

## SPRAWOZDANIE MERYTORYCZNE

z realizacji zadania na rzecz postępu biologicznego w produkcji roślinnej w 2018 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 27 lipca 2017 r. w sprawie stawek dotacji przedmiotowych dla różnych podmiotów wykonujących zadania na rzecz rolnictwa (Dz. U. z 2017 r. poz. 1470) <b>30</b>
Planowany okres realizacji zadania <b>12 miesięcy</b>
Planowane nakłady w zł <b>180 000</b>

### B. DANE WNIOSKODAWCY

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

**Zbigniew Grądzki, Prof. dr hab., Prorektor ds. Nauki, Wdrożeń i Współpracy Międzynarodowej  
Uniwersytet Przyrodniczy w Lublinie  
ul. Akademicka 13, 20-950 Lublin  
Telefon: 81-445-60-66; Fax: 81-533-35-49, e-mail: biuro.rektora@up.lublin.pl**

### C. INFORMACJA O WYKONAWCACH

#### 1. Zespół badawczy

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

## D. OPIS ZADANIA

### 1. Cele zadania

Lp.	Cel	Czy cel został zrealizowany
1.	Precyzyjne fenotypowanie wczesnych pokoleń mieszańców. Wyprowadzanie kolejnych populacji mapujących.	TAK
2.	Kontynuowanie rozmnożeń materiałów przeznaczonych do uzyskania zaawansowanych międzyodmianowych i międzygatunkowych rekombinacyjnych linii wsobnych.	TAK
3.	Identyfikacja QTLi dla wybranych cech w populacji mapującej RIL E56 wyprowadzonej w oparciu o krzyżowanie biparentalne <i>A. fatua</i> _216 × <i>A. sativa</i> 'Sam'.	TAK
4.	Identyfikacja sekwencji DARTseq różnicujących osypujące i nieosypujące linie populacji E56 <i>A. fatua</i> × <i>A. sativa</i> .	TAK
5.	Analiza asocjacyjna MTZ linii i odmian <i>A. sativa</i> .	TAK
6.	Identyfikacja i testowanie potencjalnych markerów asocjowanych z cechą.	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
1.	Kontynuacja rozmnożeń populacji mapujących. Fenotypowanie mieszańców F <sub>1</sub> oraz rekombinacyjnych linii wsobnych. (połączone tematy 1 i 2 opisu wieloletniego)	3-11
2.	Profilowanie DNA populacji mapujących. (połączone tematy 3 i 6 opisu wieloletniego)	1-12
3.	Identyfikacja QTLi dla wybranych cech. (temat 7 opisu wieloletniego)	4-12
4.	Analiza asocjacyjna 370 linii i odmian. Identyfikacja i testowanie potencjalnych markerów asocjowanych z cechą. (połączone tematy 8 i 9 opisu wieloletniego).	3-12

### 3. Opis tematów badawczych

#### 3. 1. Kontynuacja rozmnożeń populacji mapujących. Fenotypowanie mieszańców F<sub>1</sub> oraz rekombinacyjnych linii wsobnych.

Cel tematu badawczego 1

- \* Wyprowadzenie mieszańców międzyodmianowych i międzygatunkowych.
- \* Fenotypowanie 4 międzygatunkowych kombinacji mieszańcowych F<sub>1</sub> uzyskanych w roku poprzednim.
- \* Fenotypowanie międzygatunkowej populacji mapującej RIL E56 *A. fatua* × *A. sativa*.
- \* Fenotypowanie międzyodmianowej populacji mapującej RIL E101 Bingo × STH9787.
- \* Kontynuacja rozmnożeń w kierunku RIL populacji E52, E337 i E101.

#### Wyniki

W celu wyprowadzenia międzyodmianowych populacji mapujących odmiany karłowej ‘Palestine Dwarf’ z odmianą wysoką oraz z karłowatą odmianą zawierającą gen *Dw7*, przeprowadzono krzyżowania z ‘Bingo’ oraz ‘North Caroline’ (*Dw7*). Otrzymano cztery kombinacje mieszańcowe (Tab.1). Wykorzystując ‘Palestine Dwarf’ jako formę mateczną wykastrowano 190 kwiatków, uzyskując 9 ziarniaków, przy efektywności wynoszącej 4,74%. Największą efektywność (24,14%) osiągnięto krzyżując wysoką odmianę ‘Bingo’ z karłowatą ‘Palestine Dwarf’. Stosując odwrotny kierunek krzyżowania uzyskano tylko 2 ziarniaki, przy efektywności 8,70%. Najniższą efektywność (1,14%) uzyskano krzyżując pomiędzy sobą odmiany karłowe ‘North Caroline’ oraz ‘Palestine Dwarf’. Średnia efektywność wszystkich przeprowadzonych krzyżowań wyniosła 9,54%.

Tab. 1. Efektywność krzyżowań międzyodmianowych.

Forma mateczna	Forma ojcowska	Liczba zapylnych wiech	Liczba wykastrowanych kwiatków	Liczba zawiązanych ziarniaków	Efektywność krzyżowania (%)
<b>Mieszańce międzyodmianowe</b>					
<b>Palestine Dwarf</b>	<b>Bingo</b>	2	23	2	8,70
<b>Bingo</b>	<b>Palestine Dwarf</b>	5	58	14	24,14
<b>Palestine Dwarf</b>	<b>North Caroline</b>	17	167	7	4,19
<b>North Caroline</b>	<b>Palestine Dwarf</b>	10	88	1	1,14
<b>Suma</b>		34	336	24	-
<b>Średnia</b>		-	84	6	<b>9,54</b>

Przeprowadzono również krzyżowania pomiędzy dzikimi formami rodzicielskimi populacji mapujących E52 i E56, odpowiednio *A. sterilis* (66) oraz *A. fatua* (216) otrzymując mieszańce międzygatunkowe w obydwu kierunkach. Wykastrowano 204 kwiatki uzyskując średnią efektywność krzyżowania 7,55%. Znacząco większą efektywność krzyżowania (14,14%) oraz liczbę zawiązanych ziarniaków (14) otrzymano, gdy formę mateczną stanowił *A. fatua* (Tab.1). W przypadku gdy formą mateczną był *A. sterilis* efektywność krzyżowania wynosiła jedynie 0,95%.

Tab. 2. Efektywność krzyżowań międzygatunkowych.

Forma mateczna	Forma ojcowska	Liczba zapylnych wiech	Liczba wykastrowanych kwiatków	Liczba zawiązanych ziarniaków	Efektywność krzyżowania (%)
<b>Mieszańce międzygatunkowe</b>					
<b><i>A. sterilis</i> (66)</b>	<b><i>A. fatua</i> (216)</b>	8	105	1	0,95
<b><i>A. fatua</i> (216)</b>	<b><i>A. sterilis</i> (66)</b>	7	99	14	14,14
<b>Suma</b>		15	204	15	-
<b>Średnia</b>		-	102	8	<b>7,55</b>

Fenotypowaniu poddano 4 kombinacje mieszańcowe F<sub>1</sub> uzyskane w roku poprzednim. Reprezentowały one mieszańce międzygatunkowe *A. sterilis* × *A. fatua* (2 kombinacje) oraz *A. fatua* × *A. sterilis* (2 kombinacje) (Tab.3).

Tab. 3. Wyniki fenotypowania mieszańców F<sub>1</sub>.

Nr kombinacji	Forma mateczna	Forma ojcowska	Nr rośliny	Wysokość [cm]	Liczba pędów produkcyj.	Liczba niedogonów	Długość wiechy [cm]	Liczba kłosków	Liczba ziarniaków	Masa ziarniaków [g]	Masa ziarniaków reszty [g]	Liczba ziarniaków reszty
<b>mieszańce międzygatunkowe <i>A. sterilis</i> x <i>A. fatua</i></b>												
1	<i>A. sterilis</i> 172a	<i>A. fatua</i> 216	1009/1	130	11	10	29	34	68	2,19	12,99	330
1	<i>A. sterilis</i> 172a	<i>A. fatua</i> 216	1009/2	124	4	6	24	28	50	1,67	2,29	40
2	<i>A. sterilis</i> 172a	<i>A. fatua</i> 526	1009a/1	110	5	5	24	29	59	2,17	5,58	140
<b>mieszańce międzygatunkowe <i>A. fatua</i> x <i>A. sterilis</i></b>												
3	<i>A. fatua</i> 537	<i>A. sterilis</i> 66	1011/1	120	3	6	24	45	87	2,95	1,71	40
3	<i>A. fatua</i> 537	<i>A. sterilis</i> 66	1011/2	112	3	5	29	41	59	1,97	2,02	70
4	<i>A. fatua</i> 537	<i>A. sterilis</i> 172a	1012/1	120	5	5	25	31	72	2,43	3,84	80
4	<i>A. fatua</i> 537	<i>A. sterilis</i> 172a	1012/2	90	3	1	24	24	36	1,46	1,10	40

Mieszańce F<sub>1</sub>, których formą mateczną był *A. sterilis*, były wyższe od mieszańców uzyskanych poprzez krzyżowanie w przeciwnym kierunku. Średnia liczba pędów produkcyjnych i niedogonów była również dwukrotnie wyższa u mieszańców *A. sterilis* × *A. fatua*. Pozostałe oceniane cechy, takie jak długość wiechy, liczba kłosków oraz masa i liczba ziarniaków były dość wyrównane i nie różniły się znacząco między mieszańcami o przeciwnych formułach krzyżowania. Z uwagi na większą liczbę pędów produkcyjnych mieszańce *A. sterilis* x *A. fatua* charakteryzowały się również większą liczbą i masą ziarniaków z rośliny.

Fenotypowaniu poddano także rekombinacyjne linie wsobne międzygatunkowej populacji mapującej F<sub>8</sub> E56 (*A. sativa* cv. Sam × *A. fatua* 216) oraz formy rodzicielskie tej populacji. Analizowano wysokość, liczbę pędów produkcyjnych i niedogonów, długość wiechy, liczbę kłosków, podatność na osypywanie i obecność ości. Dokonano oceny 10 roślin z każdej linii RIL. W sumie ocenie poddano 130 linii, czyli 1300 roślin pokolenia F<sub>8</sub> oraz po 30 roślin form rodzicielskich.

Linie RIL F<sub>8</sub> E56 charakteryzowały się wysoką zmiennością pod względem badanych cech, ponadto u mieszańców obserwować można było przekroczenie wartości cech rodzicielskich i tego typu sytuację odnotowano w przypadku wysokości, liczby pędów produkcyjnych, długości wiechy i liczby kłosków w wiesze.

Wysokość linii wahała się od 89,6 cm do 163,6 cm, przy czym średnia wysokość dla populacji wyniosła 120,5 cm. W porównaniu z formami rodzicielskimi wartość tej cechy była bardziej zbliżona do *A. fatua*, czyli formy matecznej, aniżeli *A. sativa*, czyli formy ojcowskiej.

Średnia długość wiechy populacji mieszańcowej wyniosła 24,6 cm, co odpowiadało średniej długości wiechy obu form rodzicielskich, ale zróżnicowanie wśród linii było bardzo duże i długość wiechy wahała się od 16,0 do 32,8 cm. Obie wartości wykroczyły poza wartości obserwowane u form rodzicielskich.

Pomimo dużej liczby kłosków u jednego z komponentów rodzicielskich, czyli u *A. sativa*, średnia ilość formowanych kłosków w wiesze wyniosła u mieszańców 49,2 i była niższa aniżeli średnia wartość tej cechy u *A. fatua* (52,4), przy czym w wiechach poszczególnych linii RIL stwierdzono występowanie od 18,8 do 133,4 kłosków.

Fenotypowaniu poddano również rekombinacyjne linie wsobne międzyodmianowej populacji mapującej F<sub>8</sub> E101 (Bingo × STH 9787) (Tab. 8) oraz formy rodzicielskie tej populacji. Analizowano wysokość, długość wiechy, liczbę kłosków, liczbę i masę ziarniaków z wiechy. Dokonywano oceny 10 roślin z każdej linii RIL. W sumie ocenie poddano 160 linii, czyli 1600 roślin pokolenia F<sub>8</sub> oraz po 30 roślin form rodzicielskich.

Linie RIL F<sub>8</sub> E101 charakteryzowały się wysoką zmiennością pod względem niektórych cech, ponadto u mieszańców obserwowano było przekroczenie wartości wszystkich obserwowanych cech w porównaniu z formami rodzicielskimi.

Wysokość linii wahała się średnio od 53,6 cm do 129,2 cm, przy czym średnia wysokość dla populacji wyniosła 89,2 cm. Średnia długość wiechy wśród linii RIL wyniosła 20,1 cm, i była większa aniżeli stwierdzona u obu form rodzicielskich, ponadto zróżnicowanie wśród linii było bardzo duże i długość wiechy wahała się od zaledwie 12,3 do 27,7 cm.

Pomimo dużej liczby kłosek formowanych u formy ojcowskiej STH 9787, średnia ilość kłosek w wieszce u mieszańców wyniosła zaledwie 52,2, przy czym w wiechach stwierdzono występowanie od 31,0 do 101,3 kłosek. Liczba ziarniaków w formach mieszańcowych była niemal identyczna z ilością ziarniaków formowanych w wiechach formy ojcowskiej, która pod tym względem przewyższała formę mateczną o około 17%. Masa ziarniaków z wiechy u mieszańców była wyższa, aniżeli u obu form rodzicielskich, co po uwzględnieniu liczby ziarniaków w wieszce pozwala wnioskować, że u mieszańców powstawały ziarniaki o większej masie, aniżeli u form rodzicielskich.

Celem zadania było również rozmnożenie kolejnych pokoleń (F<sub>6</sub>, F<sub>7</sub>, F<sub>8</sub>) mieszańców międzyodmianowych oraz międzygatunkowych w kierunku uzyskania RIL (populacje 32, 52, 101, 310, 337).

Tab. 4. Rozmnożenie kolejnych pokoleń mieszańców.

Populacja	Rodowód	Liczebność roślin w pokoleniu			Suma roślin w populacji
		F <sub>6</sub>	F <sub>7</sub>	F <sub>8</sub>	
E32	<i>A. fatua</i> 216 × Sam	-	-	110	110
E52	<i>A. sterilis</i> 66 × Sam	-	95	55	150
E101	Bingo × STH 9787	-	160	-	160
E310	Celer × STH 9210	-	200	-	200
E337	Bingo × North Carolina	100	100	-	200
<b>Suma</b>		100	555	165	820

Rozmnożono odpowiednio 100, 555 oraz 165 linii pokoleń F<sub>5</sub>, F<sub>6</sub> i F<sub>7</sub> (Tab. 4). W sumie zebrano izolowane ziarniaki z 820 poletek. Największą liczebnością charakteryzowały się populacje E310 oraz E337, dla których zebrano ziarniaki z 200 poletek. Najmniejszą liczebnością charakteryzowała się populacja E32 posiadająca w rodowodzie dziki gatunek *A. fatua*.

### Wnioski

1. Uzyskane mieszańce F<sub>1</sub> będą materiałem badawczym w kolejnych latach badań. Będą one służyły głównie weryfikacji markerów uzyskanych w oparciu o dotychczas wyprowadzone populacje.
2. Uzyskane linie mieszańcowe są źródłem zróżnicowania genetycznego, poszerzają pulę genetyczną owsa zwyczajnego i mogą zostać wykorzystane w pracach hodowlanych.
3. Analiza cech ilościowych w populacjach E101 oraz E56 wykazała, że w zdecydowanej większości nie mają one rozkładu normalnego.

### Mierniki dla tematu badawczego 1

Lp.	miernik	wartość miernika podana w opisie zadania	wartość miernika zrealizowana
1	Liczba wyprowadzanych kombinacji mieszańcowych	3	3
2	Liczba fenotypowanych kombinacji F <sub>1</sub>	4	4
3	Liczba fenotypowanych populacji F <sub>8</sub> RIL	2	2
4	Liczba populacji prowadzonych w kierunku RIL	5	5

### 3. 2. Profilowanie DNA populacji mapujących.

Cel tematu badawczego 2

- \* Analiza polimorfizmu DArTseq 120 linii reprezentujących populację mapującą F<sub>2</sub> E822 (*A. sterilis* × *A. sativa*) oraz 150 linii RIL E101 (*A. sativa* STH9787 × *A. sativa* Bingo)

#### Wyniki

Genotypowaniu metodą DArTseq poddano 120 linii reprezentujących populację mapującą F<sub>2</sub> E822 (*A. sterilis* × *A. sativa*), 150 linii RIL E101 (*A. sativa* STH9787 × *A. sativa* Bingo) oraz formy rodzicielskie. Przeprowadzona wstępnie analiza hierarchiczna wykazała, że analizowane populacje nie zawierają duplikatów. Oznacza to, że każdy osobnik w populacji jest odmienny. Wstępna analiza uzyskanych matryc binarnych wykazała, że heterozygotyczność markerów, jak również osobników jest stosunkowo niewielka. Prawdopodobnie wpłynęło na ten wynik wyrównanie i wysoki stopień homozygotyczności mieszańców międzyodmianowych RIL 101. Wyniki te wskazują, że dane nadają się do opracowania mapy genetycznej dla tej populacji w kolejnym roku realizacji projektu. Z kolei dane uzyskane dla populacji E822 posłużą do weryfikacji markerów dla cech związanych z udomowieniem owsa uzyskanych w oparciu o analizy genetyczne populacji E52 i E56.

#### Wnioski

1. Metoda DArTseq umożliwiła uzyskanie dużej liczby markerów molekularnych użytecznych do mapowania genetycznego.
2. Zidentyfikowano bardzo duże ilości markerów typu SNP oraz silicoDArT o bardzo wysokiej jakości i wiarygodności.

Mierniki dla tematu badawczego 2

Lp.	miernik	wartość miernika podana w opisie zadania	wartość miernika zrealizowana
1	Liczba linii F <sub>2</sub> genotypowanych metodą DArTseq	120	120
2	Liczba linii RIL F <sub>8</sub> genotypowanych metodą DArTseq	150	150

### 3. 3. Identyfikacja QTLi dla wybranych cech.

Cel tematu badawczego 3

- \* Celem tematu jest identyfikacja QTLi dla wybranych cech w oparciu o populację mapującą F<sub>8</sub> E56 (*A. fatua* × *A. sativa* 'Sam')

#### Wyniki

Mapę genetyczną dla populacji E56 skonstruowaną w roku ubiegłym wykorzystano do naniesienia QTLi dla dwóch analizowanych cech osypywania ziarniaków oraz wysokości roślin. W przypadku osypywania, które dziedziczy się jak cecha warunkowana jednogennie, zidentyfikowano tylko jeden bardzo silny QTL, który zlokalizowano na końcu grupy LG 22. W przypadku wysokości, która ma rozkład normalny i jest cechą warunkowaną poligenicznie, zidentyfikowano 8 QTLi w obrębie 6 grup sprzężeń LG1, LG5, LG9, LG12, LG13 oraz LG16.

#### Wnioski

1. Dla osypywania ziarniaków w populacji RIL zidentyfikowano jeden bardzo silny QTL na grupie sprzężeń LG 22.
2. W przypadku wysokości roślin w populacji RIL E56 (*A. fatua* × *A. sativa*) zidentyfikowano 8 QTLi w obrębie 6 grup sprzężeń LG1, LG5, LG9, LG12, LG13 oraz LG16, z których największy wpływ na kształtowanie cechy miał jeden z QTLi zlokalizowany na LG5.

Mierniki dla tematu badawczego 3

Lp.	miernik	wartość miernika podana w opisie zadania	wartość miernika zrealizowana
1	Liczba analizowanych cech.	2	2

### 3. 4. Analiza asocjacyjna 370 linii i odmian. Identyfikacja i testowanie potencjalnych markerów asocjowanych z cechami.

Cel tematu badawczego 4

- \* Analiza asocjacyjna – MTZ.
- \* Próba konwersji markerów SRAP dla genu *Dw7* w marker typu SCAR.
- \* Testowanie potencjalnych markerów zasocjowanych z wysokością.

#### Wyniki

Do analizy w pakiecie GAPIT R użyto markerów molekularnych DArTseq i silicoDArT uzyskanych dla 370 odmian i linii owsa. Szczegółowa analiza danych genotypowych uzyskanych dla populacji przeznaczonych do mapowania asocjacyjnego przeprowadzona w roku ubiegłym wykazała, że dobór osobników został przeprowadzony prawidłowo, a dane genotypowe mogą być wykorzystywane do określenia asocjacji markerów z badanymi cechami.

Analizę przeprowadzono dla każdego roku i/lub powtórzenia niezależnie. Analizowano m.in. rozkład fenotypów w populacji i średnie, a także odchylenie od średniej. Niezależnie od roku badań rozkład wartości dla MTZ był rozkładem normalnym. Analizowano również możliwość predykcji markerów asocjowanych z cechą, a także jej odziedziczalność.

Na podstawie przeprowadzonych analiz stwierdzono, że wiele uzyskanych markerów wykazuje silną asocjację z analizowaną cechą, czyli MTZ ocenianą w jednym powtórzeniu w latach 2014 i 2015 oraz w dwóch powtórzeniach w roku 2016. Analizę asocjacyjną przeprowadzono dla każdego procesu fenotypowania niezależnie. W przypadku markerów silicoDArT markerów, które wykazały się silną asocjacją z badaną cechą co najmniej w trzech latach badań lub w czterech powtórzeniach zidentyfikowano 2 spośród 60 tys., z kolei 19 markerów asocjowało z cechą w dwóch latach badań, ale jednocześnie w trzech powtórzeniach. Spośród testowanych 60 tys. markerów DArTseq 4 wykazały asocjację z badaną cechą w każdym roku badań. Z kolei w przypadku 48 markerów stwierdzono asocjację z cechą w trzech spośród czterech niezależnych analiz.

W oparciu o wyniki badań prowadzonych w roku poprzednim stwierdzono, że amplifikacja dwóch fragmentów DNA przy udziale dwóch par starterów SRAP sprzężona jest z brakiem obecności genu *Dw7*. Stwierdzono silne sprzężenie markera z cechą, dlatego podjęto próbę konwersji obu markerów na markery SCAR. Różnicujące produkty SRAP poddano klonowaniu, a następnie sekwencjonowaniu. Wyniki sekwencjonowania poddano analizie bioinformatycznej przy użyciu oprogramowania MEGA 6.0. W kolejnym etapie odszukano sekwencje homologiczne do sekwencji uzyskanych fragmentów DNA w bazie danych GenBank NCBI (z wykorzystaniem narzędzia BLAST (Basic Local Alignment Search Tool)). Niestety żaden z fragmentów nie wykazał homologii z żadną z sekwencji zdeponowaną w bazie danych NCBI.

Żadna z kombinacji starterów zaprojektowanych do zsekwencjonowanego fragmentu SRAP 16\_17 nie inicjowała syntezy produktu, który różnicowałby formy niskie od wysokich. W przypadku fragmentu 3\_47 pożądaný produkt, tak jak oczekiwano obserwowano u wszystkich form wysokich oraz jednej spośród czterech testowanych form niskich. Można było na tym etapie analiz przypuszczać, że sprzężenie markera z cechą będzie niskie niemniej jednak spośród testowanych par starterów wybrano 2 i przeprowadzono reakcję na DNA 12 niskich i 12 wysokich roślin populacji 326 i 337. Z uwagi na brak powtarzalności wyników uzyskanych dla pary starterów 3\_47F1+R1 do dalszych analiz i weryfikacji polecana jest druga z wytypowanych par 3\_47F1+R2. Należy jednak mieć na uwadze, że w populacji 326 prawidłowo identyfikowała ona zaledwie 20 spośród 24 testowanych roślin.

Kolejnym celem tematu badawczego była konwersja na markery specyficzne 4 markerów silicoDArT oraz 1 markera DArTseq, które na podstawie analiz GWAS przeprowadzonych w roku poprzednim charakteryzowały się najsilniejszą asocjacją z badaną cechą, czyli wysokością roślin. Na podstawie zidentyfikowanych sekwencji zaprojektowano startery w programie Primer3 dostępnym na stronie NCBI z zastosowaniem specyficznych parametrów dla krótkich sekwencji. Następnie przeprowadzono reakcje STS wybierając początkowo jako matryce DNA pochodzące z czterech odmian/linii hodowlanych, które we wszystkich latach prowadzenia eksperymentu polowego charakteryzowały się najniższą bądź najwyższą wysokością roślin. Przetestowano 50 par starterów w różnych temperaturach i dla zaledwie kilku z nich uzyskano produkty różnicujące. Po

przeanalizowaniu powyższych wyników wybrano 10 par starterów. Najlepsze dopasowanie segregacji markera do fenotypu uzyskano dla par starterów Aso\_24\_F2 i R2b oraz Aso\_57\_F1 i R2 i są one polecane do selekcji opartej na analizach asocjacyjnych.

## Wnioski

1. Analiza asocjacyjna umożliwiła identyfikację 2 markerów silicoDArT oraz 4 markerów DArTseq, które asocjowały z masą tysiąca ziarniaków określoną na podstawie wyników uzyskanych w trzech latach badań (4 powtórzeniach).
2. W przypadku 48 markerów stwierdzono asocjację z masą tysiąca ziarniaków w trzech spośród czterech niezależnych analiz.
3. Do identyfikacji recesywnego allelu genu karłowatości *dw7* wytypowano kombinację starterów 3\_47F1+ 3\_47R2.
4. Najlepsze dopasowanie segregacji markera asocjowanego z wysokością roślin do fenotypu uzyskano dla par starterów Aso\_24\_F2 i Aso\_24\_R2b oraz Aso\_57\_F1 i Aso\_57\_R2.

### Mierniki dla tematu badawczego 4

Lp.	miernik	wartość miernika podana w opisie zadania	wartość miernika zrealizowana
1	Liczba asocjowanych cech	1	1
2	Liczba konwertowanych markerów SRAP dla genu <i>Dw7</i>	2	2
3	Liczba testowanych markerów zasocjowanych z wysokością	5	5
4	Liczba cech analizowanych w populacji E56	1	1