cecha	Ilość obserwacji	Minimum	Maksimum	Średnia	Odchylenie standardowe
Płodność kłoska	121	0.6	3.1	2.0	0.6
MTZ	121	13.1	39.2	27.8	7.4
Masa ziarniaków	121	0.2	6.0	2.5	1.4
Liczba ziarniaków	121	16.0	185.0	86.8	41.1
Liczba pędów produk.	121	1.0	17.0	5.5	2.7
Liczba kłosek	121	17.0	71.0	41.6	13.2
Pnw	121	0.0	39.0	13.4	8.0
Długość wiechy	121	8.5	25.0	17.5	3.5
Długość dokłosa	121	18.5	65.0	33.0	9.4
Średnica II międzywęźla	121	2.7	7.0	5.0	1.0
L-ba dni do kłoszenia	121	37.0	61.0	45.0	5.1
Liczba niedogonów	121	0.0	20.0	4.4	3.7
Wysokość	121	51.0	139.0	81.3	21.5

Oceniono również dopasowanie rozkładu każdej z cech w populacjach pokolenia F2 do rozkładu normalnego wykorzystując dwa testy statystyczne: Kolmogorowa-Smirnowa oraz test chi2 (Tab. 14). Rozkładem normalnym niemal w każdej populacji, w obu testach charakteryzowały się: wysokość, liczba kłosek i ziarniaków oraz płodność kłosa.

Tab. 14. Zestawienie statystyk dopasowania cechy do rozkładu normalnego. Zastosowano test Kolmogorowa-Smirnowa oraz test chi2 ('+' dopasowanie; '-' brak dopasowania do rozkładu)

Cecha / Populacja	Wysokość	Liczba pedów produkcyjnych	Liczba niedogonów	Liczba dni do kłoszenia	Średnica II międzywęzła	Długość doklosia	Długość wiechy	PNW	Liczba kłasków	Liczba ziarniaków	Masa ziarniaków	MTZ	Płodność kłosa
326	+/+	b.d.	b.d.	b.d.	b.d.	+/+	+/+	+/-	+/-	+/-	+/-	+/-	+/-
337	+/-	-/-	-/-	+/-	+/-	+/+	+/-	+/-	+/-	+/+	-/-	-/-	+/+
366	+/-	-/-	-/-	+/-	+/-	+/-	+/-	+/-	+/+	-/-	-/-	-/-	+/+
414	+/+	-/-	-/-	-/-	-/-	+/-	-/-	+/-	+/+	+/+	+/+	-/-	+/-
423	+/-	-/-	-/-	-/-	+/-	-/-	-/-	+/-	+/-	+/+	+/-	+/-	-/-
431	+/-	-/-	-/-	-/-	+/-	+/-	-/-	+/+	+/-	+/-	+/+	+/-	+/-
437	-/-	-/-	-/-	-/-	+/-	-/-	+/+	-/-	+/+	+/+	+/-	+/-	+/+

Celem zadania było także fenotypowanie linii F3 dziewięciu wybranych populacji mapujących. Liczebność linii w poszczególnych populacjach wynosiła od 92 (E336) do 500 (E310) (Tab. 15). W sumie fenotypowano 1423 poletka F3. W poszczególnych populacjach segregowały geny karłowatości Dw6, Dw7 oraz niezidentyfikowany recesywny gen karłowatości w populacji E328. Oceniono termin wiechowania oraz wysokość poszczególnych linii. Ilość linii homozygotycznych, nie rozszczepiających się pod względem wysokości przedstawiono w tabeli. Na podstawie obserwacji F3 można określić stosunek rozszczepień w F2. Wszystkie segregacje odpowiadały stosunkowi rozszczepień genotypów 1:2:1.

Tab. 15. Fenotypowane populacje F3.

Populacja mapująca pokolenie F ₃	Kombinacja mieszańcowa	Gen karłowatości	Liczba homozygot		Liczba heterozygot	Liczebność całej populacji
			niskich	wysokich		
101	Bingo × STH 9787	Dw6	56	33	95	184
261	291/11/ 211 × STH 9787	Dw6	25	26	59	110
265	291/11/214 × STH 9210	Dw6	22	27	58	107
310	Celer × STH 9210	Dw6	122	121	257	500
326	Bingo × Pennline 116	Dw7	23	33	53	109
328	Bingo × Pennline 6571	?	26	33	40	99
336	Bingo × STH 8827	Dw6	25	17	50	92
337	Bingo × North Carolina	Dw7	20	23	63	106
366	Bingo × Palestine Dwarf	Dw7	26	29	61	116

Wnioski

1. Analiza cech wykazała że w zdecydowanej większości mają one rozkład normalny lub zbliżony do normalnego co może się okazać istotne podczas mapowania cech ilościowych.
2. Liczne populacje mapujące z genami cech np. karłowatości mogą być ciekawym modelem genetycznym do badania wpływu tła genetycznego na ekspresję tych samych genów oraz kształtowanie fenotypu roślin.

3. 3. Genotypowanie z wykorzystaniem metody DArTseq.

Cel tematu badawczego 3

Celem tematu było przeprowadzenie analizy DArTseq 180 genotypów – linii i odmian owsa przeznaczonych do mapowania asocjacyjnego oraz 180 linii reprezentujących populację mapującą E 326 z genem karłowatości *Dw7*.

Formy przeznaczone do mapowania asocjacyjnego wybrano na podstawie wyników uzyskanych metodą DArT w latach poprzednich oraz w oparciu o dane fenotypowe otrzymane w roku 2014.

Z uwagi na lepszą segregację fenotypów w populacji E 337, która reprezentuje kombinację mieszańcową Bingo × North Carolina (*Dw7*) zastąpiono nią populację E326.

Wyniki

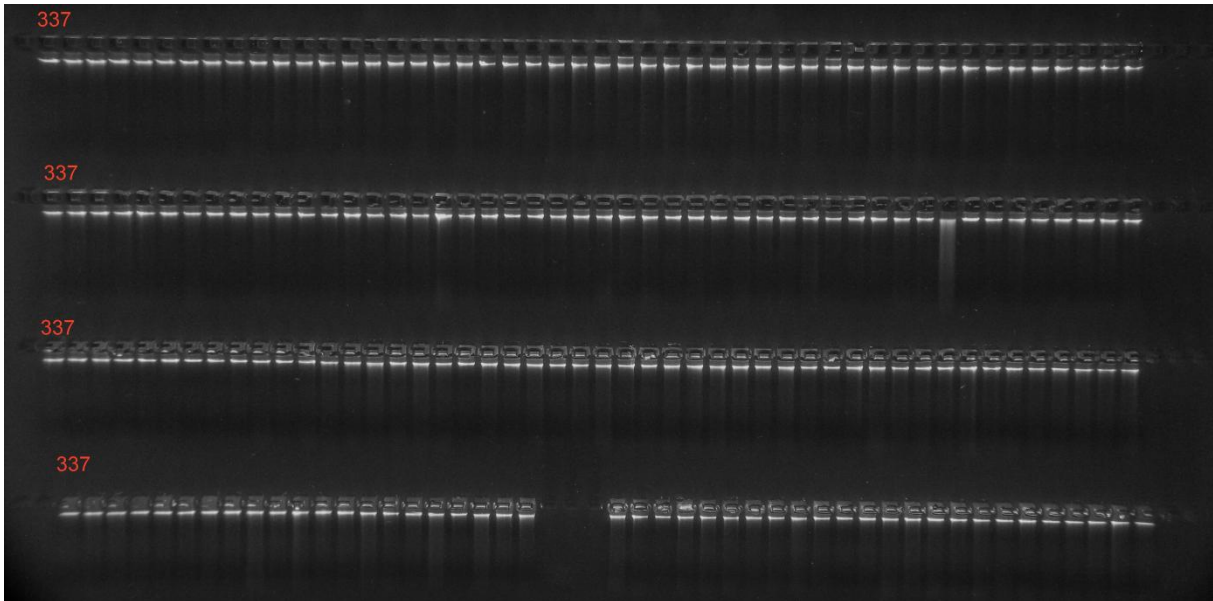
Owies zwyczajny jest gatunkiem heksaploidalnym o złożonym genomie. Z tego względu liczba dostępnych map genetycznych jest ograniczona, a brak zagęszczonych map konsensusowych utrudnia identyfikację markerów genetycznych możliwych do wykorzystania w selekcji materiałów hodowlanych pod względem różnych cech użytkowych. Zastosowanie mapowania asocjacyjnego umożliwi wytypowanie uniwersalnych markerów DNA ukierunkowanych na cechy użytkowe również u owsa zwyczajnego. Do mapowania asocjacyjnego wykorzystuje się zróżnicowane pod względem pożądanych cech zaawansowane linie wsobne. Materiał roślinny poddawany jest szczegółowemu fenotypowaniu i genotypowaniu. Mapowanie asocjacyjne polega na określeniu asocjacji markerów genetycznych z cechami użytkowymi. Dzięki takiemu podejściu możliwa staje się identyfikacja licznych markerów asocjowanych z QTL cechy.

W oparciu o dane genotypowe uzyskane metodą DArT w latach 2011 i 2012 oraz obserwacje polowe 3 wybranych cech fenotypowych realizowane w ramach zadania 3.4. przeprowadzono mapowanie asocjacyjne 300 odmian i linii owsa zwyczajnego. Mapowanie asocjacyjne wykonano bazując na pakietach R-CRAN wykorzystując wielokrotny model liniowy (MLM - multiple linear model). Zidentyfikowano ok. 61 markerów DArT o zróżnicowanym stopniu asocjacji z badanymi cechami. Na podstawie uzyskanych wyników podjęto wstępną decyzję odnośnie doboru 180 spośród 636 form przeznaczonych do mapowania asocjacyjnego. Dla 180 wybranych obiektów przeprowadzono izolację DNA.

Izolację DNA przeprowadzono z wykorzystaniem komercyjnych zestawów do izolacji (Sigma Aldrich), niemniej jednak zalecaną przez dostawcę zestawu procedurę izolacji dostosowano do uzyskania jak największej wydajności przy zachowaniu jak najlepszych parametrów DNA. Zmieniono m.in. czasy inkubacji, tempo wirowania kolumn, czasy suszenia kolumn, sposób wymywania DNA z kolumny.

Stężenie i czystości wyizolowanego DNA oceniono spektrofotometrycznie. Zakres stężeń wyniósł od 102 ng/μl do 480 ng/μl. Każdą z próbek doprowadzono do stężenia 100 ng/μl. Przygotowane w ten sposób próby przechowywano w temperaturze -25°C. W przypadku niezadowolającej czystości próby, czyli przy wartości współczynnika A260/A23 poniżej 1,8 próby poddawano ponownej precypitacji w etanolu (99,98%) z 10% ostanu sodu (5M AcNa pH5.3).

Integralność DNA sprawdzano w procesie elektroforezy. Na żel nakładano po 1 μl roztworu o stężeniu 100 ng/μl (Fot. 2). W przypadku izolacji z liofilizatów liści integralność DNA była zdecydowanie gorsza, niemniej jednak wszystkie próby przeszły pozytywnie test przeprowadzany przez wykonawcę analiz DArT dopuszczający do zastosowania procedury.



Fot. 2. Wyizolowane DNA dla populacji E337.

500 ng genomowego DNA reprezentującego wytypowane genotypy wysłano na 96 dołkowych płytkach Eppendorff w celu identyfikacji polimorfizmu DArTseq.

Uzyskane macierze binarne dla odmian i linii przeznaczonych do mapowania asocjacyjnego stanowią wynik częściowy zostaną opracowane statystycznie po uzyskaniu kompletnej macierzy danych dla wszystkich genotypów przeznaczonych do mapowania asocjacyjnego. Surowa matryca zawiera 34638 SNP - polimorficznych markerów DArTseq, odpowiadających 17319 sekwencjom.

Surowa matryca binarna dla populacji mapującej E337 zawiera 23564 SNP - polimorficznych markerów DArTseq, co odpowiada 11782 sekwencjom. Macierz binarna ograniczona do 2518 sekwencji została wykorzystana w ramach zadania 3.5 do konstrukcji mapy genetycznej.

Wnioski

1. Metoda DArTseq umożliwiła uzyskanie dużej liczby markerów molekularnych użytecznych do mapowania genetycznego. Jednak ze względu na ograniczenia programów komputerowych oraz mocy przerobowych komputerów liczba markerów została ograniczona do około trzech tysięcy.

3. 4. Analiza podstawowych walorów rolniczych roślin i badanie parametrów plonu linii i odmian uczestniczących w analizach asocjacyjnych.

Cel tematu badawczego 4

Celem tematu było określenie podstawowych walorów rolniczych i parametrów plonu odmian i linii uczestniczących w analizach asocjacyjnych.

Wyniki

Doświadczenie założono dla 636 obiektów, które stanowiły reprezentatywną próbę polskich materiałów hodowlanych i odmian owsa oraz materiałów zagranicznych, które są źródłem pożądanej zmienności. Na podstawie obserwacji i wyników ilość obiektów poddawanych fenotypowaniu w roku kolejnym zostanie zredukowana do ok. 500, które będą charakteryzowały się największym zróżnicowaniem i będą stanowić reprezentację zmienności obecnej w polskich materiałach hodowlanych oraz w materiałach zagranicznych wykorzystywanych w polskiej hodowli.

Wszystkie analizowane cechy charakteryzowały się dużą zmiennością (Tab. 16).

Tab. 16. Analiza statystyczna wyników fenotypowania 636 odmian i linii przeznaczonych do mapowania asocjacyjnego.

Cecha	Ilość obserwacji	Minimum	Maksimum	Średnia	Odchylenie standardowe
Plon [$t \cdot ha^{-1}$]	636	0.2	0.9	0.6	0.1
% łuski	636	0.0	37.0	24.4	7.1
MTZ [g]	636	21.0	52.0	37.2	5.2
Gęstość ziarna [$kg \cdot hl^{-1}$]	636	35.0	68.0	50.7	3.8
Wysokość [cm]	636	65.0	150.0	108.1	13.6
Odporność na mączniaka	635	1	9	4.3	1.4
Odporność na rdzę koronową	634	2	9	6.4	1.7

Określano ilość obiektów w poszczególnych zakresach dla analizowanych cech (Tab. 17). W przypadku MTZ jego wartość wynosiła od 21 do 52 g, zaś wysokość zawierała się w przedziale od 65 do 150 cm. Niemniej jednak niemal połowa obiektów charakteryzowała się MTZ w przedziale 35-40g. Z kolei 367 linii i odmian miała wysokość w przedziale od 100 do 120 cm (Rys. 1). U 140 obiektów wysokość wyniosła poniżej 100 cm. Rozpatrując odporność na choroby, aż u 200 form stwierdzono zadowalającą odporność na rdzę koronową zawierającą się w przedziale 7-9. Porażenie mączniakiem było wysokie, a odpornością w zakresie 7-9 charakteryzowały się zaledwie 3 objekty.

Tab. 17. Rozkład poszczególnych wartości cech wśród analizowanej populacji 636 obiektów przeznaczonych do mapowania asocjacyjnego.

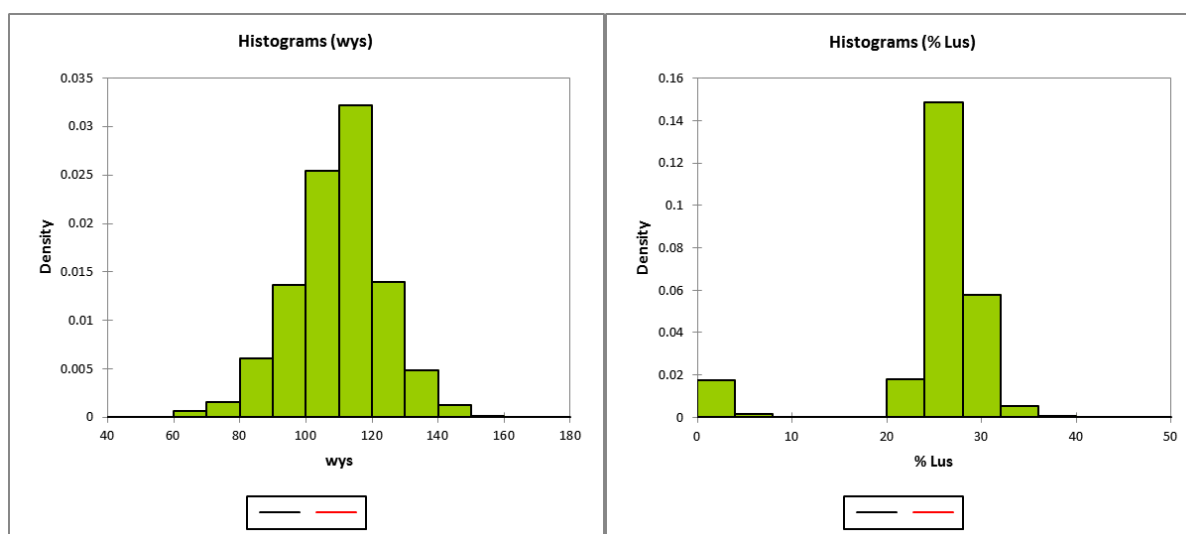
Cecha: Wysokość [cm]			Cecha: % łuski			Cecha: Plon		
Zakres wartości cechy		Ilość genotypów	Zakres wartości cechy		Ilość genotypów	Zakres wartości cechy		Ilość genotypów
60	70	4	0	4	45	0.2	0.28	18
70	80	10	4	8	4	0.28	0.36	40
80	90	39	8	12	1	0.36	0.44	55
90	100	87	12	20	0	0.44	0.52	102
100	110	162	20	24	46	0.52	0.6	121
110	120	205	24	28	378	0.6	0.68	149
120	130	89	28	32	147	0.66	0.74	116
130	140	31	32	36	13	0.74	0.82	61
140	150	9	36	40	2	0.82	0.9	10

Cecha: Gęstość ziarna [hl/kg]		
Zakres wartości cechy		Ilość genotypów
35	40	2
40	45	19
45	50	200
50	55	354
55	60	40
60	65	15
65	70	6

Cecha: MTZ[g]		
Zakres wartości cechy		Ilość genotypów
20	25	16
25	30	42
30	35	94
35	40	278
40	45	167
45	50	36
50	55	3

Cecha: Odporność na rdzę [1-9]		
Zakres wartości cechy		Ilość genotypów
2	3	1
3	4	18
4	5	71
5	6	118
6	7	134
7	8	127
8	9	61
9	10	104

Cecha: Odporność na mączniaka [1-9]		
Zakres wartości cechy		Ilość genotypów
1	2	3
2	3	43
3	4	128
4	5	212
5	6	154
6	7	58
7	8	16
8	9	10
9	10	11



Rys. 1. Wykresy przedstawiające rozkład wysokości i procentowej zawartości łuski..

Wnioski

1. Analiza cech powiązanych z plonem oraz chorobami wykazała, że badane materiały wykazują duże zróżnicowanie.
2. Przeprowadzona ocena może być wykorzystana w mapowaniu asocjacyjnym.

3. 5. Konstrukcja map genetycznych.

Cel tematu badawczego 5

Celem tematu była konstrukcja mapy genetycznej dla populacji E337 ('Bingo' × 'North Carolina') segregującej pod względem wysokości z uwagi na obecność genu *Dw7* w jednej z form rodzicielskich ('North Carolina').

Wyniki

Populację E337 profilowania za pomocą 2518 markerów DArTseq. Uzyskano 25 grup sprzężeń (Tab 1) (Rys. 7), przy czym liczba markerów w poszczególnych grupach wahała się od 6 do 54. Mapa genetyczna rozciąga się na 3952 cM. Średnie zagęszczenie markerami wyniosło 1 marker na 6 cM. W obrębie grup sprzężeń występowały obszary (gap'y) wolne od markerów. Obszary te zajęły łącznie około 1128 cM. Opracowana mapa szkieletowa składa się z 669 cM. Analiza niezrównoważenia sprzężeń wykazała, że wartość krytyczna niezrównoważenia sprzężeń, wahała się w przedziale 0.1 - 0.37. Tym wartościom odpowiadał dystans pomiędzy markerami z przedziału 0.1-0.3 z wartością średnią dla wszystkich grup wynoszącą 0.16.

Tab 18. Zestawienie danych opisujących mapę genetyczną dla populacji E337 ('Bingo' × 'North Carolina')

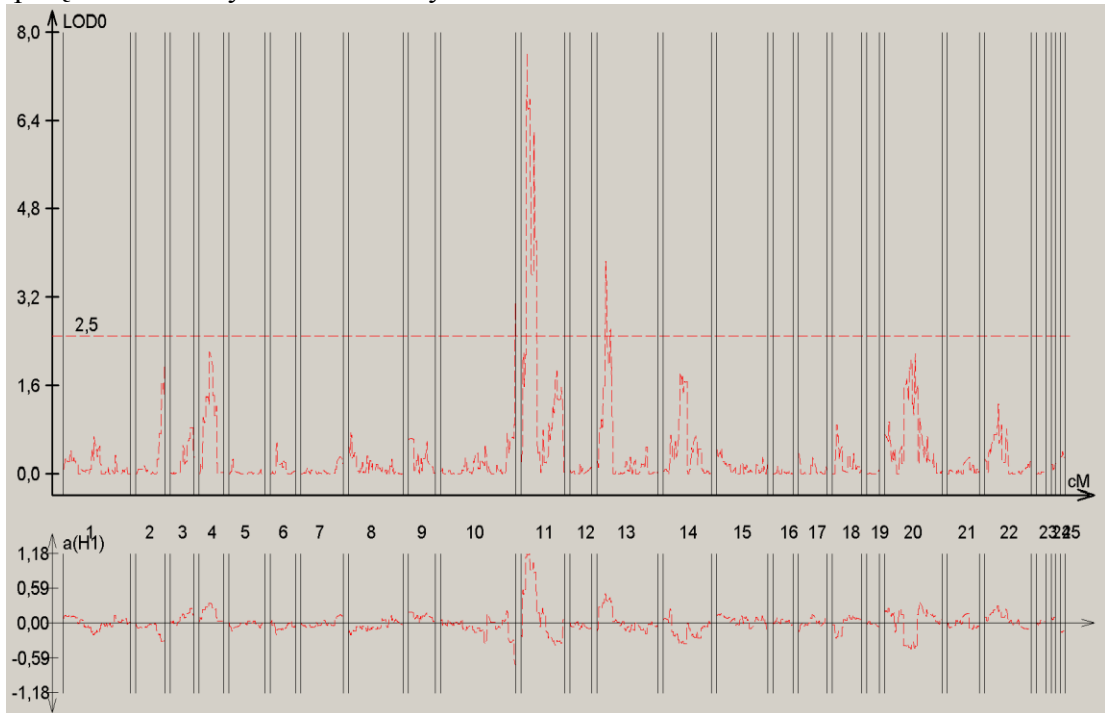
Grupa	Liczba markerów	Dystans (cM)	Gapy
LG1	49	301,29	0
LG2	21	130,77	19,72
LG3	20	107,13	13,86
LG4	19	108,51	15,13
LG5	20	166,58	32,09
LG6	20	114,67	16,53
LG7	29	189,51	11,34
LG8	51	241,43	12,61
LG9	18	126,81	22,96
LG10	54	338,11	21,44
LG11	36	195,32	13,93
LG12	19	100,86	10
LG13	54	270,58	11
LG14	41	215,49	12,78
LG15	38	233,22	21,65
LG16	18	90,26	11,07
LG17	19	130,18	16,43
LG18	23	129,81	10,27
LG19	9	59,37	14,03
LG20	37	258,42	11,12
LG21	23	149,93	30,77
LG22	30	210,15	10,43
LG23	8	44,45	13,93
LG24	6	20,69	0
LG25	7	18,71	0
Suma	669	3952,25	1128,35

Mapowanie kompozytowe umożliwiło identyfikację trzech potencjalnych QTL wysokości w obrębie grup sprzężeń 10 (LOD ~5.8), 11 (LOD ~14.5) i 22 (LOD ~4.8) (Rys. 2). Pierwszy QTL zajmuje obszar ok 80 cM, drugi około 40cM a trzeci 20 cM. Za kształt wiechy odpowiadają obszary genomu znajdujące się w grupach 10 (LOD 3.2), 11 (LOD ~8) i 13 (LOD ~4) (Rys. 3). Pierwszy QTL rozciąga się na obszarze 5cM, drugi 40 cM a trzeci ok 5 cM. W obrębie wymienionych QTL występują liczne markery SNP. QTL PNW występuje w obrębie grupy 11 (LOD ~14.5; 20 cM) i 10 (LOD ~9; 10cM) (Rys. 4). Wczesność jest warunkowana genami z grupy 10 (LOD ~15; 50cM) (Rys. 5), natomiast dokłóse jest kodowane przez QTLe z grupy 6 (LOD ~4; 10 cM), 10 (LOD 4; 50cM) i 11 (LOD ~19; 50cM) (Rysunek 6). Praktycznie we wszystkich przypadkach obszary QTL omawianych cech są relatywnie dobrze wysycane markerami molekularnymi.

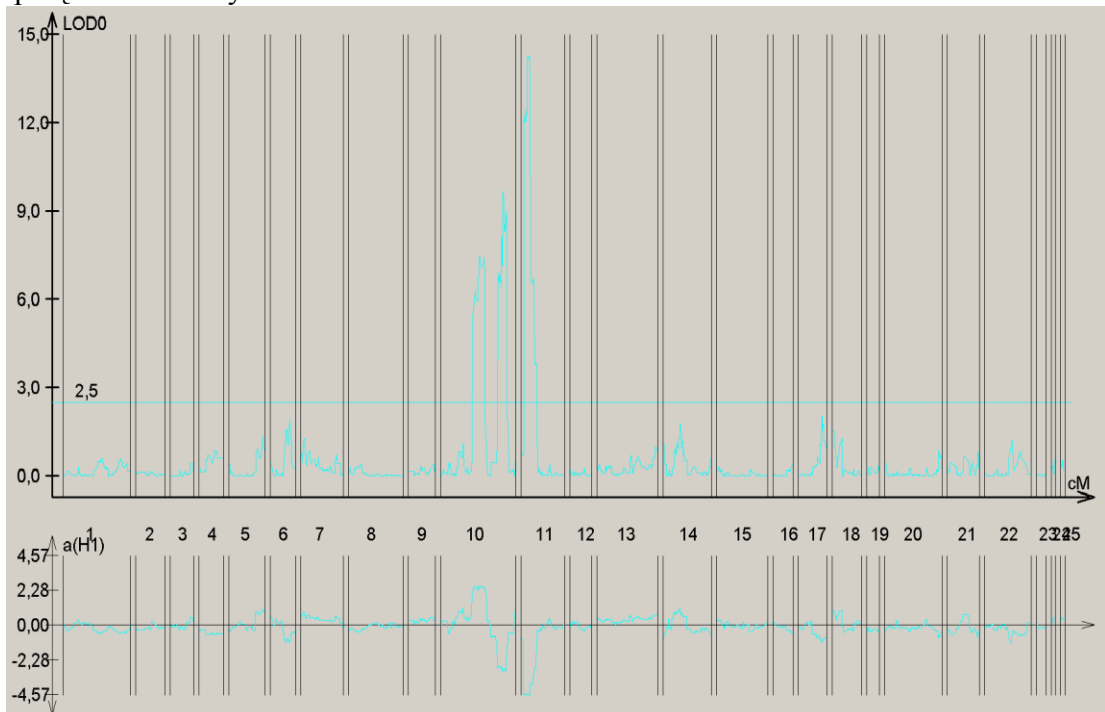
Rys 2. Zestawienie wyników mapowania kompozytowego dla wszystkich grup sprzężeń dla cechy: Wysokość roślin.



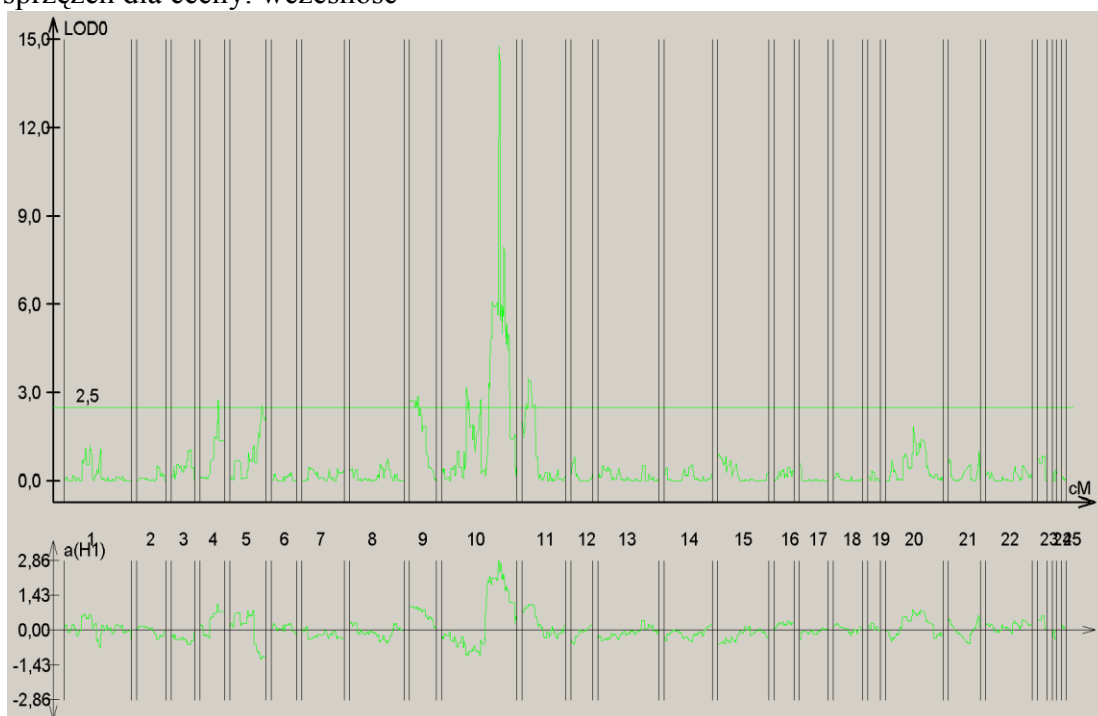
Rysunek 3. Zestawienie wyników mapowania kompozytowego dla wszystkich grup sprzężeń dla cechy: kształt wiechy.



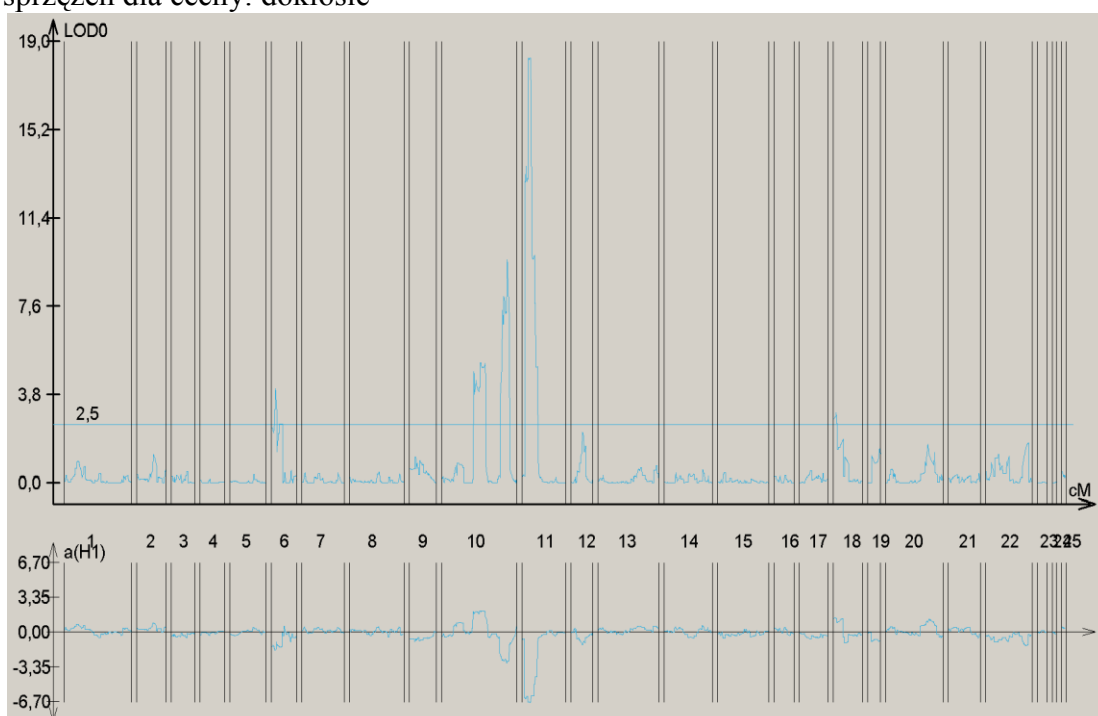
Rysunek 4. Zestawienie wyników mapowania kompozytowego dla wszystkich grup sprzężeń dla cechy: PNW



Rysunek 5. Zestawienie wyników mapowania kompozytowego dla wszystkich grup sprzężeń dla cechy: wczesność



Rysunek 6. Zestawienie wyników mapowania kompozytowego dla wszystkich grup sprzężeń dla cechy: dokłósie



Wnioski

1. Opracowano mapę genetyczną populacji E337 ('Bingo' × 'North Carolina') użyteczną do mapowania ilościowego składającą się z liczby grup sprzężeń zbliżonej do liczby chromosomów owsa. Przy czym uzyskane zagęszczenie markerami jest niedostateczne do precyzyjnej identyfikacji markerów cech ilościowych. Większy stopień zagęszczenia zagwarantuje wyprowadzenie kolejnych pokoleń wsobnych poprzez zwiększenie częstości rekombinacji oraz analiza większej liczby osobników tej populacji w kolejnych latach.
2. Ze względu na brak informacji o lokalizacji markerów DArTseq na chromosomach owsa, na obecnym etapie badań określenie, które grupy sprzężeń odpowiadają którym chromosomom gatunku jest utrudnione. Takie prace są możliwe do realizacji o ile dostępne będą dane o mikrosynteni lub poprzez wykonanie mapowania genetycznego z wykorzystaniem markerów SSR o znanej lokalizacji chromosomowej.
3. Brak danych o przypisaniu grup sprzężeń do chromosomów gatunku nie stanowi przeszkody w realizacji mapowania ilościowego.
4. Mapowanie kompozytowe umożliwiło identyfikację obszarów genomu owsa odpowiedzialnych za ekspresje badanych cech. Większość z nich lokalizowało się w obrębie 10 i 11 grupy sprzężeń, co sugeruje możliwość powiązania cech.
5. Wskazano jest zwiększenie rozdzielczości map genetycznych poprzez wyprowadzenie kolejnych pokoleń RIL celem zawężenia obszarów QTL i identyfikacji markerów z nimi silnie sprzężonych.
6. Ze względu na wysycenie obszarów QTL markerami molekularnymi oraz duże obszary genomu jakie one zajmują, mapowanie asocjacyjne nie zostało przeprowadzone, gdyż nie dostarczyłoby istotnie nowych danych.

3. 6. Identyfikacja markerów cech.

Cel tematu badawczego 6

Celem tematu była identyfikacja markerów DArTseq dla genu *Dw6* w populacji E310 (Celer × STH9210) i ich konwersja do warunków specyficznego PCR. Przetestowane na populacji E310 zostały również specyficzne startery opracowane dla populacji E101 w roku poprzednim w ramach projektu „Profilowanie molekularne metodą DArT odmian i linii owsa zwyczajnego wykorzystywanych w hodowli twórczej oraz wyprowadzanie populacji mapujących”.

Wyniki

Na podstawie obserwacji wysokości linii F_3 populacji E310 przeprowadzonych w ramach tematu badawczego 4.1. ustalono genotyp roślin F_2 . Spośród roślin dla których przeprowadzono analizy DArTseq w roku 2013 zidentyfikowano homozygoty dominujące (*Dw6Dw6*) oraz homozygoty recesywne (*dw6dw6*). Analizę segregacji markerów DArTseq prowadzono pod kątem identyfikacji tych markerów, których segregacja odpowiadała genotypom poszczególnych roślin. Zidentyfikowano 11 potencjalnych sekwencji (Tab. 19).

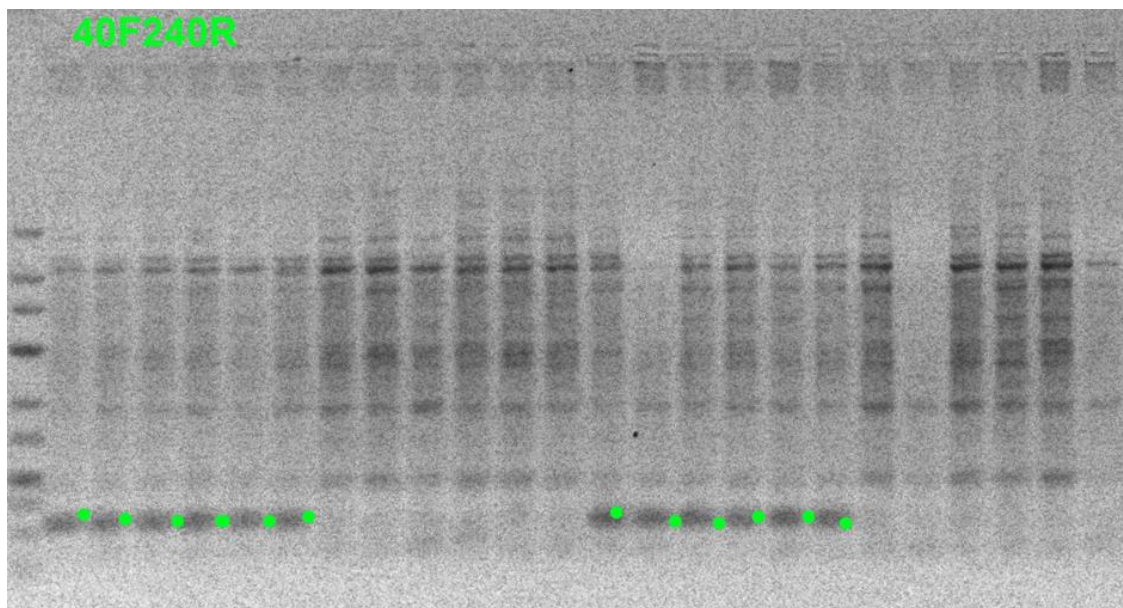
Dla 5 z sekwencji zaprojektowano startery typu ASA, identyfikujące allel recesywny lub dominujący danego markera (Tab. 21). Spośród potencjalnych sekwencji markerowych 3 sekwencje wystąpiły wcześniej w populacji E101 zawierającej gen karłowatości Dw6 (Tab. 20). Segregacja SNP w obrębie tych sekwencji w populacji E101 również odpowiadała wysokości roślin. W kolejnym etapie przeanalizowano sekwencje silicoDArT, wśród których zidentyfikowano 4 sekwencje segregujące zgodnie z wysokością roślin. Wszystkie sekwencje segregowały w sposób prawidłowy również w populacji E101. Niemniej jednak są to markery dominujące nie pozwalające na odróżnienie heterozygot od homozygot. Na podstawie sekwencji silicoDArT zaprojektowano startery do reakcji typu STS.

Tab. 21. Zaprojektowane startery do reakcji typu ASA i STS.

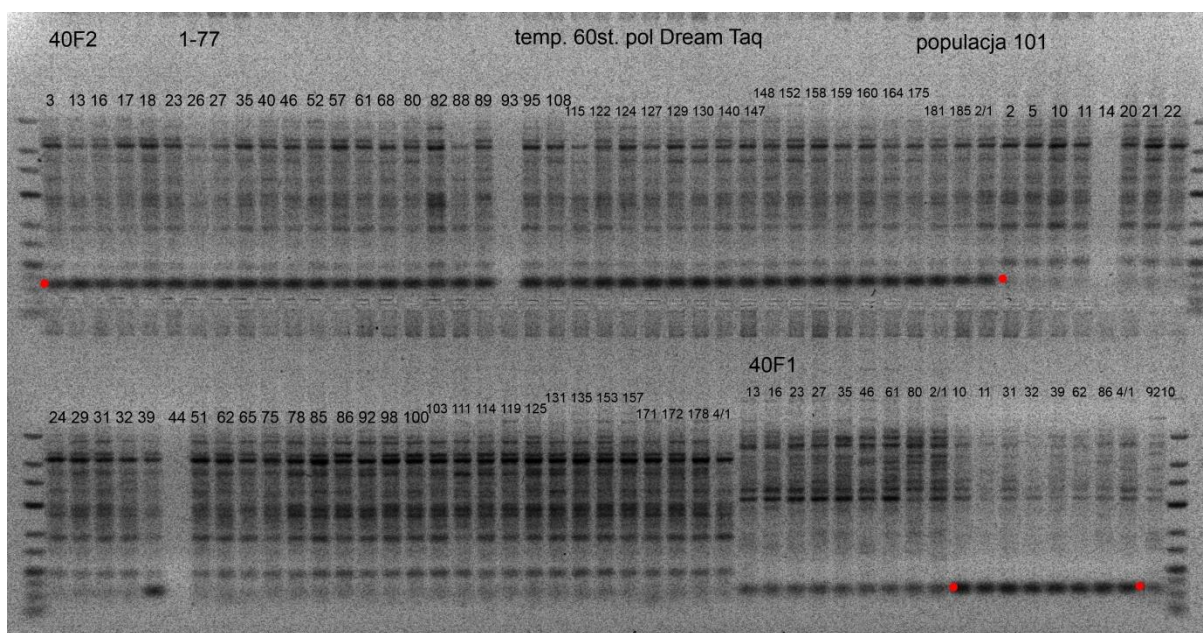
Lp.	Nr laboratoryjny	Nazwa sekwencji	Sekwencja startera: (5' - 3')	Tm
1	3_F1	6152_F1	GCAGCCTCGCCGAAAACCCT	73.5
2	3_F2	6152_F2	GCAGCCTCGCCGAAAACCCC	75.7
3	3_R	6152_R	GGTGGAGGACTGTAGAGCTTG	62.8
4	5_F	1681_F	GCTGCCGCATGCGCATCTCT	75.2
5	5_R1	1681_R1	CAGCAGCAGCAGGTGGGCT	71.5
6	5_R2	1681_R2	CAGCAGCAGCAGGTGGGCC	74.1
7	20_F	3456430_F	CTGCCTACAGGGTCA	52.9
8	20_R1	3456430_R1	TGGTCTCGTGTCCAG	53.9
9	20_R2	3456430_R2	TGGTCTCGTGTCCCTG	53.9
10	28_F1	372_F1	CACATAGACCTCTTGAATT	51.2
11	28_F2	372_F2	GGAATTACAATGGTGGTT	54.4
12	28_R	372_R	GGAATTACAATGGTGTTT	51.8
13	29_F	1500_F	GCGTTGGGATGGATAT	56.5
14	29_R	1500_R	GATTCCATGAGTCCGAT	55.4
15	30_F	1681_F	AGCTACTGCTGCTGCC	57.7
16	30_R	1681_R	GCAGGTGGGCTATGCG	64.3
17	31_F	15540_F	GTGGCTGTTGACCTATT	52.9
18	31_R	15540_R	CCCTGACAAAGTGCTTA	54.4
19	32_F	22485_F	GCTTTCGTATGGAACA	52.2
20	32_R	22485_R	GATCTCGGAAGAAACG	53.5
21	33_F1	34850_F1	GGGACAAAACATCAAAGT	54.6
22	33_F2	34850_F2	GGGACAAAACATCAAAC	54.6
23	33_R	34850_R	CATGTTCTTCGTTGGTT	54.0
24	34_F1	51018_F1	TTAACCACAGAGAAACGATT	56.3
25	34_F2	51018_F2	TTAACCACAGAGAAAAGATT	53.0
26	34_R	51018_R	ATCTCGGCTGATCTTAATTC	57.4
27	35_F	51100_F	CTCCCTGTCAAGCAAGC	59.7
28	36_F	61840_F	GATCTGTGCATCCAAGGT	58.5
29	36_R	61840_R	TCTCGGTCACCACCAT	58.3
30	37_F	3455557_F	CTCCTCCTCCTCCTCCTC	60.5
31	37_R	3455557_R	CTCGGGCCAGCAACAG	64.6
32	38_F	3457680_F	TGCAGATGAATATAAGAAGGTCGA	63.5
33	38_R1	3457680_R1	CCGATCTCGGGCACGC	69.6
34	38_R2	3457680_R2	CCGATCTCGGGCACGA	67.7
35	39_F	3457780_F	CAGTTACGCCGTCCTC	57.7
36	39_R	3457780_R	ATAGCTGGTTCGGAAGTC	56.7
37	40_F1	6152_F1	CGCCGAAAACCCTTCT	61.4
38	40_F2	6152_F2	CGCCGAAAACCCCTCT	63.9
39	40_R	6152_R	CTCGGTGGAGGACTGT	56.8
40	41_F	51271_F	TGCAGATAATTTGGAG	49.2
41	41_R	51271_R	GTTTTCGTATGGACAT	47.4
42	42_F1	51272_F1	GCGGCAACACGGTTCATG	69.0
43	42_F2	51272_F2	GCGGCAACACGGTTCACG	71.4
44	42_R	51272_R	GTGGCGTGGCGACTGA	66.5

W pierwszym etapie oceny starterów przeprowadzono reakcje na formach rodzicielskich, jednocześnie testowano różne przedziały temperatur przyłączania starterów. W efekcie tych reakcji dla każdej pary starterów ustalono optymalną temperaturę annealingu. W reakcji amplifikacji wykorzystano trzy różne polimerazy. Najlepsze efekty uzyskano dla jednej z lepszych na rynku i niestety dużo droższych polimerazy JumpStart (Sigma). Przeprowadzone analizy dostarczyły wstępnej informacji o przydatności poszczególnych starterów do identyfikacji genu Dw6 lub alleli tego genu.

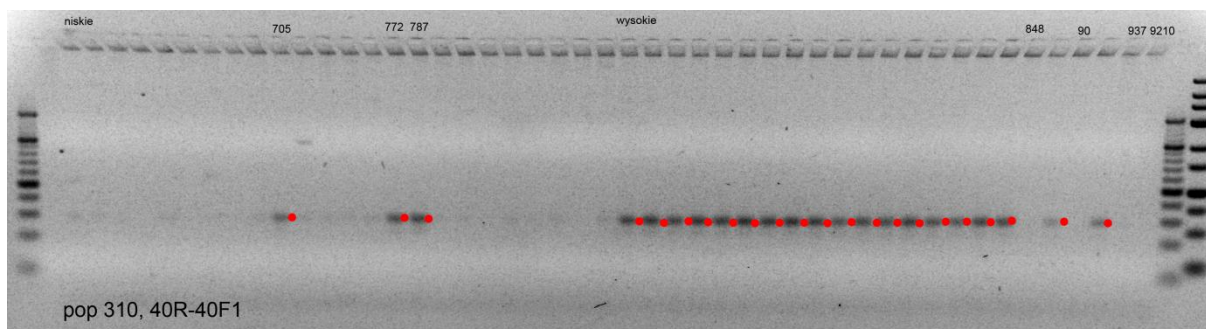
Najbardziej satysfakcjonujące rezultaty otrzymano dla par starterów 40F1-40R oraz 40F2-40R (Fot. 3). Obie pary starterów pracowały na obu populacjach E310 i E101, co wskazuje na bardziej uniwersalny charakter tych starterów i przyczyni się do większych możliwości aplikacyjnych (Fot.4)..



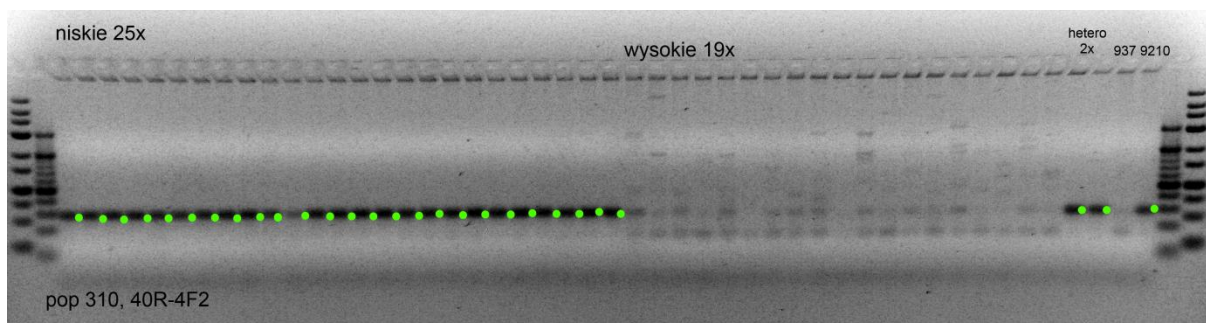
Fot. 3. Amplifikacja ASA przy udziale starterów 40F2-40R dla homozygotycznych osobników niskich i wysokich w populacjach 101 i 310.



Fot. 4. Amplifikacja ASA przy udziale starterów 40F2-40R i 40F1-40R dla homozygotycznych osobników niskich i wysokich w populacji 101.



Fot. 5. Amplifikacja ASA przy udziale starterów 40F1-40R dla homozygotycznych osobników niskich i wysokich w populacji 310.

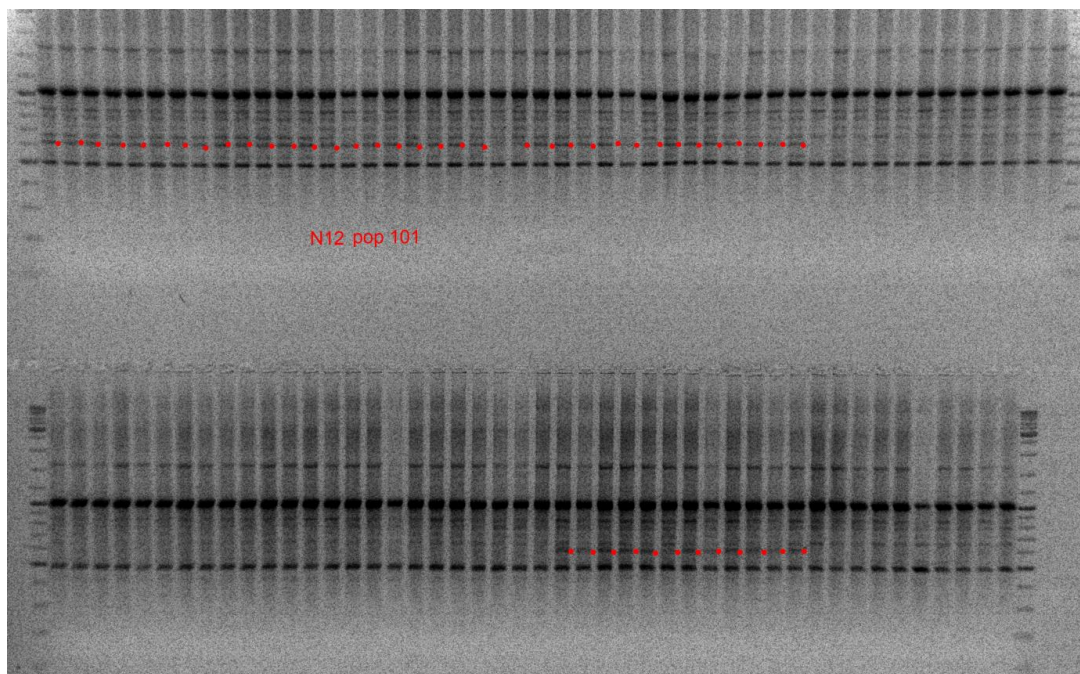


Fot. 6. Amplifikacja ASA przy udziale starterów 40F2-40R dla homozygotycznych osobników niskich i wysokich w populacji 101.

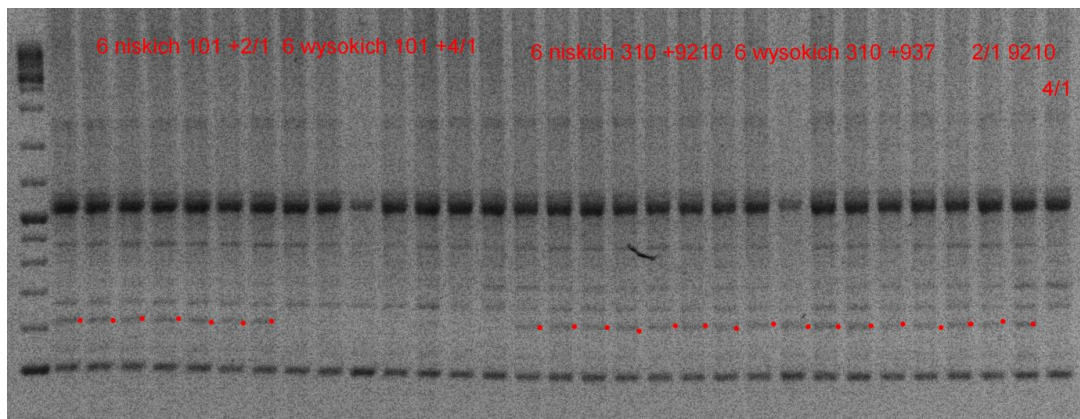
Lepsze dopasowanie markera do genotypu stwierdzono w przypadku pary starterów 40F2-40R identyfikujących allel dominujący genu Dw6 (Fot. 6), aniżeli pary 40F2-40R identyfikującej allel recesywny (Fot. 5).

Przetestowane na populacji E310 zostały również specyficzne startery opracowane dla populacji E101 na bazie markerów DArTseq. Żaden z nich nie wykazał segregacji zgodnej z oczekiwaną pomimo zgodności sekwencji.

Oceniono również segregację w populacji E310 markera RAPD N12620 zidentyfikowanego w populacji E101. Niestety, marker ten segreguje tylko w populacji E101.



Fot. 7 .Segregacja markera N12 620 w populacji E101. Marker występuje u wszystkich roślin niskich.



Fot. 8. Segregacja markera N12 620 u osobników niskich i wysokich populacji E101 oraz E310. Marker występuje tylko u roślin niskich w populacji E101 i wszystkich roślin populacji E310 niezależnie od wysokości.

Wnioski

1. Opracowano marker dla genu *Dw6* użyteczny nie tylko dla populacji na bazie której został on opracowany.
2. Wskazane jest sprawdzenie czy marker ten może być wykorzystany do identyfikacji genu *Dw6* w szerszym tle genetycznym.