

## SPRAWOZDANIE MERYTORYCZNE

z realizacji zadania na rzecz postępu biologicznego w produkcji roślinnej w 2015 roku

### A. INFORMACJE OGÓLNE

Tytuł zadania <b>Mapowanie sprzężeniowe i asocjacyjne owsa zwyczajnego</b>
Numer zadania (w załączniku nr 8 do rozporządzenia Ministra Rolnictwa i Rozwoju Wsi z dnia 29 lipca 2015 r. w sprawie stawek dotacji przedmiotowych dla różnych podmiotów wykonujących zadania na rzecz rolnictwa (Dz. U. z 14 sierpnia 2015 r. poz. 1170)) <b>30</b>
Planowany okres realizacji zadania <b>12 miesięcy</b>
Planowane nakłady w zł <b>200 000</b>

### B. DANE WNIOSKODAWCY

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

**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; Fax: 81-533-35-49, e-mail: [biuro.rektora@up.lublin.pl](mailto:biuro.rektora@up.lublin.pl)**

## C. INFORMACJA O WYKONAWCACH

### 1. Zespół badawczy

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

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](mailto: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](mailto:aneta.koroluk@up.lublin.pl)**

## D. OPIS ZADANIA

### 1. Cele zadania

Lp.	Cel	Czy cel został zrealizowany
1	Precyzyjne fenotypowanie i genotypowanie za pomocą markerów DNA wczesnych pokoleń mieszańców. Wyprowadzanie kolejnych populacji mapujących.	TAK
2	Kontynuowanie rozmnożeń materiałów przeznaczonych do uzyskania zaawansowanych międzyodmianowych i międzygatunkowych rekombinacyjnych linii wsobnych.	TAK
3	Fenotypowanie i genotypowanie linii i odmian przeznaczonych do mapowania asocjacyjnego.	TAK
4	Opracowanie mapy genetycznej bazującej na populacji mapującej E326 pokolenia F <sub>2</sub> wyprowadzonej w oparciu o krzyżowanie biparentalne 'Bingo' × 'Pennline 116'.	TAK
5	Zlokalizowanie na opracowanej mapie genetycznej loci wybranych cech ilościowych.	TAK
6	Identyfikacja markerów genetycznych sprzężonych z obecnością genu <i>Dw6</i> w oparciu o analizę polimorfizmu RAPD oraz markerów dla genu <i>Dw7</i> w oparciu o matrycę DArTseq po uwzględnieniu obserwacji rozszczepień w obrębie linii F <sub>3</sub> populacji mapującej E337.	TAK

### 2. Harmonogram realizacji zadania

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

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

Lp.	Nazwa tematu badawczego	Termin rozpoczęcia – zakończenia realizacji tematu badawczego w miesiącach od rozpoczęcia realizacji zadania	Przewidywane koszty realizacji tematu badawczego
1	Wprowadzanie genów warunkujących karłowatość roślin lub osypywanie ziarniaków, kontynuacja rozmnożeń populacji mapujących oraz fenotypowanie wczesnych pokoleń mieszańców (połączone tematy 1 i 2 opisu wieloletniego).	4-12	19550
2	Analiza podstawowych walorów rolniczych roślin i badanie parametrów plonu linii i odmian uczestniczących w analizach asocjacyjnych (temat 5 opisu wieloletniego).	4-12	32100
3	Genotypowanie z wykorzystaniem metody DArTseq (połączone tematy 3 i 4 opisu wieloletniego).	1-12	122000
4	Konstrukcja mapy genetycznej (temat 7 opisu wieloletniego).	9-12	10550
5	Identyfikacja markerów cech (temat 8 opisu wieloletniego).	1-12	15800
<b>Razem</b>			<b>200000</b>

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

**3. 1. Wprowadzanie genów warunkujących karłowatość roślin lub osypywanie ziarniaków, kontynuacja rozmnożeń populacji mapujących oraz fenotypowanie wczesnych pokoleń mieszańców.**

**Cel tematu badawczego 1**

- \* Wyprowadzenie międzyodmianowych populacji mapujących (z genami karłowatości (*Dw4* i *Dw7*) oraz międzygatunkowych z *A. sterilis* i *A. fatua*).
- \* Fenotypowanie mieszańców  $F_1$  uzyskanych w roku poprzednim.
- \* Fenotypowanie dwóch populacji mapujących pokolenia  $F_2$  segregujących pod względem wysokości.
- \* Identyfikacja homozygot wśród linii  $F_3$  reprezentujących populacje: E326, E337, E366, E423.
- \* Kontynuacja rozmnożeń w kierunku RIL populacji 32, 52, 56 i 101.

**Materiały i metody**

Wszystkie formy przeznaczone do krzyżowań i rozmnożeń oraz mieszańce  $F_1$  wysiano na poletkach Gospodarstwa Doświadczalnego Uniwersytetu Przyrodniczego w Lublinie, w Czesławicach koło Nałęczowa. Siew wykonano na przełomie marca i kwietnia. Długość rzędów wynosiła 1m, zaś rozstawa 20 cm. W początkowym okresie wegetacji przeprowadzono oprysk pielęgnacyjny Chwastoxem Trio, natomiast później chwasty usuwano ręcznie. W fazie strzelania w źdźbło przeprowadzono oprysk preparatem Karate-ZEON w celu zwalczania mszyc, skrzypionki i wciornastków.

W celu wyprowadzenia populacji mapujących: 1) międzyodmianowych z genami karłowatości *Dw4* i *Dw7* oraz 2) międzygatunkowych z *A. sterilis* i *A. fatua* przeprowadzono następujące krzyżowania:

- 1) Bingo  $\times$  North Caroline (*Dw7*)  
Bingo  $\times$  Trelle Dwarf (*Dw4*)  
Kasztan  $\times$  North Caroline (*Dw7*)  
Kasztan  $\times$  Trelle Dwarf (*Dw4*)
- 2) odmiana *A. sativa* (cv. Bingo lub cv. Kasztan)  $\times$  *A. sterilis* (8 genotypów) – 8 kombinacji  
odmiana *A. sativa* (cv. Bingo lub cv. Kasztan)  $\times$  *A. fatua* (8 genotypów) – 8 kombinacji

Kastrowanie roślin rozpoczęto na początku fazy kwitnienia. W wieszce kastrowano kilkanaście szczytowych kłosek, fragmenty wiech zaizolowano izolatorami z tofianu do czasu zapylenia. Po 3-4 dniach od usunięcia pylników na dojrzałe znamiona naniesiono pyłek z pylników zebranych wcześniej z roślin ojcowskich. Po dwóch dniach zapylenie powtórzono. Izolatory pozostawiono na roślinach aż do zbioru, który miał miejsce po osiągnięciu dojrzałości woskowej. Na podstawie liczby wykastrowanych i zapylnych kwiatków oraz liczby zawiązanych ziarniaków określono efektywność krzyżowania.

Ocenę fenotypową przeprowadzono dla 15 kombinacji mieszańcowych  $F_1$  uzyskanych w roku poprzednim. Kombinacje reprezentowały: 1) mieszańce z genem karłowatości *Dw7* (5 kombinacji) oraz 2) mieszańce międzygatunkowe *A. sativa*  $\times$  *A. sterilis* (10 kombinacji). Wysiewano po 2 ziarniaki z każdej kombinacji, ewentualnie 1 jeśli w roku poprzednim nie uzyskano wystarczającej liczby nasion. Wszystkie rośliny  $F_1$  poddano ocenie fenotypowej. Fenotypowanie roślin  $F_1$  polegało na ocenie podstawowych walorów rolniczych roślin w warunkach laboratoryjnych. Oceniono: wysokość, liczbę pędów produkcyjnych i niedogonów, długość wiechy, liczbę kłosek, liczbę i masę ziarniaków z wiechy oraz masę ziarniaków z rośliny.

W fazie krzewienia z każdej rośliny  $F_1$  oraz każdej rośliny rodzicielskiej wykorzystanej w krzyżowaniach pobrano i zamrożono w temp.  $-70^\circ\text{C}$  fragmenty liści w celu zabezpieczenia tkanki do izolacji DNA w kolejnych latach badań.

Ocenie rozszczepień wysokości roślin warunkowanej obecnością genu *Dw6* poddano dwie populacje  $F_2$ :

E508 DC 2112/05 × Quoll (*Dw6*)  
E572 Bingo × Wallaroo (*Dw6*)

Z każdej kombinacji mieszańcowej wysiano po 150 ziarniaków. W fazie krzewienia z roślin  $F_2$  pobrano i zamrożono w temp.  $-70^{\circ}\text{C}$  fragmenty liści w celu izolacji DNA w latach kolejnych. Fenotypowanie roślin  $F_2$  przeprowadzono w warunkach laboratoryjnych. Oceniono: wysokość, długość międzywęźli, liczbę pędów produkcyjnych i niedogonów, długość wiechy, liczbę kłosek, liczbę i masę ziarniaków z wiechy. Obliczono MTZ i płodność kłosa. Na podstawie uzyskanych wyników określono stosunek rozszczepień wysokości determinowanej obecnością genu *Dw6* w obu populacjach.

Ocenie rozszczepień wysokości poddano cztery populacje pokolenia  $F_3$ : E326, E337, E366 i E423.

Nazwa populacji	Formuła krzyżowania	Liczba linii $F_3$
E326	Bingo × Penline 116 ( <i>Dw7</i> )	91
E337	Bingo × North Carolina ( <i>Dw7</i> )	77
E366	Bingo × Palestine Dwarf ( <i>Dw7</i> )	67
E423	STH 8827 ( <i>Dw6</i> - niski) × STH 9210 ( <i>Dw6</i> - średni)	273

W rzędach długości 1m wysiano ok. 50 ziarniaków z każdej linii poszczególnych populacji. Identyfikacja homozygotycznych pod względem wysokości linii  $F_3$  polegała na wizualnej ocenie wyrównania roślin w rzędzie w fazie dojrzałości mleczej. Po stwierdzeniu wyrównania przeprowadzono pomiar wysokości trzech losowo wybranych roślin. Z pomiarów obliczono średnią wartość dla każdej homozygotycznej linii. Otrzymane wyniki porównano z obserwacjami uzyskanymi w roku poprzednim dla pokolenia  $F_2$  badanych populacji, co pozwoliło na identyfikację homozygotycznych roślin  $F_2$ .

Rozmnożono również kolejne pokolenia ( $F_4, F_5, F_6$ ) mieszańców międzyodmianowych oraz międzygatunkowych w kierunku uzyskania RIL (populacje 32, 52, 56, 101).

Nazwa populacji	Formuła krzyżowania	Liczba linii	Pokolenie
E32	Sam × <i>A. fatua</i> 216	150	( $F_6$ )
E56	<i>A. fatua</i> 216 × Sam	150	( $F_6$ )
E52	<i>A. sterilis</i> 66 × Sam	300	( $F_4, F_5, F_6$ )
E101	STH 9787 × Bingo	360	( $F_4, F_5$ )

W rzędach długości 0,5 m wysiano ok. 25 ziarniaków z każdej linii poszczególnych populacji. Tuż przed kwitnieniem na 3 wiechy wszystkich linii reprezentujących populacje E32, E52 i E56 założono izolatory z tomofanu. Po osiągnięciu pełnej dojrzałości izolatory zebrano, a najładniejsze wiechy z każdej linii wymłócono. Ziarniaki przeznaczono do rozmnożenia w roku kolejnym. W przypadku populacji E101 izolacji nie przeprowadzono. Z każdej linii w fazie dojrzałości wybrano i wymłócono tylko jedną wiechę, a uzyskane z niej ziarniaki zostaną wysiane w roku kolejnym.

## Wyniki

W celu wyprowadzenia międzyodmianowych populacji mapujących z genami karłowatości *Dw4* i *Dw7* przeprowadzono krzyżowania odmian ‘Bingo’ i ‘Kasztan’ z odmianami North Caroline (*Dw7*) i Trelle Dwarf (*Dw4*). Aby uzyskać populacje międzygatunkowe przeprowadzono krzyżowania odmian ‘Bingo’ i ‘Kasztan’ z *A. sterilis* i *A. fatua*

W krzyżowaniach międzyodmianowych wykastrowano i zapyłono 295 kwiatków uzyskując w sumie 48 ziarniaków. Ilość ziarniaków dla poszczególnych kombinacji wahała się od 1 (Bingo x Trelle Dwarf do 25 Kasztan x Trelle Dwarf. Zapyłono 295 kwiatków w 29 wiechach uzyskując 48 ziarniaków  $F_1$  (Tab.1). Efektywność krzyżowania wyniosła średnio 16%. Od 6,25% dla kombinacji Bingo x Trelle Dwarf do 34% dla Bingo x North Carolina.

Tab. 1. Efektywność krzyżowań międzyodmianowych.

Forma mateczna	Forma ojcowska	Gen	Pochodzenie formy ojcowskiej	Liczba wykastrowanych i zapylnych wiech	Liczba wykastrowanych kwiatków	Liczba zawiązanych ziarniaków	Efektywność krzyżowania
Bingo	North Carolina	Dw7	NPGS	3	35	12	34,29
Kasztan	North Carolina	Dw7	NPGS	8	76	10	13,16
Bingo	Trelle Dwarf	Dw4	NPGS	2	16	1	6,25
Kasztan	Trelle Dwarf	Dw4	NPGS	16	168	25	14,88
			<b>Suma</b>	29	295	<b>48</b>	
			<b>Średnia</b>	7,3	73,8	12,0	<b>16,27</b>

W krzyżowaniach międzygatunkowych jako formy mateczne wykorzystano odmiany Kasztan i Bingo, zaś jako formy ojcowskie po 8 genotypów *A. fatua* i *A. sterilis*. Wykorzystując jako dawcę pyłku genotypy *A. fatua* uzyskano średnią efektywność krzyżowania przekraczającą 31% (Tab. 2). Efektywność zawiązywania ziarniaków wahała się od 6% dla mieszańców z F\_510 do 50% dla mieszańców z F\_511 i F\_513. W sumie po wykastrowaniu i zapyleniu 505 kwiatków uzyskano 158 ziarniaków Bingo x *A. fatua*, od 2 do 48 w zależności od genotypu formy dzikiej.

Tab. 2. Efektywność krzyżowań *A. sativa* x *A. fatua*.

Forma mateczna	Forma ojcowska	Pochodzenie formy ojcowskiej	Liczba wykastrowanych i zapylnych wiech	Liczba wykastrowanych kwiatków	Liczba zawiązanych ziarniaków	Efektywność krzyżowania
Bingo	F_508	NPGS_Etiopia	3	38	18	47,37
Bingo	F_509	NPGS_Iran	5	64	5	7,81
Bingo	F_510	NPGS_Kenia	3	33	2	6,06
Bingo	F_511	NPGS_Turcja	9	96	48	50,00
Bingo	F_512	NPGS_Maroko	14	131	32	24,43
Bingo	F_513	NPGS_Turcja	2	22	11	50,00
Bingo	F_518	NPGS_Kazachstan	9	94	40	42,55
Bingo	F_519	NPGS_Tadżykistan	2	27	2	7,41
		<b>Suma</b>	47	505	<b>158</b>	
		<b>Średnia</b>	5,9	63,1	19,8	<b>31,29</b>

Prowadzono również krzyżowania międzygatunkowe, w których formę ojcowską stanowiły genotypy *A. sterilis*. Wykastrowano łącznie 1124 kwiatki uzyskując zaledwie 77 ziarniaków (Tab. 3). Efektywność krzyżowania z *A. sterilis* była niemal trzykrotnie niższa aniżeli w krzyżowaniach międzyodmianowych i pięciokrotnie niższa aniżeli w krzyżowaniach z *A. fatua* i wynosiła 6,85. Efektywność krzyżowania była jednocześnie bardzo zróżnicowana, od 0,0 dla As\_203 do 44% z As\_66. W związku z tym zyskane w efekcie krzyżowania ziarniaki reprezentują nie 8, jak planowano, ale 7 kombinacji mieszańcowych. Genotypem, którego pyłek nie był w stanie przełamać międzygatunkowych barier krzyżowalności był As\_203. Poza As\_66, z udziałem którego uzyskano aż 47 ziarniaków mieszańcowych, genotypy *A. sterilis* uczestniczyły w wiązaniu od 1 (As\_204) do 10 ziarniaków (As\_3).

Tab. 3. Efektywność krzyżowań *A. sativa* x *A. sterilis*.

Forma mateczna	Forma ojcowska	Pochodzenie formy ojcowskiej	Liczba wykastro-wanych i zapylonych wiech	Liczba wykastro-wanych kwiatków	Liczba zawiązanych ziarniaków	Efektywność krzyżowania
Bingo	As_3	CAV 5041_PGRC	5	54	10	18,52
Bingo	As_66	PI 380125_NPGS	10	107	47	43,93
Bingo	As_203	PI 657616 NPGS	24	241	0	0,00
Kasztan	As_2	CAV 1832_PGRC	2	19	3	15,79
Kasztan	As_6	CAV 4963_PGRC	4	46	8	17,39
Kasztan	As_7	CAV 5165_PGRC	6	61	4	6,56
Kasztan	As_172a	51855 E 2347 IHAR	27	266	4	1,50
Kasztan	As_204	PI 657618 NPGS	33	330	1	0,30
		<b>Suma</b>	111	1124	77	
		<b>Średnia</b>	13,9	140,5	9,6	<b>6,85</b>

Przeprowadzono również fenotypowanie 15 kombinacji mieszańcowych F1 uzyskanych w roku poprzednim. Reprezentowały one: 1) mieszańce z genem karłowatości *Dw7* (5 kombinacji) (Tab. 4) oraz 2) mieszańce międzygatunkowe *A. sativa* x *A. sterilis* (10 kombinacji) (Tab. 5). Mieszańce charakteryzowały się dużą zmiennością cech.

Tab. 4. Wyniki fenotypowania mieszańców F<sub>1</sub> z genem karłowatości *Dw7*.

Lp. kombinacji	Nr kombinacji	Nr rośliny	Forma mateczna	Forma ojcowska	Wysokość	Liczba pędów produkcyjnych	Liczba niedogonów	Długość wiechy	Liczba kłosek	Liczba ziarniaków	Masa ziarniaków	Plodność kłoska	MTZ [g]
1	752	1	Breton	<b>Finley</b>	93	3	0	17	51	101	4,17	1,98	41,29
2	792	1	<b>Finley</b>	Rajtar	110	4	6	20	80	172	7,00	2,15	40,70
2	792	2	<b>Finley</b>	Rajtar	125	4	4	20	83	138	6,11	1,66	44,28
3	793	1	<b>Finley</b>	Bingo	105	4	3	17	71	130	5,63	1,83	43,31
4	794	1	<b>Finley</b>	Kasztan	106	3	3	20	63	131	5,89	2,08	44,96
4	794	2	<b>Finley</b>	Kasztan	105	4	1	20	63	154	6,66	2,44	43,25
4	794	3	<b>Finley</b>	Kasztan	95	3	0	16	49	84	3,50	1,71	41,67
4	794	4	<b>Finley</b>	Kasztan	109	3	0	19	59	120	5,23	2,03	43,58
4	794	5	<b>Finley</b>	Kasztan	105	3	3	20	61	162	6,50	2,66	40,12
5	824	1	Kasztan	<b>North Caroline</b>	80	4	2	18	56	127	4,5	2,27	35,43

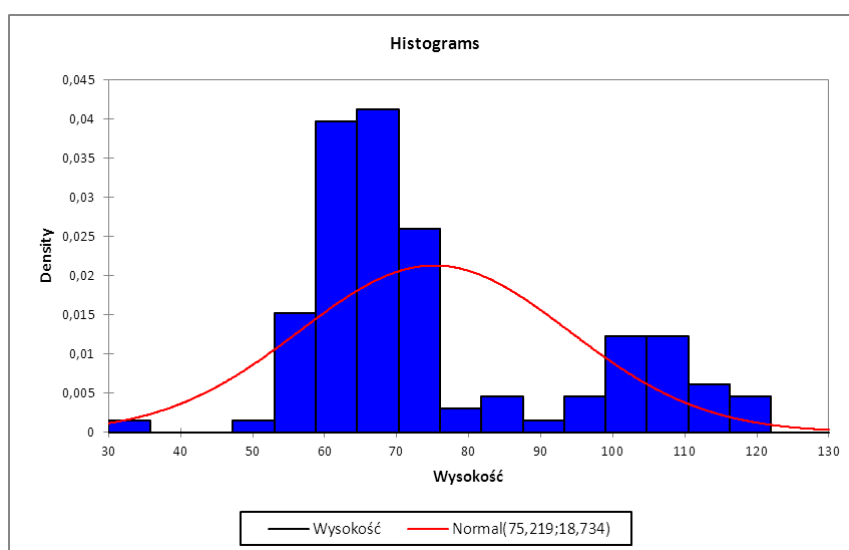
Tab. 5. Wyniki fenotypowania mieszańców międzygatunkowych F<sub>1</sub>.

Lp. kombinacji	Nr rośliny	Nr rośliny	Forma mateczna	Forma ojcowska	Wysokość	Liczba pędów produkcyjnych	Liczba niedogonów	Długość wiechy	Liczba kłosków	Liczba ziarniaków	Masa ziarniaków	Plodność kłoska	MTZ [g]
1	750	1	Rajtar	<b>A. sterilis_172a</b>	131	4	6	21	22	71	2,89	3,23	40,70
1	750	2	Rajtar	<b>A. sterilis_172a</b>	130	6	8	23	28	72	2,71	2,57	37,64
2	751	1	Breton	<b>A. sterilis_172a</b>	144	7	12	24	31	91	3,59	2,94	39,45
3	753	1	Breton	<b>A. sterilis_R60</b>	111	4	0	21	49	86	3,45	1,76	40,12
3	753	2	Breton	<b>A. sterilis_R60</b>	119	5	6	21	46	83	3,31	1,80	39,88
4	803	1	Bingo	<b>A. sterilis_66</b>	155	4	3	25	33	94	3,94	2,85	41,91
5	804	1	Bingo	<b>A. sterilis_M52</b>	170	3	5	25	23	93	4,16	4,04	44,73
6	805	1	Bingo	<b>A. sterilis_R52</b>	149	6	3	22	32	86	2,63	2,69	30,58
7	806	1	Bingo	<b>A. sterilis_R63</b>	112	4	3	20	55	124	5,4	2,25	43,55
8	807	1	Bingo	<b>A. sterilis_R68</b>	117	3	1	17	22	40	1,48	1,82	37,00
9	822	1	Kasztan	<b>A. sterilis_172a</b>	122	4	4	18	18	54	1,94	3,00	35,93
9	822	2	Kasztan	<b>A. sterilis_172a</b>	138	7	12	26	30	79	3,04	1,63	41,77
10	823	1	Kasztan	<b>A. sterilis_M52</b>	150	5	5	26	21	71	2,94	3,38	41,41

Ocenie rozszczeień wysokości roślin warunkowanej obecnością genu *Dw6* poddano dwie populacje F<sub>2</sub>:

E508 DC 2112/05 × Quoll (*Dw6*) 114 roślin  
 E572 Bingo × Wallaroo (*Dw6*) 109 roślin

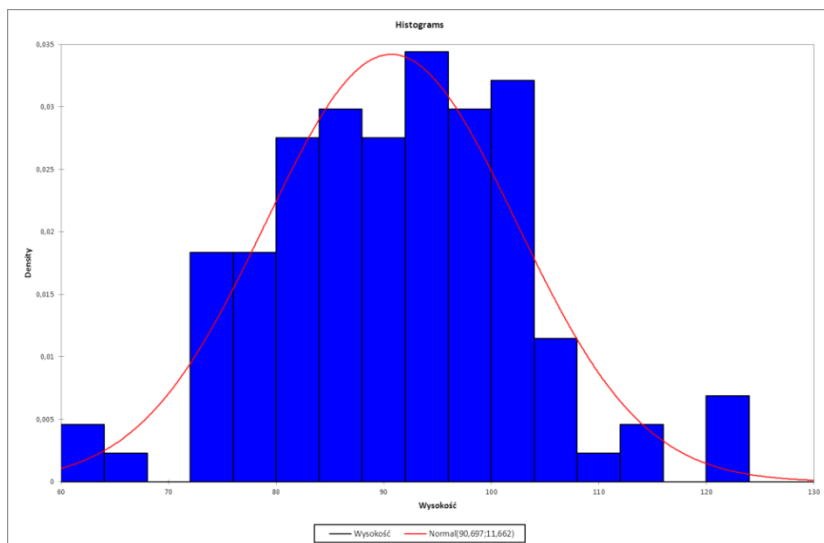
Analiza statystyczna rozszczeień wysokości roślin w populacji 508 z wykorzystaniem testu Chi<sup>2</sup> wykluczyła rozkład normalny cechy przy wartości p = < 0,0001, co jest zgodne z oczekiwaniami. Obecność genu *Dw6* powoduje przewagę osobników niskich w populacji. Udział osobników o poszczególnych fenotypach pod względem wysokości przedstawiono na histogramie (Rys. 2).



Rys. 1. Histogram przedstawiający rozkład osobników w zależności od ich wysokości w populacji 508.



W przypadku populacji 572 analiza statystyczna wysokości poszczególnych osobników z wykorzystaniem testu  $\chi^2$  wykluczyła rozkład normalny cechy przy wartości  $p=0,006$ . Podobnie jak w przypadku populacji 508 obecność genu Dw6 powoduje dominację osobników niskich w populacji, niemniej jednak rozkład poszczególnych fenotypów jest odmienny, aniżeli w populacji 508 i wskazuje na występowanie form średnich. Udział osobników o poszczególnych fenotypach pod względem wysokości przedstawiono na histogramie (Rys. 2).



Rys. 2. Histogram przedstawiający rozkład osobników w zależności od wysokości w populacji 572.

W populacji 572 oprócz genu Dw6 działa również inny gen lub geny o stosunkowo silnych efektach, osłabiających działanie genu Dw6. Odmiana Wallaroo wykorzystana jako dawca tego genu jest odmianą średnią. Średnia wysokość roślin w populacji 572 wyniosła ok. 90 cm (Tab. 8) podczas, gdy w populacji 508 zaledwie 75 cm (Tab. 7).

Tab. 7. Analiza statystyczna wyników fenotypowania populacji 508.

L.p.	Cecha	Minimum	Maximum	Średnia	Odchylenie standardowe
1	Wysokość	53,00	121,00	75,22	18,73
2	Liczba pędów produkcyjnych	2,00	12,00	4,22	1,50
3	Liczba niedogonów	0,00	18,00	3,81	3,19
4	Liczba kłosek	9,00	63,00	32,10	10,56
5	Średnica	3,10	6,60	4,78	0,66
6	Liczba ziarniaków	19,00	157,00	66,52	28,47
7	Masa ziarniaków z wiechy	0,33	7,12	2,92	1,24
8	Płodność kłosa	0,29	4,52	2,07	0,51
9	MTZ [g]	23,72	59,50	43,90	8,64
10	I	0,00	5,00	0,55	1,09
11	II	0,00	10,00	3,69	1,99
12	III	4,00	16,00	7,30	2,27
13	IV	6,00	24,00	12,04	4,46
14	Długość dokłosa	20,00	59,00	32,98	9,53
15	Długość wiechy	11,00	28,00	17,70	4,87
16	Liczba międzywęźli	4,00	6,00	5,16	0,53
17	pnw	0,00	36,00	10,82	9,21
18	I	0,00	6,00	0,67	1,28
19	II	0,00	10,00	4,21	1,97
20	III	4,00	17,00	6,95	2,40
21	IV	6,00	25,00	12,21	4,62
22	Długość dokłosa	19,00	55,00	31,57	8,68

L.p.	Cecha	Minimum	Maximum	Średnia	Odchylenie standardowe
23	Długość wiechy	11,00	27,00	17,45	4,22
24	Liczba międzywęźli	4,00	6,00	5,24	0,54
25	pnw	0,00	38,00	10,43	8,90

Oprócz analizy wysokości szczegółowej analizie poddano inne parametry roślin w poszczególnych populacjach. Między innymi długość międzywęźli, długość dokłosa, wiechy i odległość pomiędzy szczytem wiechy a nasadą liścia flagowego. Ostatnia z cech odpowiedzialna jest za niepełne wychodzenie wiechy z pochwy liściowej, co wpływa na redukcję plonu roślin o karłowym lub półkarłowym pokroju. Jedną z cech odróżniających od siebie obie populacje jest większa liczba międzywęźli w populacji 572 aniżeli w populacji 508.

Tab. 8. Analiza statystyczna wyników fenotypowania populacji 572,

L.p.	Cecha	Minimum	Maximum	Średnia	Odchylenie standardowe
1	Wysokość	61,00	123,00	90,70	11,66
2	Liczba pędów produkcyjnych	1,00	12,00	4,72	1,88
3	Liczba niedogonów	0,00	17,00	6,08	3,24
4	Liczba kłosek	11,00	86,00	25,82	10,86
5	Średnica	2,70	6,60	4,43	0,66
6	Liczba ziarniaków	12,00	156,00	55,81	27,33
7	Masa ziarniaków	0,58	6,37	2,33	1,09
8	MTZ	31,43	52,00	42,42	4,62
9	Płodność kłoska	0,61	3,29	2,13	0,50
10	I	0,00	2,00	0,02	0,19
11	II	0,00	6,00	0,16	0,83
12	III	0,00	8,00	1,09	1,78
13	IV	0,00	11,00	4,56	2,55
14	V	4,00	17,00	10,01	2,34
15	VI	7,00	23,00	17,18	2,67
16	Długość dokłosa	12,00	55,00	38,42	7,05
17	Długość wiechy	10,00	29,00	15,52	2,81
18	Liczba międzywęźli	4,00	8,00	5,35	0,70
19	pnw	1,00	32,00	18,39	5,65
20	I	0,00	5,00	0,13	0,70
21	II	0,00	8,00	1,09	1,60
22	III	0,00	11,00	4,75	2,69
23	IV	5,00	16,00	10,23	2,33
24	V	7,00	25,00	17,01	2,69
25	Długość dokłosa	12,00	55,00	37,32	6,80
26	Długość wiechy	10,00	29,00	15,30	3,00
27	Liczba międzywęźli	4,00	7,00	5,40	0,65
28	pnw	2,00	38,00	18,09	6,18

Ocenie rozszczepień wysokości poddano również cztery populacje pokolenia F<sub>3</sub>: E326, E337, E366 i E423, których liczebność wynosiła od 63 do 273 linii (Tab. 9). W sumie fenotypowano 504 poletka. Z wyjątkiem populacji E423, w której segregacja wysokości determinowana jest obecnością genu *Dw6* w pozostałych populacjach różnice w wysokości linii wynikały z obecności genu *Dw7*.

Tab. 9. Fenotypowane populacje F<sub>3</sub>.

Populacja mapująca pokolenie F <sub>3</sub>	Kombinacja mieszańcowa	Gen karłowatości	Liczba fenotypowanych linii F <sub>3</sub>
E423	STH 8827 ( <i>Dw6</i> - niski) × STH 9210 ( <i>Dw6</i> - średni)	<i>Dw6</i>	273
E326	Bingo x Penline 116	<i>Dw7</i>	91
E337	Bingo x North Carolina	<i>Dw7</i>	77
E366	Bingo x Palestine Dwarf	<i>Dw7</i>	63
Suma			<b>504</b>

Pomiary wysokości roślin w obrębie poletek o wyrównanej wysokości pozwoliły na wyodrębnienie homozygot dominujących i recesywnych, niestety tylko pod względem genu *Dw7*. Na podstawie segregacji w pokoleniu F<sub>3</sub> w populacjach E326, E337, E366 można określić stosunek rozszczepień genotypów w tych populacjach w pokoleniu F<sub>2</sub> na 1:2:1, co odpowiada stosunkowi rozszczepień fenotypów 3:1 (Tab. 10).

Tab. 10. Analiza rozszczepień wysokości w fenotypowanych populacjach F<sub>3</sub>.

Populacja mapująca pokolenie F <sub>3</sub>	Kombinacja mieszańcowa	Gen karłowatości	Liczba homozygot		Liczba heterozygot	Liczebność całej populacji
			niskich	wysokich		
<b>E366</b>	Bingo x Palestine Dwarf	<i>Dw7</i>	14	20	29	63
<b>E337</b>	Bingo x North Carolina	<i>Dw7</i>	19	21	37	77
<b>E326</b>	Bingo x Penline 116	<i>Dw7</i>	20	19	52	91
<b>E423</b>	STH 8827 ( <i>Dw6</i> - niski) × STH 9210 ( <i>Dw6</i> - średni)	<b><i>Dw6</i></b>	?	?	?	<b>273</b>

Nie było możliwe zidentyfikowanie homozygot w obrębie linii F<sub>3</sub> w populacji E423 gdyż różnice w wysokości roślin były zbyt małe. Populacja ta jest efektem krzyżowania niskiej i średniej linii hodowlanej i każda z roślin w obrębie 273 linii jest homozygotą pod względem genu *Dw6*, dlatego też charakteryzuje je karłowaty bądź półkarłowaty fenotyp. Wydaje się możliwe zidentyfikowanie linii homozygotycznych pod względem genów współtowarzyszących *Dw6* i odpowiadających za półkarłowaty fenotyp dopiero w dalszych pokoleniach. Jest to zgodne z wcześniejszymi przewidywaniami, że półkarłowaty fenotyp jest efektem działania kilku genów o nakładających się efektach maskowanych dodatkowo obecnością *Dw6*.

W tabeli 11 przedstawiono wyniki pomiarów dla wszystkich 273 linii z populacji E423.

Tab. 11. Ocena wysokości linii F<sub>3</sub> populacji E423.

Nr. rod. pop. E423	Wysokość F <sub>2</sub>	Wysokość F <sub>3</sub>	Nr. rod. pop. E423	Wysokość F <sub>2</sub>	Wysokość F <sub>3</sub>	Nr. rod. pop. E423	Wysokość F <sub>2</sub>	Wysokość F <sub>3</sub>	Nr. rod. pop. E423	Wysokość F <sub>2</sub>	Wysokość F <sub>3</sub>	Nr. rod. pop. E423	Wysokość F <sub>2</sub>	Wysokość F <sub>3</sub>	Nr. rod. pop. E423	Wysokość F <sub>2</sub>	Wysokość F <sub>3</sub>
1	97	75	46	77	68-73	90	78	72	135	88	65-76	181	75	63-70	227	90	50-65
2	93	80	47	71	60-75	91	79	75-80	136	77	57-60	182	77	70	228	88	63-68
3	86	53-63	47	89	68-70	92	81	65-73	137	90	67-70	183	88	60	229	74	55-75
4	73	67	48	85	77-90	93	79	73	138	90	65-70	184	91	58-62	230	75	60-67
5	96	73	49	98	72-77	94	82	58-77	139	76	55-62	185	74	80	231	81	68-70
6	88	65	50	79	65-72	95	75	38-60	140	82	57-63	186	69	60-67	232	74	68
7	84	60-65	51	77	67-77	96	90	68-72	141	79	65-75	187	85	73-80	233	86	65-70
8	90	65-72	52	85	62	97	88	75	142	78	55-65	188	91	68-70	234	73	63-73
9	85	75-80	53	81	70	98	82	65-71	143	81	60-65	189	91	60-65	235	83	65-72
10	102	73-75	54	87	50-65	99	87	75-80	144	85	60-67	190	112	75-85	236	79	67-70
11	75	65-75	55	76	75-82	100	86	80-85	145	71	58-65	191	85	60-67	237	91	60-70
12	75	75-80	56	80	53-63	101	75	63	146	82	60-67	192	78	63-65	238	63	65
13	81	63	57	89	50-70	102	86	65-70	147	89	60-65	193	78	60	239	86	60-72
14	80	58-60	58	77	72-75	103	87	70	148	75	65-72	194	76	65	240	83	67
15	84	60-65	59	80	60-70	104	86	80-87	149	82	72	195	75	63-67	241	71	63
16	76	70	60	86	66	105	54	65	150	81	63	196	81	83	242	70	62
17	85	68	61	92	70-78	106	102	68	151	89	65-83	197	79	60-68	243	79	65
18	93	75-80	62	73	66-73	107	73	75-83	152	96	95	198	99	60-75	245	101	50-55
19	90	75-80	63	65	66	108	96	80	153	91	60-64	199	96	75-85	246	74	67-77
20	78	65-70	64	66	67-70	109	67	55-62	154	72	80	200	87	85	247	84	72-87
21	88	65-71	65	79	55-60	110	71	70	155	79	70	201	74	73	248	79	60-67
22	98	67	66	64	65	111	81	68	156	79	75	202	78	55-70	249	74	68
23	75	67	67	87	63-73	112	80	67	157	84	65-72	203	72	70	250	69	55-68
24	80	80	68	81	60	113	87	70-73	158	78	55-63	204	74	70	251	88	65-80
25	97	60-75	69	83	60-65	114	95	60-70	158	86	70-74	205	76	70-75	252	95	65-73
26	82	55-70	70	67	65	115	87	68-70	159	83	60-77	206	79	70-75	253	76	72
27	78	75-77	71	79	60-75	116	89	60-73	160	75	63-68	207	75	70	254	85	55-62
28	86	55-65	72	79	65-70	117	79	70	161	72	52-60	208	79	75	255	92	68-72
29	95	81-85	73	73	68-77	118	85	62-68	162	80	75	209	82	80	256	82	65-70
30	90	68	74	78	68-77	119	79	60-65	163	89	57	210	96	70-72	257	82	57-67
31	82	60-65	75	77	60-67	120	75	55-63	164	80	63-75	211	98	60-65	258	75	63-80
32	84	55-60	76	84	68-70	121	84	65	165	73	72	212	79	75	260	78	73
33	73	75	77	83	75-85	122	81	65-75	166	70	72-80	213	76	65-72	260	85	65-68
34	73	65-75	78	84	55-75	123	94	67-75	167	88	67	214	74	65-72	261	73	68
35	81	55-72	79	76	65-80	124	100	68-75	169	86	55-73	215	92	70-75	262	84	78-80
36	81	70	80	87	63-75	125	89	68-85	170	82	55-63	216	85	63-78	263	89	55-72
37	76	60-75	81	82	70	126	80	60-70	171	91	60-75	217	76	60-65	264	97	70-80
38	91	67-73	82	86	53-70	127	72	64-67	172	81	70-78	218	73	83	265	85	52-85
39	92	73-75	83	80	63-70	128	75	70-75	173	84	70	219	82	69	266	77	60
40	98	65-78	84	73	68	129	61	60-70	174	74	65-75	220	83	70-72	267	77	72-78
41	74	70-75	85	83	62-70	130	78	80	175	77	78-80	221	82	65-72	268	92	65-78
42	74	70	86	80	68-75	131	75	72	176	86	77	222	81	55-65	269	81	65-75
43	80	68-70	87	83	68	132	76	55-70	177	85	65-75	223	97	68-73	270	82	70
44	75	70-75	88	97	62-67	133	87	60-70	178	68	60-70	224	85	65-70	271	81	65-78
45	75	62	89	96	75-87	134	96	60-63	179	98	80	225	74	75-78	272	59	75
									180	85	55-70	226	86	77-80	273	90	65-75

Celem zadania było również rozmnożenie kolejnych pokoleń mieszańców międzyodmianowych oraz międzygatunkowych w kierunku uzyskania RIL. Rozmnożono odpowiednio 152, 291 oraz 608 linii pokoleń F<sub>4</sub>, F<sub>5</sub> i F<sub>6</sub> (Tab. 12). W sumie zebrano izolowane ziarniaki z 1051 poletek. Największą liczebnością charakteryzowały się populacje E52 oraz E101.

Tab. 12. Rozmnożenie kolejnych pokoleń mieszańców.

Populacja	Rodowód	Liczebność roślin w pokoleniu			Suma roślin w populacji
		F <sub>4</sub>	F <sub>5</sub>	F <sub>6</sub>	
E32	Sam × <i>A. fatua</i> 216	-	-	118	118
E52	<i>A. sterilis</i> 66 × Sam	152	94	161	407
E56	<i>A. fatua</i> 216 × Sam	-	-	145	145
E101	STH 9787 × Bingo	-	197	184	381
<b>Suma</b>		<b>152</b>	<b>291</b>	<b>608</b>	<b>1051</b>

Mierniki dla tematu badawczego 1

Lp.	miernik	wartość miernika podana w opisie zadania	wartość miernika zrealizowana
1	Liczba wyprowadzanych kombinacji mieszańcowych	20	19
2	Liczba fenotypowanych kombinacji F <sub>1</sub>	15	15
3	Liczba fenotypowanych populacji F <sub>2</sub>	2	2
4	Liczba fenotypowanych populacji F <sub>3</sub>	4	4
5	Liczba populacji prowadzonych w kierunku RIL	4	4

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

#### Cel tematu badawczego 2

- \* Celem tematu jest określenie podstawowych walorów rolniczych oraz parametrów plonu odmian i linii uczestniczących w analizach asocjacyjnych.

#### Materiały i metody

Doświadczenie założono dla 500 obiektów, które stanowią reprezentatywną próbę polskich odmian i linii hodowlanych owsa oraz materiałów zagranicznych będących źródłem pożądanej zmienności. Ziarniaki wysiano siewnikiem na 3-rzędkowe poletka o długości rzędów 1m i rozstawie 25cm. Siew wykonano pod koniec marca. Na każde poletko wysiano 150 ziarniaków. W początkowym okresie wegetacji przeprowadzono oprysk pielęgnacyjny środkiem chwastobójczym, natomiast w fazie strzelania w źdźbło preparatem owadobójczym.

W trakcie wegetacji oceniono: wczesność, stopień porażenia przez choroby w warunkach naturalnej infekcji polowej, wysokość roślin, zaś po zbiorze plon z poletka i MTZ.

#### Wyniki

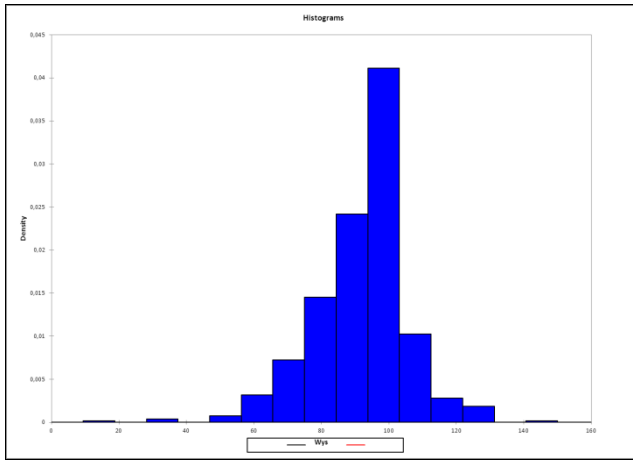
W doświadczeniu założonym dla 500 obiektów stanowiących reprezentatywną próbę polskich materiałów hodowlanych i odmian owsa oraz odmian zagranicznych wszystkie analizowane cechy, takie jak: wczesność, stopień porażenia przez mączniaka prawdziwego w warunkach naturalnej infekcji polowej, wysokość, plon z poletka i MTZ charakteryzowały się dużą zmiennością (Tab. 13). Nie zaobserwowano porażenia rdzą koronową.

Tab. 13. Analiza statystyczna wyników fenotypowania 500 odmian i linii przeznaczonych do mapowania asocjacyjnego.

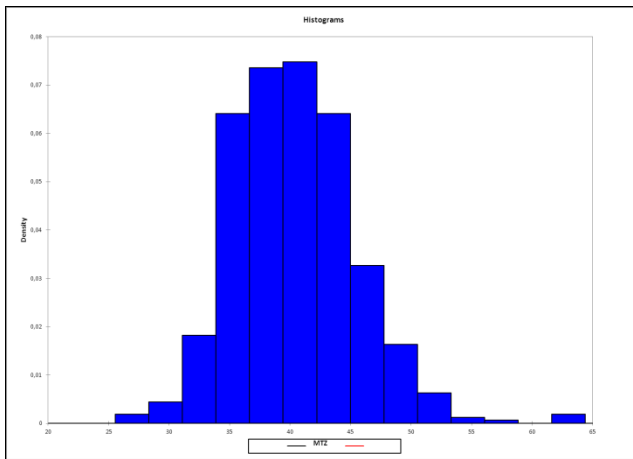
L.p.	Cecha	Minimum	Maximum	Średnia	Odczylenie standardowe
1	Wysokość	36	142	91,73	14,08
2	Gęstość ziarna hl/kg	34,6	59,4	45,74	3,17
3	% łuski	21,6	32,8	25,87	1,70
4	MTZ	27,4	63,4	40,35	5,05
5	Odporność na mączniaka	0	9	7,53	2,30
6	Wczesność (Liczba dni od 1 maja)	27	49	38,00	2,95
7	Plon z 1 m <sup>2</sup>	0,19	0,89	0,56	0,11

Na przedstawionych poniżej histogramach zaobserwować można ilość obiektów w poszczególnych zakresach dla analizowanych cech. W przypadku wysokości większość badanych obiektów charakteryzuje się wysokością od 90 do 100cm, przy czym zakres wartości dla tej cechy wynosi od 36 do 142 cm (Rys.3). Wartość MTZ u badanych genotypów waha się od 27,4 g do 63,4 g, wynosząc średnio 40,35 g, a jednocześnie u ok. 400 obiektów MTZ wynosi od 36 do 45 g (Rys. 4).

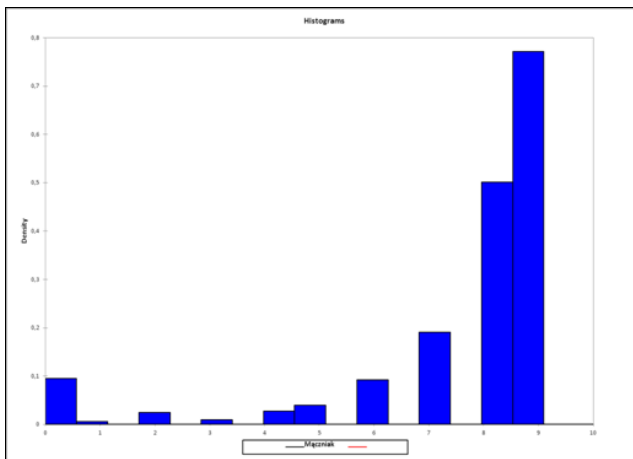
Rozpatrując odporność na choroby, aż u ponad 400 form stwierdzono wysoką odporność na mączniaka zawierającą się w przedziale 8-9 (Rys. 5). Prawdopodobnie jest to wynikiem sprzyjających warunków pogodowych, bądź występującego lokalnie patotypu o niskiej zjadliwości. W poprzednim roku badań silne porażenie zarówno rdzą, jak i mączniakiem badanych form wskazuje, że tylko nieliczne genotypy charakteryzują się wysoką odpornością na patogeny grzybowe.



Rys. 3. Histogram przedstawiający rozkład fenotypów 500 osobników w zależności od ich wysokości.



Rys. 4. Histogram przedstawiający rozkład fenotypów 500 osobników w zależności od ich MTZ.



Rys. 5. Histogram przedstawiający rozkład fenotypów 500 osobników w zależności od odporności na męczniaka.

#### Mierniki dla tematu badawczego 2

Lp.	miernik	wartość miernika podana w opisie zadania	wartość miernika zrealizowana
1	Liczba obiektów w doświadczeniu poddanych fenotypowaniu	500	500

### 3.3. Genotypowanie z wykorzystaniem metody DArTseq.

#### Cel tematu badawczego 3

- \* Analiza polimorfizmu DArTseq 270 genotypów – odmian i linii owsa przeznaczonych do mapowania asocjacyjnego
- \* Analiza polimorfizmu DArTseq 92 linii reprezentujących populację mapującą E326 z genem karłowatości *Dw7*

#### Materiały i metody

Genotypowaniu metodą DArTseq poddano 270 odmian i linii przeznaczonych do mapowania asocjacyjnego wytypowanych w roku poprzednim spośród materiałów dostarczonych przez spółki hodowlane: HR Strzelce, DANKO i MHR Polanowice. Obiekty te jednocześnie fenotypowano w ramach tematu badawczego 4.2.

Ponadto genotypowaniu poddano 92 osobniki  $F_2$  reprezentujące populację mapującą E 326 ('Bingo' × 'Pennline 116') z genem karłowatości *Dw7* oraz formy rodzicielskie.

Izolację DNA przeprowadzono z wykorzystaniem komercyjnych zestawów. W celu określenia stężenia i czystości wyizolowanego DNA przeprowadzono pomiary spektrofotometryczne przy użyciu spektrofotometru NanoDrop2000. Każdą z próbek zostanie doprowadzono do stężenia 100 ng/ $\mu$ l. Przygotowane w ten sposób roztwory DNA będą przechowywane w temperaturze -25°C. W przypadku niezadowalającej czystości próby poddano ponownej precypitacji. Dla ustalenia jakości wyizolowanego DNA przeprowadzono rozdział elektroforetyczny w 1% żelu agarozowym z 0,01% bromku etydyny w buforze TBE.

W celu identyfikacji polimorfizmu DArTseq genomowe DNA badanych form, w ilości 500 ng z każdego genotypu, wysłano do analiz, które zrealizowano w Diversity Arrays Technology, University of Canberra w Australii wg opatentowanej metodyki. Jest to jedyny ośrodek prowadzący takie analizy. Dysponuje również odpowiednim oprogramowaniem do analizy danych. Nie jest możliwe wykonanie takich badań w Polsce, ani w żadnym innym miejscu na świecie. Wyniki uzyskano w postaci macierzy binarnych przeznaczonych do mapowania asocjacyjnego.

#### Wyniki

W celu analizy polimorfizmu DArTseq 270 genotypów – odmian i linii owsa przeznaczonych do mapowania asocjacyjnego przeprowadzono izolację DNA wykorzystując komercyjne zestawy do izolacji (Sigma Aldrich), niemniej jednak zalecaną przez dostawcę zestawu procedurę dostosowano do uzyskania jak największej wydajności przy zachowaniu jak najlepszych parametrów DNA.

500 ng genomowego DNA reprezentującego 270 kolejnych genotypów przeznaczonych do analiz asocjacyjnych wysłano na 96 dołkowych płytkach Eppendorff w celu identyfikacji polimorfizmu DArTseq. W efekcie analiz sekwencyjnych uzyskano 20870 polimorficznych markerów kodominujących typu SNP oraz 32650 dominujących markerów silicoDArT. Z uwagi na stałą rozbudowę platformy DArT nomenklatura markerów została sprowadzona do nazw permanentnych, zaś uzyskane sekwencje zostały automatycznie poddawane analizie BLAST polegającej na poszukiwaniu w bazach banych sekwencji podobnych, często o znanej lub domniemanej funkcji. Zgodnie z harmonogramem prac uzyskane matryce markerów z uwagi na ogromną ilość danych zostaną opracowane statystycznie w kolejnym roku projektu.

Analiza polimorfizmu DArTseq 92 linii reprezentujących populację mapującą E326 z genem karłowatości *Dw7* również została poprzedzona izolacją DNA, a po określeniu jakości, czystości i doprowadzeniu do jednakowego stężenia próbki zostały wysłane w celu przeprowadzenia analiz. Uzyskana matryca binarna dla populacji mapującej E326 zawiera 17318 SNP - polimorficznych markerów DArTseq. Macierz binarna została ograniczona do ok. 4000 sekwencji o najlepszych parametrach i wykorzystana w ramach zadania 3.4 do konstrukcji mapy genetycznej.

#### Mierniki dla tematu badawczego 3

Lp.	miernik	wartość miernika podana w opisie zadania	wartość miernika zrealizowana
1	Liczba odmian i linii poddanych genotypowaniu metodą DArTseq	270	270
2	Liczba roślin $F_2$ populacji E326 genotypowanych metodą DArTseq	92	92

### 3. 4. Konstrukcja mapy genetycznej.

#### Cel tematu badawczego 4

- \* Celem tematu jest konstrukcja mapy genetycznej dla populacji E326 ('Bingo' × 'Pennline 116') segregującej pod względem wysokości z uwagi na obecność genu *Dw7*

#### Materialy i metody

Matryce binarne uzyskane w ramach usługi DArTseq w temacie badawczym 4.3 przefiltrowano w celu usunięcia redundancji. Pod uwagę wzięto obie możliwe fazy celem uniknięcia ewentualnych strat w zagęszczeniu mapy genetycznej powodowanych błędnym przypisaniem fazy rodziców. Mapowanie genetyczne zrealizowano za pomocą programu MultiPoint. Do mapowania użyto funkcji Kosambi. Częstość rekombinacji badano wizualnie analizując dane markerowe dla wybranej grupy sprzężeń.

Zestawienie grup sprzężeń w różnych fazach wykonano w programie MapChart.

Mapowanie kompozytowe wykonano w programie WinQTLCartographer. Za wartość progową istotności QTL badanych cech uznano wartość LOD=2.5.

#### Wyniki

Opracowano mapę genetyczną składającą się z 44 grup sprzężeń (Tab. 14) z uwzględnieniem dwóch faz (ze względu na pewne różnice w mapowaniu komplementarnych grup sprzężeń w sprawozdaniu zamieszczono dane dla obu wariantów). Oznacza to, że zidentyfikowano 22 grupy sprzężeń, które powinny odpowiadać 21 chromosomom owsa. Dla grup sprzężeń reprezentujących obie fazy rodzicielskie zidentyfikowano 689 markerów szkieletowych.

Tab. 14. Zestawienie szczegółowych danych dotyczących mapy genetycznej populacji 326 pokolenia F2 opracowanej z wykorzystaniem markerów DArTseq. Przedstawione grupy sprzężeń odzwierciedlają mapowanie w oparciu o obie fazy markerów genetycznych.

Nazwa Grupy	Liczba markerów szkieletowych	Długość w cM	Najdłuższa przerwa bez markerów	Liczba markerów dodanych
LG1	32	276	31	177
LG2	29	267	31	185
LG3	18	147	25	133
LG4	13	112	35	90
LG5	27	256	39	281
LG6	19	178	43	169
LG7	22	218	23	169
LG8	32	304	23	161
LG9	18	151	26	57
LG10	24	125	35	87
LG11	24	271	46	155
LG12	20	160	26	55
LG13	9	62	10	39
LG14	13	94	12	37
LG15	12	96	18	67
LG16	11	120	23	16
LG17	12	129	24	15
LG18	11	94	13	30
LG19	12	81	13	39
LG20	17	217	37	93
LG21	14	89	10	40
LG22	32	393	43	153
LG23	11	97	17	32
LG24	12	99	17	31
LG25	28	343	52	124
LG26	10	82	18	70
LG27	9	62	10	44
LG28	11	94	13	30
LG29	15	156	37	48



Nazwa Grupy	Liczba markerów szkieletowych	Długość w cM	Najdłuższa przerwa bez markerów	Liczba markerów dodanych
LG30	7	67	22	26
LG31	13	93	10	41
LG32	7	47	11	38
LG33	7	38	8	20
LG34	18	209	42	39
LG35	16	165	42	34
LG36	13	102	22	74
LG37	11	146	44	46
LG38	16	129	14	25
LG39	12	97	15	29
LG40	11	134	44	46
LG41	13	105	15	72
LG42	7	73	31	40
LG43	10	61	12	44
LG44	11	68	12	43

Mapa genetyczna ma długość 6 307 cM. Łączna długość luk to 1094cM, natomiast liczba markerów dodanych stanowi 3244. Średnio jeden marker występuje co 10-11cM (Tab. 15).

Tab. 15. Zestawienie charakterystyk mapy genetycznej

	Markery szkieletowe	Długość mapy	Luki	Markery dodane
<b>Łącznie</b>	<b>689</b>	<b>6307</b>	<b>1094</b>	<b>3244</b>
<b>Uśrednione</b>	<b>15,65</b>	<b>143,34</b>	<b>24,86</b>	<b>73,72</b>
<b>Maks</b>	<b>32</b>	<b>393</b>	<b>52</b>	<b>281</b>
<b>Min</b>	<b>7</b>	<b>38</b>	<b>8</b>	<b>15</b>
<b>Zagęszczenie</b>	<b>0,10</b>			

Analiza grup sprzężeń opracowanych dla markerów w różnych fazach wykazuje dużą zbieżność uzyskanych wyników (Ryc. 7). Tylko w nielicznych przypadkach można obserwować niewielkie zmiany w kolejności markerów, które występują w sąsiedztwie ze sobą. Należy jednak podkreślić, że poszczególne grupy mogą zawierać różne ilości markerów. Niektóre z grup nie mają swoich odpowiedników (Tab. 16) co jest wynikiem redukcji złożoności danych i nieuwzględnieniem w niniejszym zestawieniu grup o długości poniżej 30cM.

Tab. 16. Zestawienie grup sprzężeń i ich odpowiedników w przeciwnej fazie

LG	analog	LG	analog	LG	analog
LG1	2	LG17	16	LG33	???
LG2	1	LG18	28	LG34	35
LG3	11	LG19	14	LG35	34
LG4	10	LG20	29, 42	LG36	41
LG5	6, 22	LG21	31	LG37	40
LG6	5	LG22	5, 25	LG38	39
LG7	8	LG23	24	LG39	38
LG8	7	LG24	23	LG40	37
LG9	12	LG25	22	LG41	36
LG10	4	LG26	15	LG42	20
LG11	3, 30	LG27	13	LG43	44
LG12	9	LG28	18	LG44	43
LG13	27	LG29	20		
LG14	19	LG30	11		

<b>LG</b>	<b>analog</b>	<b>LG</b>	<b>analog</b>	<b>LG</b>	<b>analog</b>
LG15	26	LG31	21		
LG16	17	LG32	???		

Tab. 17. Zestawienie lokalizacji QTL badanych cech na grupach sprzężeń.

Cecha	LG 1	LG 2	LG 3	LG 4	LG 5	LG 6	LG 7	LG 8	LG1 1	LG1 2	LG1 5	LG2 0	LG2 1	LG2 2	LG2 3	LG2 4	LG2 5	LG2 6	LG2 9	LG3 0	LG3 1	LG3 2	LG3 7	LG3 8	LG3 9	LG4 0	LG4 3
Wysokość			x								x	x															
Liczba pedów produkcyj.																										x	
Liczba niedogonów													x								x						x
Liczba kłosek																						x					
Plodność kłoska														x					x								
Liczba ziarniaków															x									x			
Masa ziarniaków	x	x													x												
MTZ	x	x												x								x					
I	x																							x	x		
II								x				x															
III					x	x					x																
IV		x						x	x																		
V												x								x				x			x
Długość wiechy			x											x					x								
PNW								x	x										x	x							
Nagość	x	x																									
Kształt wiechy																		x									

Mierniki dla tematu badawczego 4

Lp.	miernik	wartość miernika podana w opisie zadania	wartość miernika zrealizowana
1	Liczba konstruowanych map genetycznych.	1	1

### 3. 5. Identyfikacja markerów cech.

#### Cel tematu badawczego 5

- \* Poszukiwanie w populacji Celer× STH 9210 markera dla genu *Dw6* metodą RAPD.
- \* Identyfikacja markerów DArTseq dla genu *Dw7* i ich konwersja na markery specyficzne.

#### Materiały i metody

Analizy PCR-RAPD przeprowadzono dla wytypowanych homozygotycznych pod względem genu *Dw6* roślin  $F_2$  populacji Celer× STH 9210. Ekstrakcję całkowitego genomowego DNA przeprowadzono przy użyciu komercyjnych zestawów. Czystość i stężenie DNA określono spektrofotometrycznie, a jakość elektroforetycznie. Wszystkie preparaty doprowadzono do jednakowego stężenia 100 ng/ $\mu$ l. Próby zbiorcze przygotowano zgodnie z metodą BSA (BulkSegregant Analysis) (Michelmore i in. 1991). W tym celu DNA homozygotycznych roślin  $F_2$ , po doprowadzeniu do jednakowego stężenia (100 ng/ $\mu$ l), połączono ze sobą w jednakowych objętościach. Próbę zbiorczą utworzono z DNA 10 osobników  $F_2$  o określonym genotypie.

Amplifikację losowych fragmentów DNA przeprowadzono przy zastosowaniu 500 arbitralnych starterów RAPD dla 8 matryc DNA. Reakcję PCR prowadzono w 20  $\mu$ l mieszaniny reakcyjnej zawierającej: wodę dejonizowaną, bufor,  $MgCl_2$  (2mM), dNTP (200mM), starter (10pMol), polimerazę *Taq* (1U) i DNA (40ng). Amplifikację przeprowadzono na termocyklerze T Professional Basic (Biometra). Zastosowano profil termiczny: wstępna denaturacja - 95°C - 3 min, denaturacja - 94°C - 45 s; annealing - 36°C - 45 s; wydłużanie - 72°C - 45 s; końcowe wydłużanie - 72°C - 7 min. W celu identyfikacji polimorfizmów występujących pomiędzy osobnikami niskimi i wysokimi przeprowadzono rozdział elektroforetyczny w 2% żelu agarozowym z 0,01% EtBr w buforze TBE (89 mM Tris-boran, 2,5 mM EDTA) przez 3 h przy napięciu 120V. Żele dokumentowano w systemie PolyDoc. W celu weryfikacji czy potencjalne markery są sprzężone z genem *Dw6* przeprowadzono reakcje RAPD dla wytypowanych starterów z DNA pojedynczych homozygotycznych roślin  $F_2$  zgodnie z metodyką podaną powyżej.

Spośród roślin dla których przeprowadzono analizy DArTseq w roku 2014 zidentyfikowano homozygoty dominujące (*Dw7Dw7*) oraz homozygoty recesywne (*dw7dw7*). Analizę segregacji markerów DArTseq prowadzono pod kątem identyfikacji ok. 10 markerów, których segregacja odpowiadała genotypom poszczególnych roślin. Na podstawie sekwencji zidentyfikowanych markerów zaprojektowano startery do reakcji typu ASA lub STS. Projektowanie starterów przeprowadzono w programie Primer3 dostępnym na stronie NCBI z zastosowaniem specyficznych parametrów dla krótkich sekwencji. Zidentyfikowane markery DArTseq dla genu *Dw7* przekonwertowano na markery specyficzne.

W mieszaninie reakcyjnej o objętości 15  $\mu$ l w reakcji STS zastosowano: 1 x bufor do PCR, 200  $\mu$ M dNTP; 0,4 pMol poszczególnych starterów; 1,3 mM  $MgCl_2$ ; 30 ng genomowego DNA; 0,5 U Hot Start *Taq* DNA Polymerase. Zastosowano następujące profile termiczne: wstępna denaturacja przez 4 min. w 94°C, 35 cykli: denaturacja 94°C - 30 s, przyłączanie starterów (od 45 do 68°C – w zależności od sekwencji startera) - 20 s, wydłużanie starterów 72°C – 30 s, z końcową inkubacją 7 min. w 72°C. Optymalną temperaturę przyłączania każdego startera ustalono po przeprowadzeniu reakcji w gradiencie temperatury. Amplifikację STS prowadzono na termocyklerze Biometra. Produkty reakcji rozdzielono w 3% żelu agarozowym (Micropore NU, Prona) z 0,01% EtBr w buforze TBE (89 mM Tris-boran, 2,5 mM EDTA). Żele archiwizowano z wykorzystaniem systemu dokumentacji PolyDoc.

#### Wyniki

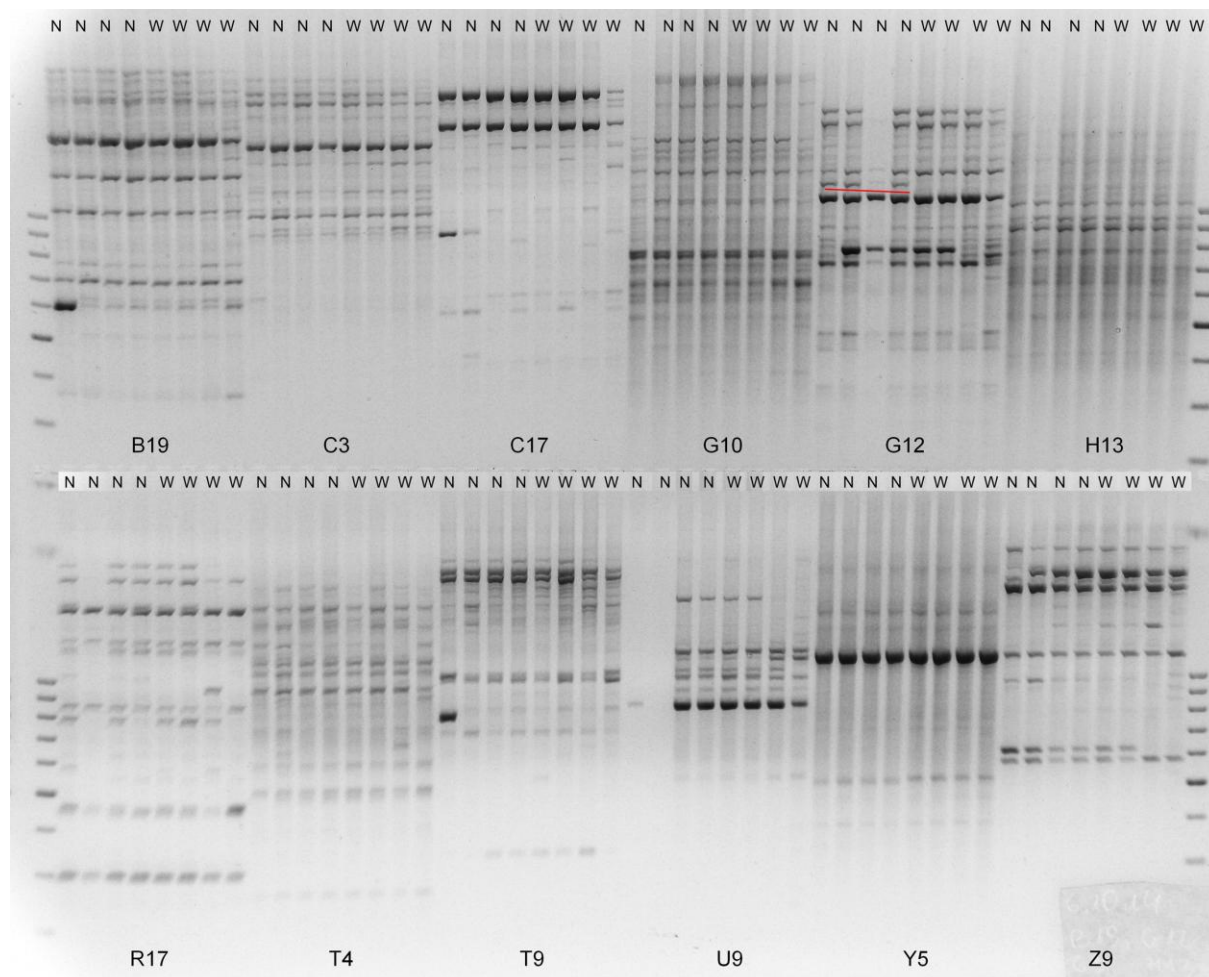
W celu identyfikacji potencjalnych markerów dla genu odporności obecnego w linii STH 9210 przeprowadzono analizę PCR-RAPD na wytypowanych homozygotycznych pod względem tego genu roślinach  $F_2$  populacji E310. Reakcję przeprowadzono na próbach zbiorczych niskich i wysokich roślin populacji  $F_2$ , które przygotowano zgodnie z metodą BSA (Bulk Segregant Analysis) (Michelmore i in. 1991). Homozygoty dominujące - niskie i homozygoty recesywne - wysokie

zidentyfikowano na podstawie obserwacji wysokości roślin pokolenia F<sub>3</sub>. Próbę zbiorczą utworzyło DNA 10 osobników F<sub>2</sub> o określonym genotypie.

Do testowania wykorzystano 500 starterów RAPD z zestawów Operon Technologies:

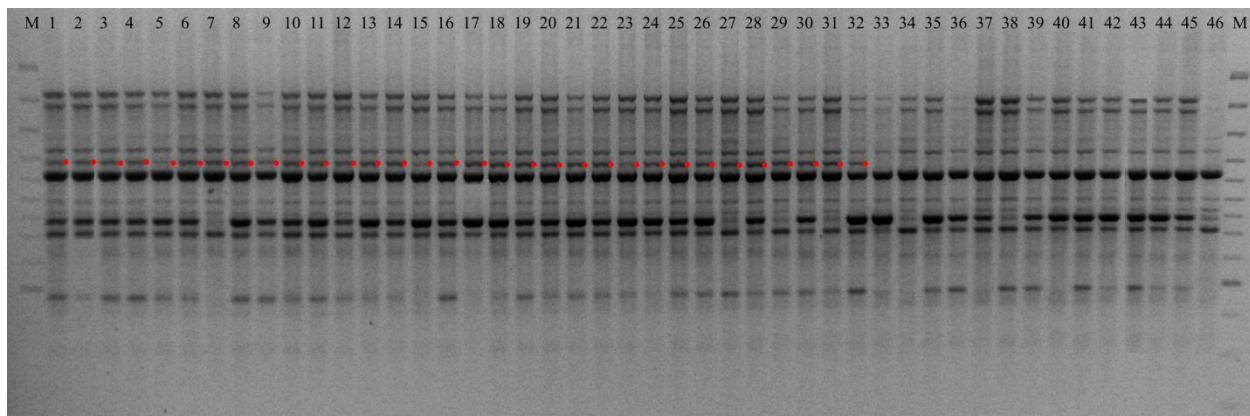
A1-A20, B1-B20, C1-C20, D1-D20, E1-E20,  
F1-F20, G1-G20, H1-H20, I1-I20, J1-J20,  
K1-K20, L1-L20, M1-M20, N1-N20, O1-O20,  
P1-P20, Q1-Q20, R1-R20, S1-S20, T1-T20,  
U1-U20, V1-V20, W1-W20, Y1-Y20, Z1-Z20.

Dla większości starterów nie uzyskano produktów różnicujących, niemniej jednak dla kilku z nich ( B19, C3, C17, G10, G12, H13, R17, T4, T9, U9, Y5 oraz Z9 zaobserwowano potencjalne produkty charakterystyczne tylko dla prób zbiorczych form niskich lub wysokich.

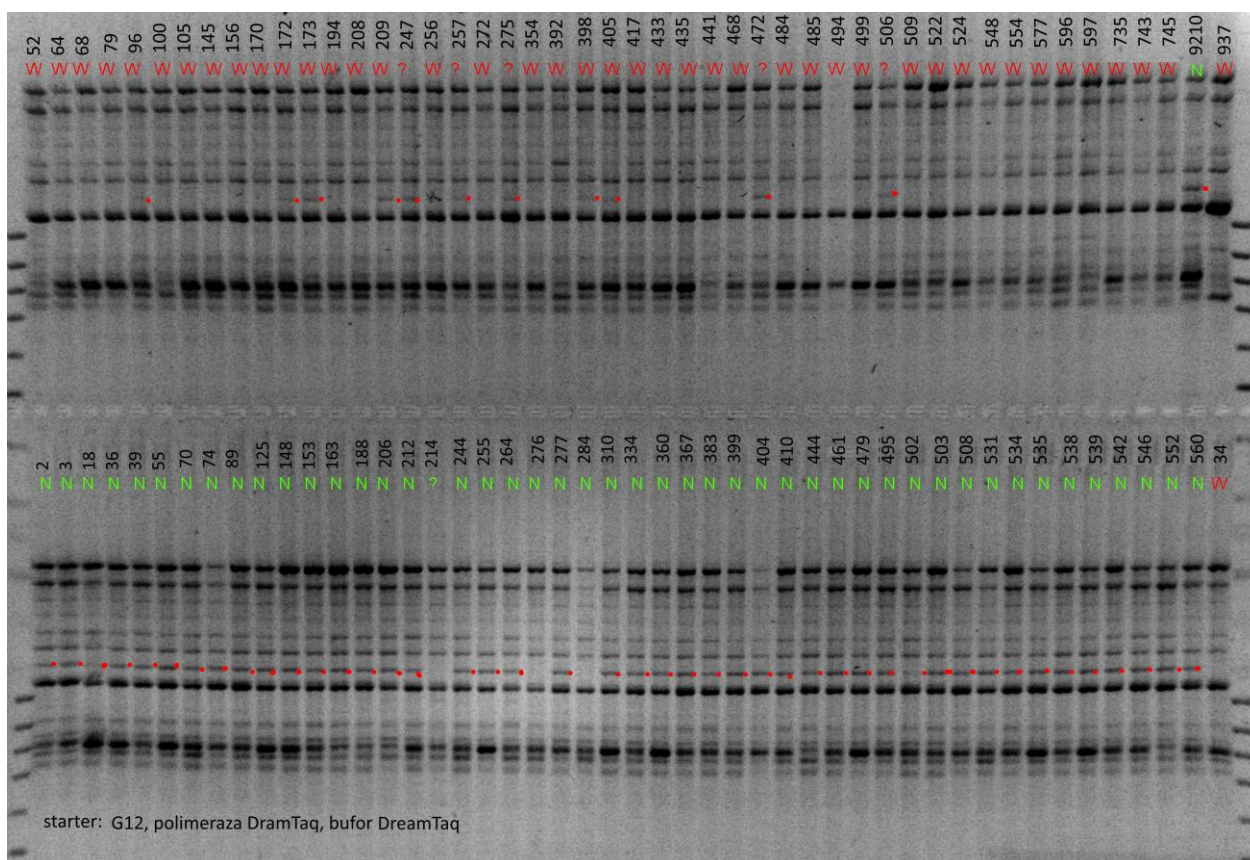


Fot.1. Produkty uzyskane w wyniku amplifikacji DNA wybranych homozygot niskich i wysokich przy użyciu startera G<sub>12</sub>. Zaznaczono fragment długości 1200 pz charakterystyczny dla form niskich.

Zastosowanie matryc pojedynczych homozygotycznych roślin F<sub>2</sub> niskich i wysokich wyeliminowało wszystkie potencjalne startery z wyjątkiem G<sub>12</sub> (Fot. 1).. Starter G<sub>12</sub> inicjuje amplifikację produktu o długości 1200 pz charakterystycznego dla form niskich W celu weryfikacji czy potencjalny marker jest sprzężony z genem *Dw6* przeprowadzono reakcję RAPD dla wytypowanego startera z DNA homozygotycznych roślin F<sub>2</sub> zgodnie z metodyką reakcji na próbach zbiorczych (Fot. 2).



Fot.2. Produkty uzyskane w wyniku amplifikacji DNA wybranych homozygot niskich i wysokich przy użyciu startera G12. Zaznaczono fragment długości 1200 pz charakterystyczny dla form niskich.



Fot. 3 Produkty uzyskane w wyniku amplifikacji DNA homozygot niskich i wysokich przy użyciu startera G12. Zaznaczono fragment długości 1200 pz charakterystyczny dla form niskich c.d.

W sumie analizie pod kątem obecności produktu  $G12^{1200}$  poddano 79 homozygot niskich, 75 homozygot wysokich i 39 heterozygot (Fot. 3 i Fot. 4). Spośród roślin niskich wszystkie z wyjątkiem 3 charakteryzowały się obecnością produktu  $G12^{1200}$ . Obecność produktu stwierdzono również u 5 roślin wysokich. Amplikon pojawił się w każdej heterozygotie. Niedopasowanie markera do genotypu odnotowano, więc w 8 przypadkach na 154, co stanowi 5,2%.

Kolejnym celem tematu badawczego była identyfikacja markerów DArTseq dla genu *Dw7* i ich konwersja na markery specyficzne. Na podstawie obserwacji wysokości linii  $F_3$  populacji E337 ustalono genotyp odpowiadających im roślin  $F_2$ . Zidentyfikowano homozygoty dominujące (*Dw7Dw7*) oraz homozygoty recesywne (*dw7dw7*). Analizę segregacji markerów DArTseq na matrycach binarnych prowadzono pod kątem identyfikacji tych markerów, których segregacja odpowiadała genotypom homozygot niskich i wysokich. Zidentyfikowano ok. 25 potencjalnych sekwencji (Tab. 18) i 10 z nich przeznaczono do konwersji na markery allelospecyficzne lub specyficzne (Tab. 19).

Tab. 18. Sekwencje DArTseq – potencjalne markery dla genu Dw7 w populacji 337. Zaznaczono sekwencje przeznaczone do konwertowania.

Sekwencje DArTseq	
100163498 F 0-64:C>T-64:C>T	<b>5438395 F 0-18:T&gt;A-18:T&gt;A</b>
3277047 F 0-29:T>A-29:T>A	5439299 F 0-11:G>C-11:G>C
3277359 F 0-54:G>T-54:G>T	5439301 F 0-8:T>C-8:T>C
3278123 F 0-46:T>C-46:T>C	5439539 F 0-14:G>A-14:G>A
3281849 F 0-26:C>A-26:C>A	5441201 F 0-45:C>T-45:C>T
3282101 F 0-45:C>A-45:C>A	5441556 F 0-50:T>C-50:T>C
<b>5424114 F 0-38:G&gt;A-38:G&gt;A</b>	<b>5441603 F 0-39:A&gt;G-39:A&gt;G</b>
<b>5424368 F 0-28:C&gt;T-28:C&gt;T</b>	5443671 F 0-7:C>A-7:C>A
<b>5424964 F 0-36:C&gt;T-36:C&gt;T</b>	<b>5444719 F 0-48:T&gt;G-48:T&gt;G</b>
<b>5425001 F 0-43:T&gt;C-43:T&gt;C</b>	<b>5445199 F 0-66:T&gt;C-66:T&gt;C</b>
5430674 F 0-6:C>T-6:C>T	5445235 F 0-12:A>G-12:A>G
5435198 F 0-39:C>G-39:C>G	<b>5447521 F 0-43:C&gt;T-43:C&gt;T</b>
<b>5435664 F 0-43:A&gt;G-43:A&gt;G</b>	

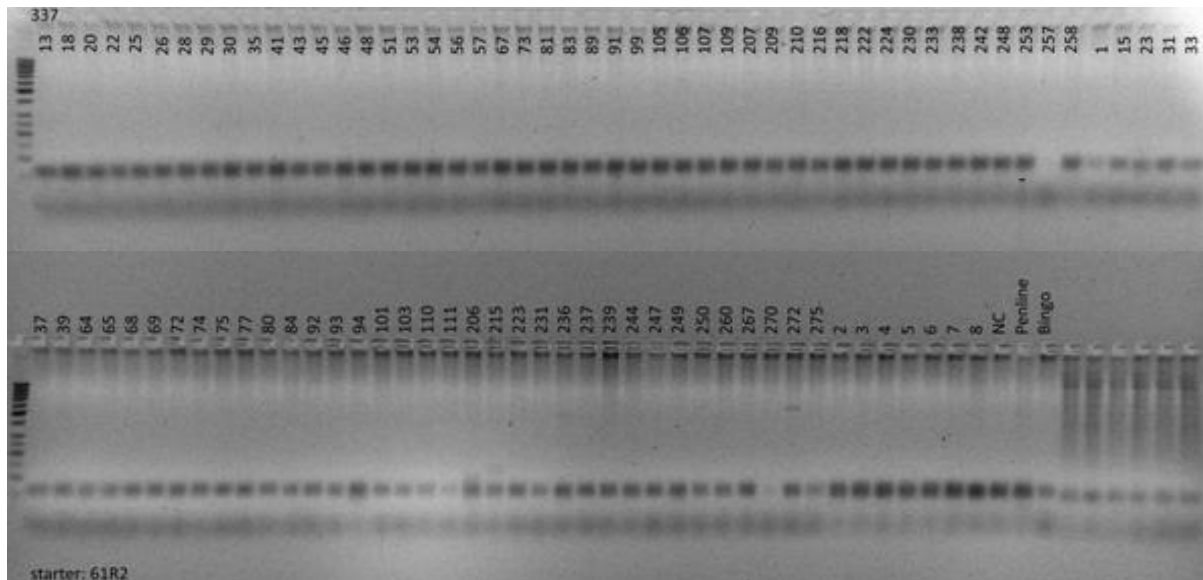
Tab. 19. Startery do reakcji typu ASA i STS zaprojektowane w oparciu o sekwencje DArTseq.

Nr laboratoryjny	Nazwa sekwencji	Sekwencja startera: (5' - 3')	Liczba nukleotydów	Tm
57_F1	F1_5424114	AGCCATTGAGAACCTCACAC	20	62
57_R1	R1_5424114	GGTGAGATTGTTCTGTGAGAAGC	23	64
57_R2	R2_5424114	GGTGAGATTGTTCTGTGAGAAGT	23	61
58_F1	F1_5424368	GCTTGATTGGTCGATAGATCGCT	23	67
58_R1	R1_5424368	ACCGAATCAAATCTCCACTCCT	22	65
58_F2	F2_5424368	GCTTGATTGGTCGATAGATCGTT	23	65
59_F1	F1_5435664	CTGAACCAGTTTCTGAAGGCGAC	23	68
59_R1	R1_5435664	GTACGTGCCTACGTCGTCGGAT	22	69
59_R2	R2_5435664	GTACGTGCCTACGTCGTCGGAC	22	70
60_F1	F1_5441603	GCGGCCAGAACCGTG	15	66
60_R1	R1_5441603	TCCCACGTCCATGAATGTG	19	66
60_R2	R2_5441603	TCCCACGTCCATGAATGCG	19	70
61_F1	F1_5444719	CGCGCTTCCAAGCGACGAT	19	73
61_R1	R1_5444719	CCCCTGATCCTGCTGATGGA	21	70
61_R2	R2_5444719	CCCCTGATCCTGCTGATGGC	21	71
62_F	F1_5445199	AGGTGTGGATCGAGTACGACGGC	23	72
62_R	R1_5445199	GCACGCCCGGGGTGACA	18	79
63_F1	F1_5425001	TGCAGTTACAGCGTAGTGCT	20	61
63_R1	R1_5425001	TCGGATGATCATAGGGCAATGGA	23	71
63_R2	R2_5425001	TCGGATGATCATAGGGCAATGGG	23	72
64_F1	F1_5424964	TGCTGCACTGTCTATAGGTTTC	22	61
64_R1	R1_5424964	ACGTCACGGTTTATTCTCTAGC	22	61
64_R2	R2_5424964	ACGTCACGGTTTATTCTCTAAC	22	59
65_F1	F1_5447521	GGCCGTAGGACTCGC	15	51
65_R1	R1_5447521	CGGACGCCGCCGCG	14	47
65_R2	R2_5447521	CGGACGCCGCCACG	14	45
66_F	F_5438395	TGCAGGCGCGGACGTGC	17	68
67_F	R_5439395	CCGCGCGTTACGTCTGT	17	63

W pierwszym etapie oceny starterów przeprowadzono reakcje dla form rodzicielskich. Jednocześnie testowano różne przedziały temperatur przyłączania starterów, w celu określenia temperatury optymalnej. W efekcie tych reakcji dla każdej pary starterów ustalono optymalną temperaturę annealingu. W reakcji amplifikacji wykorzystano trzy różne polimerazy: polimerazę Taq (Thermo Scientific), DreamTaq (Thermo Scientific) oraz polimerazę JumpStart (Sigma). Najlepsze efekty uzyskano dla polimerazy JumpStart. Przeprowadzone analizy dostarczyły wstępnej informacji o przydatności poszczególnych par starterów do identyfikacji genu Dw7.

Dla wybranych par starterów (m.in. 57, 58 i 61) próbowano bardzo dokładnie dopasować temperaturę annealingu, aby zwiększyć specyficzność reakcji. Wstępne analizy prowadzone na DNA wyizolowanym z form rodzicielskich dawały całkiem zadowalające rezultaty, ale wyniki nie były powtarzalne.

Na podstawie wyniku asymetrycznego PCR dla par starterów 58F1, 60R2, 61R2 oraz 63R2 przeprowadzonego na losowo wybranych 4 roślinach niskich i wysokich stwierdzono, że efekt amplifikacji uzyskany dla par 61R2 jest zadowalający. Amplifikacja miała co prawda miejsce zarówno u form niskich, jak i wysokich, ale u tych pierwszych była wielokrotnie silniejsza.



Fot. 8. PCR dla pary starterów 61R2.

Przeprowadzono, więc z parą starterów 61R2 reakcję dla 45 homozygot niskich, 40 homozygot wysokich, 7 heterozygot oraz form rodzicielskich (fot. 8). Różnice w amplifikacji są widoczne niemniej jednak nie są na tyle wyraźne, aby jednoznacznie móc stwierdzić genotyp rośliny na podstawie uzyskanego profilu DNA. Wydaje się konieczna niewielka zmiana sekwencji startera lub starterów w obrębie pary 61, ewentualnie sprawdzenie pozostałych 15 potencjalnych sekwencji specyficznych dla *Dw7* pod względem przydatności do identyfikowania homozygot niskich i odróżniania ich od fenotypowo takich samych heterozygot.

#### Mierniki dla tematu badawczego 5

Lp.	miernik	wartość miernika podana w opisie zadania	wartość miernika zrealizowana
1	Liczba testowanych starterów RAPD	500	500
2	Liczba sekwencji DArTseq sprzężonych z obecnością genu <i>Dw7</i>	min. 10	11

4. Mierniki dla zadania - planowana prezentacja wyników badań (podać w tabeli - należy wymienić konferencje, na których zaprezentowano wyniki i/lub wymienić publikacje, przygotowane i przyjęte do druku w trakcie realizacji zadania w danym roku).

Prezentacja wyników na konferencjach				
lp.	konferencja	miernik	wartość miernika podana w opisie zadania	wartość miernika zrealizowana
1	XII Ogólnopolska Konferencja Naukowa „Nauka dla hodowli i nasiennictwa roślin uprawnych”, 2-6 lutego 2015 r., Zakopane (wyniki uzyskane w temacie bad. 4.5/2015 na str. 32-34)	poster	1	1
2	Oat 2020 Conference, 23-25 listopada 2015 r., Solihull, Birmingham, Wielka Brytania (wyniki prezentowane w sprawozdaniu w temacie bad. 3.6 /2014 na stronach 26-31)	poster	1	1
Publikacje w monografiach/czasopismach recenzowanych				
lp.	monografia/czasopismo	miernik	wartość miernika podana w opisie zadania	wartość miernika zrealizowana
	-	-	-	-

Jeśli któryś z mierników nie został zrealizowany należy podać przyczyny.

Załączniki:

1. Edyta Paczos-Grzęda, Agnieszka Ostrowska, Aneta Koroluk, Sylwia Róg, Maria Chrzęstek, Piotr Tomasz Bednarek. Poszukiwanie uniwersalnych markerów dla genu Dw6 w owsie. XII Ogólnopolska Konferencja Naukowa „Nauka dla hodowli i nasiennictwa roślin uprawnych”, 2-6 lutego 2015 r., Zakopane.
2. Edyta Paczos-Grzęda, Sylwia Róg, Agnieszka Ostrowska, Piotr T. Bednarek. 2015. DArTseq markers towards Dw6 dwarfing gene in oats. Oat 2020 Conference, 23-25 listopada 2015 r., Solihull, Birmingham, Wielka Brytania.

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

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

Sporządzono:

Lublin, 10.01.2016 r.

Pieczęć jednostki

Osoba reprezentująca jednostkę

Kierownik zadania

data

podpis i pieczęć

podpis





# Poszukiwanie uniwersalnych markerów dla genu *Dw6* w owsie

Edyta Paczos-Grzęda,<sup>1</sup> Agnieszka Ostrowska,<sup>1</sup> Aneta Koroluk,<sup>1</sup> Sylwia Róg,<sup>1</sup>  
Maria Chrząstek,<sup>1</sup> Piotr Tomasz Bednarek<sup>2</sup>

<sup>1</sup>Instytut Genetyki, Hodowli i Biotechnologii Roślin, Uniwersytet Przyrodniczy w Lublinie

<sup>2</sup>Zakład Biochemii i Fizjologii Roślin, IHAR-PIB, Radzików

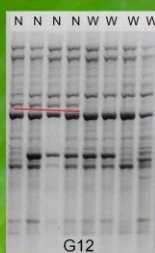
## WPROWADZENIE:

Podstawowym celem hodowli zbóż jest uzyskanie odmian wysokiej jakości, charakteryzujących się lepszą plennością oraz odpornością na stres biotyczny i abiotyczny, co skutkuje pozyskiwaniem zwiększonego plonu ziarna z jednostki powierzchni, niezależnie od zmiennych warunków środowiskowych. Problem stanowi zjawisko wylegania, które uniemożliwia efektywną wegetację roślin, utrudnia zbiory, ma niekorzystny wpływ na jakość ziarna, obniża użyteczność słomy i jest przyczyną większości strat ponoszonych w corocznych plonach. Najskuteczniejszą metodą ochrony przed wyleganiem jest zastosowanie odmian zawierających w genotypie gen karłowatości. W programach hodowlanych owsa najlepsze rezultaty daje obecnie gen *Dw6*, wywodzący się z linii OT207. Umożliwia on otrzymanie osobników wykazujących dwie najbardziej pożądane w uprawie zbóż cechy: zwiększoną odporność na wyleganie wynikającą z ograniczenia wysokości oraz duże plonowanie. Wytwarzanie odmian charakteryzujących się pożądanym fenotypem jest wspomagane poprzez zastosowanie systemów markerów molekularnych. Markery DNA stanowią obecnie jedno z najczęściej wybieranych narzędzi wykorzystywanych do identyfikacji genów sprzężonych z podstawowymi cechami użytkowymi roślin. Wspomagają one metody konwencjonalne stosowane w hodowli. Celem pracy była identyfikacja uniwersalnych markerów dla genu *Dw6*.

## MATERIAŁ ROŚLINNY

W prowadzonym eksperymencie wykorzystano mieszańce międzyodmianowe owsa *A. sativa* reprezentujące populację mapującą E310 ('Celer' x STH 9210):

- 'Celer' jest polską odmianą o wysokości ok. 110-120 cm.
- STH 9210 to linia karłowa zawierająca gen *Dw6* wyhodowana w HR Strzelce.



Fot.1. Produkty amplifikacji DNA dla 4 losowo wybranych homozygot niskich i wysokich populacji 310 przy użyciu startera G12.

## METODYKA

W celu identyfikacji markerów genu karłowatości *Dw6* pojedynczy ziarniak  $F_2$ , otrzymany w roku 2011 wysiano w roku 2012 w warunkach umożliwiających uzyskanie jak największej liczby ziarniaków  $F_2$ , które następnie wysiano w roku 2013 i zebrano ziarniaki  $F_3$ . Na podstawie przeprowadzonego w 2014 roku fenotypowania linii  $F_3$  wytypowano homozygotyczne rośliny  $F_2$ . Doświadczenia polowe prowadzono w GD UP w Lublinie w Czesławicach k/Nafęczowa.

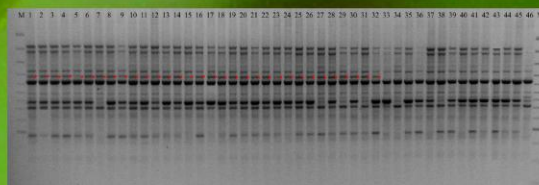
Z pobranych w trakcie wegetacji w roku 2012 fragmentów młodych liści pojedynczych roślin  $F_2$  przeprowadzono izolację DNA zmodyfikowaną metodą CTAB. Matryce w reakcji PCR stanowiło DNA form rodzicielskich populacji mapującej E310: cv. Celer x STH 9210 oraz po dwie niezależne próby zbiorcze 10 niskich i wysokich homozygotycznych roślin  $F_2$ . Próby zbiorcze przygotowano zgodnie z metodą BSA. Do wstępnej identyfikacji potencjalnych markerów dla genu *Dw6* wykorzystano 530 starterów RAPD. Rozdziały elektroforetyczne produktów amplifikacji prowadzono na żelach agarozowych. W celu potwierdzenia polimorfizmów, występujących pomiędzy pulami osobników niskich i wysokich populacji mapującej E310 oraz formami rodzicielskimi przeprowadzono reakcje dla wytypowanych starterów z DNA 8 losowo wybranych homozygotycznych roślin  $F_2$ . W celu weryfikacji czy różnicujące fragmenty DNA są markerami dla genu karłowatości przeprowadzono reakcję dla 31 homozygot niskich i 12 homozygot wysokich.

## WYNIKI:

Spośród przeanalizowanych produktów amplifikacji uzyskanych dla 530 starterów RAPD wytypowano 12 (B19, C3, C17, G10, G12, H13, R17, T4, T9, U9, Y5, Z9), które różnicowały formy niskie i wysokie. Dla tych starterów powtórzono reakcję PCR – RAPD dla 4 homozygotycznych roślin niskich i 4 wysokich. Tylko jeden starter G12 inicjował amplifikację produktu różnicującego (Fot.1.). W reakcji z DNA pochodzącym z losowo wybranych homozygotycznych niskich i wysokich roślin  $F_2$  obserwowano amplifikację fragmentu G12<sup>1200bp</sup> tylko u roślin niskich (Fot.2.).

## PODSUMOWANIE:

1. Wykorzystana do analiz metoda PCR – RAPD okazała się skuteczna w poszukiwaniu potencjalnego markera molekularnego dla genu karłowatości *Dw6*.
2. Zidentyfikowano marker G12<sup>1200</sup> sprzężony z cechą karłowatości warunkowaną przez obecność dominującego allelu genu *Dw6*.
3. Użyteczność markera należy sprawdzić w pozostałych populacjach segregujących pod względem genu *Dw6*.
4. Otrzymany fragment po przeprowadzeniu konwersji na marker typu SCAR może być wykorzystywany jako potencjalny marker genu karłowatości *Dw6*.



Fot.2. Produkty uzyskane w wyniku amplifikacji DNA losowo wybranych homozygot niskich i wysokich w obrębie populacji 310 przy użyciu startera G12.

Kropkami oznaczono produkty identyfikujące homozygoty niskie. Oznaczenia poszczególnych ścieżek: M – marker, 1 – 31 – homozygoty niskie, 32 – 9210, 33 – 'Bingo', 34 – 'Celer', 35 – 46 – homozygoty wysokie.



Praca zrealizowana w ramach badań podstawowych na rzecz postępu biologicznego w produkcji roślinnej finansowanych przez MRIRW: pt. "Mapowanie asocjacyjne i sprzężeniowe owsa zwyczajnego."

