

SPRAWOZDANIE MERYTORYCZNE

z realizacji zadania na rzecz postępu biologicznego w produkcji roślinnej w 2017 roku

A. INFORMACJE OGÓLNE

Tytuł zadania Mapowanie sprzężeniowe i asocjacyjne owsa zwyczajnego
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)) 30
Planowany okres realizacji zadania 12 miesięcy

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
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
Sylwia Sowa	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 (tak/nie /częściowo ¹)
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.	Opracowanie mapy genetycznej bazującej na populacji mapującej RIL E56 wyprowadzonej w oparciu o krzyżowanie biparentalne <i>A. fatua</i> 216 × <i>A. sativa</i> 'Sam'.	TAK
4.	Analiza polimorfizmu zestawów linii bliskoizogenicznych.	TAK
5.	Analiza asocjacyjna wysokości linii i odmian <i>A. sativa</i> .	TAK
6.	Identyfikacja markerów genetycznych sprzężonych z obecnością genu <i>Dw7</i> w oparciu o analizę polimorfizmu SRAP i próba konwersji na marker SCAR produktu RAPD X3. Opracowanie markera STS dla genu <i>Dw7</i> .	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 ₁ oraz rekombinacyjnych linii wsobnych. (połączone tematy 1 i 2 opisu wieloletniego)	3-11
2.	Ukierunkowane profilowanie DNA z wykorzystaniem systemów sekwencyjnych. (połączone tematy 3 i 6 opisu wieloletniego)	1-12
3.	Konstrukcja mapy genetycznej. (temat 7 opisu wieloletniego)	4-12
4.	Analiza asocjacyjna 370 linii i odmian. Identyfikacja i testowanie potencjalnych markerów asocjowanych z cechami. (połączone tematy 8 i 9 opisu wieloletniego).	3-12

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

3. 1. Kontynuacja rozmnożeń populacji mapujących. Fenotypowanie mieszańców F₁ oraz rekombinacyjnych linii wsobnych.

Cel tematu badawczego 1

- * Wprowadzenie międzygatunkowych populacji mapujących.
- * Fenotypowanie 10 kombinacji mieszańcowych F₁ uzyskanych w roku poprzednim.
- * Fenotypowanie międzygatunkowej populacji mapującej RIL E52 *A. sterilis* × *A. sativa*.
- * Kontynuacja rozmnożeń w kierunku RIL populacji E52, E337 i E101.

Materiały i metody

W celu wprowadzenia międzygatunkowych populacji mapujących: *A. fatua* × *A. sterilis* oraz *A. sterilis* × *A. fatua* przeprowadzono krzyżowania:

A. sterilis (1 genotyp) × *A. fatua* (2 genotypy) – 2 kombinacje

A. fatua (1 genotyp) × *A. sterilis* (2 genotypy) – 2 kombinacje

Kastrowanie roślin rozpoczęto na początku fazy kwitnienia. W wieszce kastrowanych było kilkanaście szczytowych kłosek, fragmenty wiech zostały zaizolowane izolatorami z tomofanu do czasu zapylenia. Po 3-4 dniach od usunięcia pylników na dojrzałe znamiona został naniesiony pyłek z pylników zebranych wcześniej z roślin ojcowskich. Po dwóch dniach zapylenie powtórzono. Izolatory pozostawały na roślinach aż do zbioru, który przeprowadzono po osiągnięciu dojrzałości woskowej. Na podstawie liczby wykastrowanych i zapylnych kwiatków oraz liczby zawiązanych ziarniaków określono efektywność krzyżowania.

Ocenę fenotypową przeprowadzono dla 10 kombinacji mieszańcowych F₁ uzyskanych w roku poprzednim. Kombinacje te reprezentowały:

- 1) mieszańce z dwoma genami karłowatości *Dw4*, *Dw6* lub *Dw7* (3 kombinacje),
- 2) mieszańce międzygatunkowe *A. sativa* × *A. sterilis* (1 kombinacja)
- 3) mieszańce międzygatunkowe *A. fatua* × *A. sterilis* oraz *A. sterilis* × *A. fatua* (6 kombinacji).

Wysiewano po 2 ziarniaki z każdej kombinacji, ewentualnie 1 jeśli w roku poprzednim nie uzyskano wystarczającej ilości nasion. Wszystkie rośliny F₁ poddano ocenie fenotypowej. Fenotypowanie roślin F₁ polegało na ocenie podstawowych walorów rolniczych roślin w warunkach laboratoryjnych. Ocenione zostały: wysokość, liczba pędów produkcyjnych i niedogonów, długość wiechy, liczba kłosek, liczba i masa ziarniaków z wiechy oraz masa ziarniaków z rośliny. W przypadku mieszańców międzygatunkowych nie zostały ocenione: liczba i masa ziarniaków z wiechy oraz masa ziarniaków z rośliny.

W fazie krzewienia z każdej rośliny F₁ oraz każdej rośliny rodzicielskiej wykorzystanej w krzyżowaniach pobrano i zamrożono w temp. -70°C fragmenty liści w celu zabezpieczenia tkanki do izolacji DNA w kolejnych latach badań.

Fenotypowaniu poddano również międzygatunkową populację mapującą RIL E52 *A. sterilis* × *A. sativa*.

Z każdej ze 150 linii oraz form rodzicielskich w 2 rzędach długości 1m wysiano po 20 ziarniaków każdej linii. Fenotypowanie 10 roślin F₂ przeprowadzono w warunkach laboratoryjnych. Oceniono: wysokość, liczba pędów produkcyjnych i niedogonów, długość wiechy, liczba kłosek, podatność na osypywanie, obecność ości.

Zostały również rozmnożone kolejne pokolenia (F_5 , F_6 , F_7) mieszańców międzyodmianowych oraz międzygatunkowych w kierunku uzyskania RIL (populacje 52, 101, 337).

Nazwa populacji	Formuła krzyżowania	Liczba linii	Pokolenie
E52	<i>A. sterilis</i> 66 × Sam	150	(F_6 , F_7)
E101	STH 9787 × Bingo	160	(F_7)
E337	Bingo × North Carolina	200	(F_5 , F_6)

W rzędach długości 0,5 m wysiewano ok. 25 ziarniaków z każdej linii poszczególnych populacji. Tuż przed kwitnieniem na 3 wiechy linii reprezentujących populację E52 zakładano izolatory z tofianu. Po osiągnięciu pełnej dojrzałości izolatory zebrano, a najładniejsze wiechy z każdej linii wymłócono. Ziarniaki przeznaczono do rozmnożenia w roku kolejnym. W przypadku populacji E101 i E337 izolacji nie prowadzono. 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 międzygatunkowych populacji mapujących *A. fatua* × *A. sterilis* oraz *A. fatua* × *A. sterilis* przeprowadzono krzyżowania pomiędzy genotypami należącymi do poszczególnych gatunków. W krzyżowaniach międzygatunkowych genotypy *A. fatua* i *A. sterilis* wykorzystano zarówno jako formy ojcowskie, jak i mateczne. Do krzyżowań jako formy mateczne wybrano 10 genotypów *A. fatua* oraz 7 genotypów *A. sterilis*, które krzyżowano odpowiednio z 7 genotypami *A. sterilis* i 8 genotypami *A. fatua*. Ostatecznie zaplanowane kombinacje mieszańcowe uzyskano dla genotypu *A. sterilis* - 172 oraz *A. fatua* - 537 (Tab. 1). Wykorzystując *A. sterilis* jako formę mateczną wykastrowano 400 kwiatków w 35 wiechach, w tym 73 kwiatki w 7 wiechach genotypu 172. W kombinacji z *A. fatua* 216 zawiązało się 10 ziarniaków, a efektywność wyniosła 18,18%, zaś w kombinacji z *A. fatua* 526 uzyskano 1 ziarniak (5,51%). Efektywność krzyżowań wahała się w zależności od kombinacji krzyżówkowej od 0,00 do 18,18%. Wykastrowano 473 kwiatki w 44 wiechach *A. fatua*, w tym 51 kwiatków w 5 wiechach genotypu 537 uzyskując 55 mieszańcowych ziarniaków. W kombinacji *A. fatua* 537 z *A. sterilis* 66 otrzymano 18 ziarniaków, zaś z *A. sterilis* 172 – 6 ziarniaków, a efektywność krzyżowania wyniosła odpowiednio 58,06% i 30,00%.

Tab. 1. Efektywność krzyżowań *A. fatua* × *A. sterilis* i *A. sterilis* × *A. fatua*.

Forma mateczna	Forma ojcowska	Liczba wykastrowanych i zapylnych wiech	Liczba wykastrowanych kwiatków	Liczba zawiązanych ziarniaków	Efektywność krzyżowania
<i>A. sterilis</i> 172	<i>A. fatua</i> 216	5	55	10	18,18
<i>A. sterilis</i> 172	<i>A. fatua</i> 526	2	18	1	5,51
<i>A. sterilis</i>	<i>A. fatua</i>	28	327	8	-
Suma		35	400	19	-
Średnia			11,43	0,54	4,75
<i>A. fatua</i> 537	<i>A. sterilis</i> 66	3	31	18	58,06
<i>A. fatua</i> 537	<i>A. sterilis</i> 172	2	20	6	30,00
<i>A. fatua</i>	<i>A. sterilis</i>	39	422	31	-
Suma		44	473	55	-
Średnia		-	10,75	1,25	11,62

Przeprowadzono również fenotypowanie 10 kombinacji mieszańcowych F_1 uzyskanych w roku poprzednim. Reprezentowały one: 1) mieszańce z dwoma genami karłowatości *Dw4*, *Dw6* lub *Dw7* (3 kombinacje), 2) mieszańce międzygatunkowe *A. sativa* × *A. sterilis* (1 kombinacja), 3) mieszańce międzygatunkowe *A. fatua* × *A. sterilis* oraz *A. sterilis* × *A. fatua* (6 kombinacji).

Tab. 2. Wyniki fenotypowania mieszańców F₁.

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 z rośliny [g]
<i>mieszańce z dwoma genami karłowatości Dw4, Dw6 lub Dw7</i>											
1	STH 8827 (Dw6)	North Carolina (Dw7)	952/1	48	3	1	15	58	96	3,84	6,61
2	STH 9210 (Dw6)	Trelle Dwarf (Dw7)	955/1	58	8	2	15	85	150	5,49	8,65
2	STH 9210 (Dw6)	Trelle Dwarf (Dw7)	955/2	56	5	2	14	86	151	4,75	7,58
3	K7 NIL (Dw6)	Trelle Dwarf (Dw7)	957/1	59	4	3	15	68	100	3,26	8,09
<i>mieszańce międzygatunkowe A. sativa × A. sterilis</i>											
4	Kasztan	A. sterilis 204	864/1	147	6	6	24	21	29	1,17	5,48
<i>mieszańce międzygatunkowe A. fatua × A. sterilis oraz A. sterilis × A. fatua</i>											
5	A. fatua 518	A. sterilis 172	939/1	128	3	1	26	28	58	1,87	-
5	A. fatua 518	A. sterilis 172	939/2	137	2	1	27	30	85	2,89	1,85
5	A. fatua 518	A. sterilis 172	939/3	131	7	4	26	28	80	2,92	4,96
6	A. fatua 523	A. sterilis 66	942/1	120	4	2	23	27	78	2,55	2,99
6	A. fatua 523	A. sterilis 66	942/2	115	4	3	26	37	98	3,27	4,87
7	A. fatua 525	A. sterilis 66	945/1	147	7	6	28	38	92	3,62	10,72
7	A. fatua 525	A. sterilis 66	945/2	140	4	3	28	38	95	3,14	6,87
8	A. sterilis As3	A. fatua 525	947	128	4	5	24	22	59	1,95	3,38
9	A. sterilis As6	A. fatua 520	948/1	131	5	1	25	31	62	2,86	1,08
9	A. sterilis As6	A. fatua 520	948/2	131	4	3	24	26	79	2,47	4,45
10	A. sterilis 172	A. fatua 525	937/1	129	4	2	25	26	69	2,43	5,18
10	A. sterilis 172	A. fatua 525	937/2	134	3	3	24	27	79	2,95	5,65

Mieszańce F₁, w których formą rodzicielską była odmiana Trelle Dwarf były wyższe od mieszańców z odmianą North Carolina o 8 do 11 cm, były też silniej rozkrzewione (Tab. 2). Nie różniły się pod względem długości wiechy, ale liczba kłosków była większa w kombinacjach z Trelle Dwarf, aniżeli z North Carolina, przy czym dla mieszańców z tą formą u różnych roślin wartość ta wahała się od 68 do do 86. Podobne różnice obserwowano pod względem liczby ziarniaków w wieszce, a u poszczególnych roślin liczebność ziarniaków wyniosła od 96 do 151. Masa ziarniaków z wiechy nie była skorelowana z komponentem ojcowskim kombinacji mieszańcowej. Masa ziarniaków z wiechy głównej w kombinacji STH 8827 × North Carolina była wyższa niż masa ziarniaków z wiechy kombinacji K7 NIL × Trelle Dwarf, a jednocześnie niższa aniżeli w kombinacji STH 9210 × Trelle Dwarf.

Analizowano tylko jedną roślinę F₁ A. sativa × A. sterilis, a ocenione cechy miały wartości porównywalne do mieszańców A. sterilis × A. fatua, szczególnie pod względem wysokości, długości wiechy i liczby kłosków. Charakterystyczną cechą tej kombinacji była bardzo mała ilość ziarniaków z wiechy, co wynikało z niskiej płodności kłoska.

Mieszańce F₁ A. sterilis × A. fatua oraz A. fatua × A. sterilis charakteryzowały się zbliżoną wysokością, z wyjątkiem kombinacji, w której jednym z komponentów krzyżowania był A. fatua 523, w przypadku której wysokość roślin wyniosła odpowiednio 115 i 120 cm, podczas gdy pozostałe mieszańce międzygatunkowe mierzyły średnio 133,6 cm (128 – 147 cm). Liczba pędów produkcyjnych i niedogonów była zróżnicowana i nie zależała od kierunku krzyżowania (Tab. 2). Długość wiechy u wszystkich mieszańców była porównywalna i zawierała się w przedziale od 23 do 28cm. Liczba kłosków u mieszańców A. fatua × A. sterilis była wyższa (27 - 38), aniżeli w

kombinacjach *A. sterilis* × *A. fatua* (22 - 31). Masa ziarniaków z wiechy i masa pozostałych ziarniaków z rośliny różniły się w różnych kombinacjach mieszańcowych, ale różnice te nie były skorelowane z formułą krzyżowania.

Fenotypowaniu poddano również rekombinacyjne linie wsobne międzygatunkowej populacji mapującej F₈ E52 (*A. sativa* cv. Sam × *A. sterilis* 66) oraz formy rodzicielskie. Analizowano wysokość, liczbę pędów produkcyjnych i niedogonów, długość wiechy, liczbę kłosek, podatność na osypywanie i obecność ości. Dokonywano oceny 10 roślin z każdej linii RIL. W sumie ocenie poddano 150 linii, czyli 1500 roślin pokolenia F₈ oraz po 30 roślin form rodzicielskich.

Linie RIL F₈ E52 charakteryzowały się wysoką zmiennością pod względem niektórych cech, ponadto u mieszańców obserwować można było przekroczenie wartości obserwowanych dla cech rodzicielskich i tego typu sytuację odnotowano w przypadku wysokości oraz długości wiechy. W porównaniu z formami rodzicielskimi wartość tej cechy była bardziej zbliżona do *A. sterilis*, czyli formy matecznej, aniżeli *A. sativa*, czyli formy ojcowskiej

Celem zadania było również rozmnożenie kolejnych pokoleń (F₅, F₆, F₇) mieszańców międzyodmianowych oraz międzygatunkowych w kierunku uzyskania RIL (populacje 52, 101, 337).

Tab. 3. Rozmnożenie kolejnych pokoleń mieszańców.

Populacja	Rodowód	Liczebność roślin w pokoleniu			Suma roślin w populacji
		F ₅	F ₆	F ₇	
E52	<i>A. sterilis</i> 66 × Sam	-	50	100	150
E101	STH 9787 × Bingo	-	-	160	160
E337	Bingo × North Carolina	50	150		200
Suma		50	200	260	510

Rozmnożono odpowiednio 50, 200 oraz 260 linii pokoleń F₅, F₆ i F₇ (Tab. 3). W sumie zebrano izolowane ziarniaki z 510 poletek. Największą liczebnością charakteryzowały się populacje E337 oraz E101, dla których zebrano ziarniaki z odpowiednio 160 i 200 poletek. Najmniejszą liczebnością charakteryzowała się populacja E52 posiadająca w rodowodzie dziki gatunek *A. sterilis*.

3. 2. Ukierunkowane profilowanie DNA z wykorzystaniem systemów sekwencyjnych.

Cel tematu badawczego 2

* Analiza polimorfizmu DArTseq 4 zestawów linii bliskoizogenicznych wyodrębnionych z populacji RIL E52 (*A. sterilis* × *A. sativa*) i E56 (*A. fatua* × *A. sativa*) oraz z populacji E101 (STH 9787 (*Dw6*) × Bingo) i E310 (Celer × STH 9210 (*Dw6*)).

* Analiza sekwencyjna z wykorzystaniem komercyjnych platform sekwencyjnych ukierunkowana na rejon genomu związany z redukcją wysokości warunkowaną obecnością genu *Dw7*.

Materiały i metody

Genotypowaniu metodą DArTseq poddano 4 zestawy linii bliskoizogenicznych wyodrębnionych z populacji RIL E52 (*A. sterilis* × *A. sativa*) i E56 (*A. fatua* × *A. sativa*) oraz z populacji E101 (STH 9787 (*Dw6*) × Bingo) i E310 (Celer × STH 9210 (*Dw6*)).

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 doprowadzono do stężenia 100 ng/μl. Przygotowane w ten sposób roztwory DNA przechowywano w temperaturze -25°C. 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 było możliwe wykonanie

takich badań w Polsce, ani w żadnym innym miejscu na świecie. Wyniki uzyskano w postaci macierzy binarnych.

Analizę sekwencyjną z wykorzystaniem komercyjnych platform sekwencyjnych ukierunkowaną na rejonu genomu związane z redukcją wysokości warunkowaną obecnością genu *Dw7* przeprowadzono dla linii bliskoizogenicznych reprezentujących populację E337 (Bingo x North Carolina). Uzyskane dane w roku kolejnym zostaną poddane analizie bioinformatycznej.

Wyniki

Genotypowaniu metodą DArTseq poddano 4 zestawy linii bliskoizogenicznych wyodrębnionych z populacji RIL E52 (*A. sterilis* × *A. sativa*) i E56 (*A. fatua* × *A. sativa*) oraz z populacji E101 (STH 9787 (Dw6) × Bingo) i E310 (Celer × STH 9210 (Dw6)) oraz linie kontrolne, czyli formy rodzicielskie i po dwa ekotypy *A. fatua* oraz *A. sterilis* (Tab. 4). W efekcie analiz DArTseq uzyskano 37720 polimorficznych markerów kodominujących.

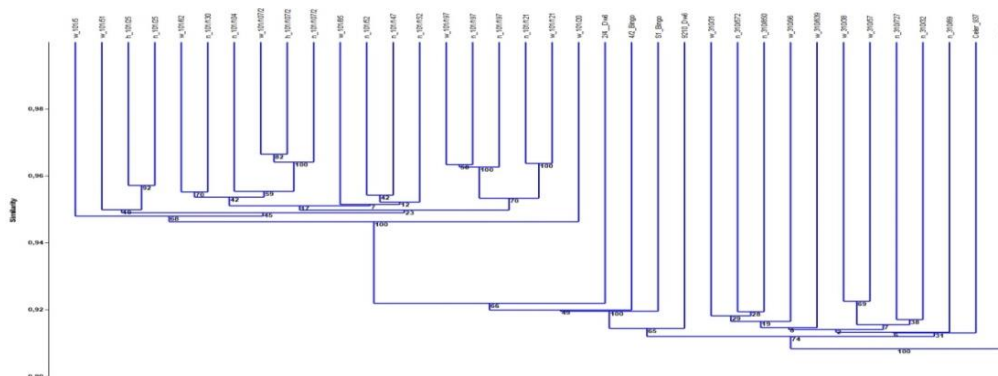
Tab. 4. Formy genotypowane metodą DArTseq.

Lp.	Gatunek	Genotyp	Forma	Populacja
1	<i>A. sterilis</i> x <i>A. sativa</i>	16a	NIL	E52
2	<i>A. sterilis</i> x <i>A. sativa</i>	16b	NIL	E52
3	<i>A. sterilis</i> x <i>A. sativa</i>	44a	NIL	E52
4	<i>A. sterilis</i> x <i>A. sativa</i>	44b	NIL	E52
5	<i>A. sterilis</i> x <i>A. sativa</i>	60a	NIL	E52
6	<i>A. sterilis</i> x <i>A. sativa</i>	60b	NIL	E52
7	<i>A. sterilis</i> x <i>A. sativa</i>	108a	NIL	E52
8	<i>A. sterilis</i> x <i>A. sativa</i>	108b	NIL	E52
9	<i>A. sterilis</i> x <i>A. sativa</i>	113a	NIL	E52
10	<i>A. sterilis</i> x <i>A. sativa</i>	113b	NIL	E52
11	<i>A. sterilis</i> x <i>A. sativa</i>	117a	NIL	E52
12	<i>A. sterilis</i> x <i>A. sativa</i>	117b	NIL	E52
13	<i>A. sterilis</i> x <i>A. sativa</i>	141a	NIL	E52
14	<i>A. sterilis</i> x <i>A. sativa</i>	141b	NIL	E52
15	<i>A. sterilis</i> x <i>A. sativa</i>	149a	NIL	E52
16	<i>A. sterilis</i> x <i>A. sativa</i>	149b	NIL	E52
17	<i>A. sterilis</i> x <i>A. sativa</i>	166a	NIL	E52
18	<i>A. sterilis</i> x <i>A. sativa</i>	166b	NIL	E52
19	<i>A. sterilis</i> x <i>A. sativa</i>	188a	NIL	E52
20	<i>A. sterilis</i> x <i>A. sativa</i>	188b	NIL	E52
21	<i>A. sterilis</i> x <i>A. sativa</i>	52/1/	NIL	E52
22	<i>A. sterilis</i> x <i>A. sativa</i>	52/1/	NIL	E52
23	<i>A. sterilis</i> x <i>A. sativa</i>	52/13	NIL	E52
24	<i>A. sterilis</i> x <i>A. sativa</i>	52/13	NIL	E52
25	<i>A. sterilis</i> x <i>A. sativa</i>	52/166	NIL	E52
26	<i>A. sterilis</i> x <i>A. sativa</i>	52/166	NIL	E52
27	<i>A. sterilis</i> x <i>A. sativa</i>	52/188	NIL	E52
28	<i>A. sterilis</i> x <i>A. sativa</i>	52/188	NIL	E52
29	P1_ <i>A. sterilis</i>	66 a	forma mateczna pop E52	
30	P2_ <i>Avena sativa</i> L.	Sam 1	forma ojcowska populacji E52 i E56	
31	P1_ <i>A. fatua</i>	216 1	forma mateczna populacji E56	
32	<i>A. fatua</i> x <i>A. sativa</i>	56/97/1 os	NIL	E56
33	<i>A. fatua</i> x <i>A. sativa</i>	56/97/2 nos	NIL	E56
34	<i>A. fatua</i> x <i>A. sativa</i>	56/146/1 os	NIL	E56
35	<i>A. fatua</i> x <i>A. sativa</i>	56/146/2 nos	NIL	E56
36	<i>A. fatua</i> x <i>A. sativa</i>	56/162/1os	NIL	E56
37	<i>A. fatua</i> x <i>A. sativa</i>	56/162/1/2 ns	NIL	E56
38	<i>A. fatua</i> x <i>A. sativa</i>	101/1	NIL	E56
39	<i>A. fatua</i> x <i>A. sativa</i>	101/2	NIL	E56
40	<i>A. fatua</i> x <i>A. sativa</i>	146/1	NIL	E56
41	<i>A. fatua</i> x <i>A. sativa</i>	146/2	NIL	E56
42	<i>A. fatua</i> x <i>A. sativa</i>	162/1/1	NIL	E56
43	<i>A. fatua</i> x <i>A. sativa</i>	162/1/2	NIL	E56

Lp.	Gatunek	Genotyp	Forma	Populacja
44	A.fatua x A. sativa	162/2/1	NIL	E56
45	A.fatua x A. sativa	162/2/2	NIL	E56
46	A.fatua x A. sativa	162/2/3	NIL	E56
47	A.fatua x A. sativa	162/3	NIL	E56
48	A.fatua x A. sativa	162/5	NIL	E56
49	A.fatua x A. sativa	97/1	NIL	E56
50	A.fatua x A. sativa	97/2	NIL	E56
51	P1_A.fatua	216 12	forma mateczna populacji E56	
52	P1_A.sterilis	66/2a	forma mateczna populacji E52	
53	P2_A.sativa	Sam1	forma ojcowska populacji E52 i E56	
54	A.sativa x A. sativa 101	101/5	NIL	E101
55	A.sativa x A. sativa 101	101/20	NIL	E101
56	A.sativa x A. sativa 101	101/51	NIL	E101
57	A.sativa x A. sativa 101	101/62	NIL	E101
58	A.sativa x A. sativa 101	101/85	NIL	E101
59	A.sativa x A. sativa 101	101/52	NIL	E101
60	A.sativa x A. sativa 101	101/104	NIL	E101
61	A.sativa x A. sativa 101	101/130	NIL	E101
62	A.sativa x A. sativa 101	101/147	NIL	E101
63	A.sativa x A. sativa 101	101/152	NIL	E101
64	A.sativa x A. sativa 101	101/146/1	NIL	E101
65	A.sativa x A. sativa 101	101/146/2	NIL	E101
66	A.sativa x A. sativa 101	101/146/6	NIL	E101
67	A.sativa x A. sativa 101	101/197/5	NIL	E101
68	A.sativa x A. sativa 101	101/197/2	NIL	E101
69	A.sativa x A. sativa 101	101/197/4	NIL	E101
70	A.sativa x A. sativa 101	101/197/6	NIL	E101
71	A.sativa x A. sativa 101	101/25/3	NIL	E101
72	A.sativa x A. sativa 101	101/25/1	NIL	E101
73	A.sativa x A. sativa 101	101/121/4	NIL	E101
74	A.sativa x A. sativa 101	101/121/6	NIL	E101
75	A.sativa x A. sativa 101	101/15/3/1	NIL	E101
76	A.sativa x A. sativa 101	101/15/3/2	NIL	E101
77	A.sativa x A. sativa 101	101/15/3/3	NIL	E101
78	A.sativa x A. sativa 101	101/15/3/4	NIL	E101
79	A.sativa x A. sativa 101	101/107/2/1	NIL	E101
80	A.sativa x A. sativa 101	101/107/2/3	NIL	E101
81	A.sativa x A. sativa 101	101/107/2/4	NIL	E101
82	A.sativa x A. sativa 310	310/31	NIL	E310
83	A.sativa x A. sativa 310	310/38	NIL	E310
84	A.sativa x A. sativa 310	310/57	NIL	E310
85	A.sativa x A. sativa 310	310/96	NIL	E310
86	A.sativa x A. sativa 310	310/639	NIL	E310
87	A.sativa x A. sativa 310	310/89	NIL	E310
88	A.sativa x A. sativa 310	310/572	NIL	E310
89	A.sativa x A. sativa 310	310/581	NIL	E310
90	A.sativa x A. sativa 310	310/727	NIL	E310
91	A.sativa x A. sativa 310	310/850	NIL	E310
92	A.sativa x A. sativa 310	310/32	NIL	E310
93	A.sativa x A. sativa 310	310/61	NIL	E310
94	A.sativa x A. sativa 310	310/106	NIL	E310
95	A.sativa x A. sativa 310	310/734	NIL	E310
96	A.sativa x A. sativa 310	310/780	NIL	E310
97	A.sativa x A. sativa 310	310/410	NIL	E310
98	A.sativa x A. sativa 310	310/475	NIL	E310
99	A.sativa x A. sativa 310	310/547	NIL	E310
100	A.sativa x A. sativa 310	310/597	NIL	E310
101	A.sativa x A. sativa 310	310/754	NIL	E310
102	Avena sativa L.	937	forma mateczna populacji E310	
103	Avena sativa L.	9210	forma ojcowska populacji E310	
104	Avena sativa L.	4/2	forma mateczna populacji E3101	

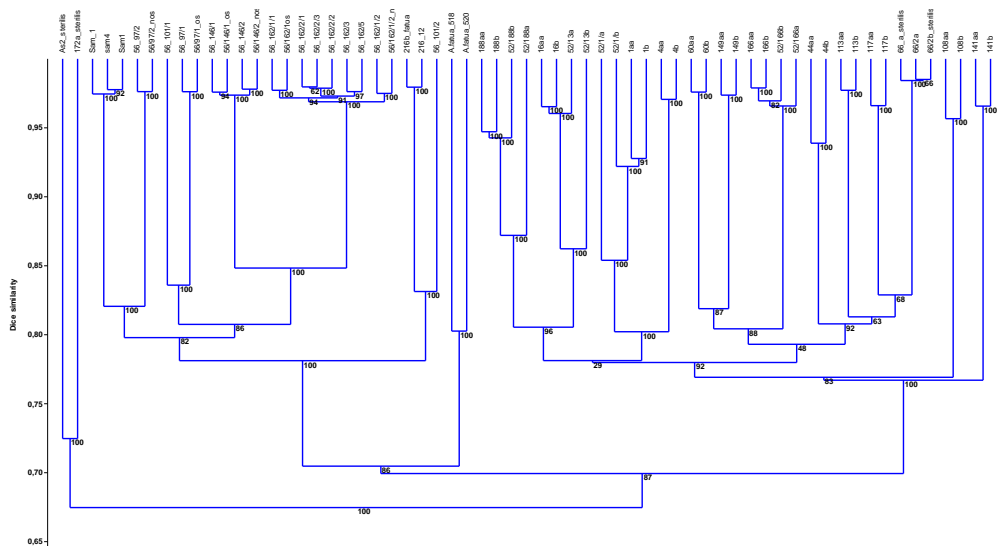
Lp.	Gatunek	Genotyp	Forma	Populacja
105	<i>Avena sativa</i> L.	2/4	forma ojcowska populacji E101	
106	<i>Avena sativa</i> L.	S1	paternal form of population 552	
107	<i>Avena sterilis</i> L.	As2	kontrola	
108	<i>Avena sterilis</i> L.	172a	kontrola	
109	<i>Avena fatua</i> L.	518	kontrola	
110	<i>Avena fatua</i> L.	520	kontrola	

Wstępna analiza uzyskanych matryc binarnych wykazała, że pomiędzy mieszancami międzyodmianowymi podobieństwo genetyczne jest bardzo wysokie, co można zaobserwować na przedstawionym dendrogramie (Rys. 1). Jednocześnie podobieństwo genetyczne pomiędzy liniami reprezentującymi linie NIL wyprowadzone z populacji E101 charakteryzowały się większym podobieństwem, aniżeli linie NIL wyprowadzone z populacji E310.



Rys. 1. Dendrogram UPGMA w oparciu o polimorfizm markerów DArTseq i podobieństwo genetyczne Dice'a dla linii bliskoizogenicznych wywodzących się z populacji E101 i E310.

Przeprowadzona równolegle analiza matryc binarnych uzyskanych dla mieszańców międzygatunkowych *A. sterilis* x *A. sativa* oraz *A. fatua* x *A. sativa* wykazała, że poziom podobieństwa genetycznego pomiędzy liniami w obrębie obu populacji jest zbliżony, niemniej jednak poszczególne pary linii NIL są do siebie bardziej podobne w populacji E56, gdzie formą ojcowską był dziki gatunek *A. fatua*. Poziom podobieństwa genetycznego pomiędzy mieszancami międzygatunkowymi jest zdecydowanie niższy, aniżeli pomiędzy liniami bliskoizogenicznymi wywodzącymi się z populacji międzyodmianowych (Rys. 2).



Rys. 2. Dendrogram UPGMA w oparciu o polimorfizm markerów DArTseq i podobieństwo genetyczne Dice'a dla linii bliskoizogenicznych wywodzących się z populacji międzygatunkowych E56 i E52.

W kolejnym etapie prowadzonych analiz zostaną zidentyfikowane sekwencje różnicujące poszczególne grupy linii bliskoizogenicznych, co pozwoli na identyfikację silnie sprzężonych markerów z genami odpowiedzialnymi za redukcję wysokości w mutantach z genem *Dw6* oraz genami odpowiedzialnymi za osypywanie ziarna.

Tab. 4. Linie genotypowane metodą Dovetail.

Oznaczenie linii NIL	Typ wiechy	Wysokość
337/1/14/2	1	126
337/1/14/9	1	65
337/70/11/3	1-3	110
337/70/11/11	7-9	70

W przypadku populacji 337, w której różnice wysokości pomiędzy poszczególnymi liniami wynikają z segregacji genu *Dw7* zastosowano inne podejście. Wybrane linii bliskoizogeniczne (Tab. 4) poddano szczegółowemu genotypowaniu przy zastosowaniu sekwencjonowania bibliotek genomowych. Uzyskane dane w roku kolejnym zostaną poddane analizie bioinformatycznej z zastosowaniem narzędzi udostępnionych przez IBERS.

3. 3. Konstrukcja mapy genetycznej.

Cel tematu badawczego 3

- * Celem tematu jest konstrukcja mapy genetycznej w oparciu o populację mapującą E56 (*A. fatua* × *A. sativa* ‘Sam’)

Materiały i metody

Mapowanie genetyczne wykonano w programie JoinMap 5.0 w oparciu o markery DArTseq uzyskane w ramach tematu 4.3 w roku 2016.

Wyniki

Mapowanie genetyczne przeprowadzone dla populacji F_7 E56 umożliwiło identyfikację dwudziestu pięciu, zamiast oczekiwanych 21 grup sprzężeń odpowiadających poszczególnym chromosomom owsa. Na mapie zlokalizowano ok. 5000 markerów. Najdłuższy chromosom (Mrg02) obejmował 354,4 cM, natomiast najkrótszy (Mrg17) 20,5 cM. Średnia długość chromosomu wyniosła 215,6 cM.

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

Cel tematu badawczego 4

- * Analiza asocjacyjna – wysokość roślin.
- * Próba konwersji markera RAPD X3 dla genu *Dw7* w marker typu SCAR.
- * Poszukiwanie w populacji Bingo × North Carolina markera dla genu *Dw7* metodą SRAP
- * Poszukiwanie silnie sprzężonych markerów STS w oparciu o sekwencje DArTseq sprzężone z obecnością genu *Dw7*

Materiały i metody

Analizę asocjacyjną dla wysokości roślin wykonano z zastosowaniem metod GLM (general linear model - ogólny model liniowy) oraz MLM (mixed linear model – wielokrotny model liniowy) przy wykorzystaniu oprogramowania TASSEL v.4. Modele te umożliwiły typowanie puli markerów-kandydatów, które poddawane były weryfikacji z wykorzystaniem np. konsensusowych map genetycznych gatunku. Test wykonano dla 1000 permutacji umożliwiając określenie wartości p-value, która jest prawdopodobieństwem uzyskania większej wartości F-value przy założeniu hipotezy

zerowej, że dany polimorfizm jest niezależny od fenotypu. Do wyliczenia asocjacji uwzględniono strukturę populacji, pokrewieństwo oraz cechy fenotypowe.

Podjęta została próba konwersji markera RAPD X3 dla genu Dw7 w marker typu SCAR. Różnicujące produkty RAPD rozdzielano w 1,5% żelu agarozowym. Izolację produktów PCR z żelu agarozowego przeprowadzono z wykorzystaniem zestawu do izolacji Gel Extraction Kit (Sigma). Wyizolowane DNA poddano klonowaniu z wykorzystaniem zestawu TOPO TA Cloning Kit for Sequencing lub równoważnego (Life Technologies). Wyniki sekwencjonowania poddano analizie bioinformatycznej przy użyciu oprogramowania MEGA 6.0..

Poszukiwanie w populacji Bingo × North Carolina markera dla genu Dw7 metodą SRAP przeprowadzono dla wytypowanych homozygotycznych pod względem genu Dw7 roślin F₂ populacji 'Bingo' x North Carolina. Próby zbiorcze roślin o przeciwstawnych fenotypach i genotypach przygotowano zgodnie z metodą BSA (Bulk Segregant Analysis) (Michelmore i in. 1991). W tym celu DNA homozygotycznych roślin F₂ połączono ze sobą w jednakowych objętościach. Próbkę zbiorczą utworzyło DNA 10 osobników F₂ o określonym genotypie.

Amplifikację losowych fragmentów DNA przeprowadzono przy zastosowaniu 500 kombinacji starterów SRAP dla 2 matryc DNA. Reakcję PCR prowadzono w 10 µl mieszaniny reakcyjnej zawierającej: wodę dejonizowaną, bufor, MgCl₂ (2mM), dNTP (200mM), starter F (10pMol), starter R (10pMol), polimerazę Taq (1U) i DNA (40ng). Amplifikację przeprowadzono na termocyklerze T Professional Basic (Biometra). Zastosowano profil termiczny: wstępna denaturacja - 95°C - 3 min, następnie 5 x (denaturacja - 94°C - 45 s; annealing - 35°C - 45 s; wydłużanie - 72°C - 60 s), 30 x (denaturacja - 94°C - 45 s; annealing - 50°C - 45 s; wydłużanie - 72°C - 60 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 Dw7 przeprowadzono reakcje SRAP dla wytypowanych par starterów z DNA pojedynczych homozygotycznych roślin F₂ zgodnie z metodyką podaną powyżej.

Wyniki

Do analizy w pakiecie GAPIT R użyto markerów molekularnych DArTseq i silicoDArT uzyskanych dla 370 odmian i linii owsa. Wybrano model oparty na kryterium informacji Bayesian (BIC) w celu weryfikacji strukturyzacji danych i określenia optymalnego poziomu struktury w celu zastosowania odpowiedniego modelu GWAS. Dodatkowo zaimplementowano algorytmy klastrowania ("Kinship.cluster") i statystyki podsumowania pokrewieństwa ("kinship.group") przy użyciu domyślnego kinship.cluster = "average" i kinship.group = "Mean". Określone numery grup zakresów (wymiary macierzy pokrewieństwa) były następujące: "group.from", "group.to" i "group.by" równe 100, 1000000 i 10 zostały użyte zgodnie z sugestią zawartą w podręczniku GAPIT. Oceniono heterozygotyczność markerów DArTseq i silicoDArT uzyskanych dla 370 obiektów. Określono udział alleli rzadkich oraz wytypowano model w odniesieniu do struktury najbardziej pasujący do uzyskanych danych. Aby przygotować dane markerowe do dalszych analiz asocjacyjnych uwzględniono strukturę populacji oraz pokrewieństwo. Analiza składowych głównych umożliwiła stwierdzenie braku strukturyzacji danych. Oznacza to, że na podstawie uzyskanych profili markerów silicoDArT i DArTseq analizowane genotypy nie tworzą grup odmiennych od reszty badanej populacji. Analiza obecności rzadkich wykazała niewielki udział tego typu alleli w analizowanej populacji. Z reguły tego typu markery są mało informatywne i nie wpływają istotnie na poprawę jakości uzyskanych wyników.

W przypadku markerów silicoDArT silną asocjacją z badaną cechą co najmniej w dwóch latach badaniach lub w dwóch powtórzeniach wykazało się 13 spośród 60 tys., z których cztery asocjowały z cechą w każdym roku badań, a kolejne cztery asocjowały w czterech z pięciu przeprowadzonych analiz. Spośród testowanych 60 tys. markerów DArTseq 11 wykazało asocjację z badaną cechą. Jeden z markerów wykazywał asocjację w każdej z pięciu przeprowadzonych analiz, zaś sześć innych wykazało asocjację w czterech analizach.

W oparciu o wyniki badań prowadzonych w roku poprzednim stwierdzono, że amplifikacja fragmentu DNA o wielkości 480 pz przy udziale startera RAPD X3 sprzężona jest z obecnością genu Dw7. Stwierdzono silne sprzężenie markera z cechą, dlatego podjęto próbkę konwersji markera RAPD X3 480 na marker SCAR.

Wyniki sekwencjonowania poddano analizie bioinformatycznej przy użyciu oprogramowania MEGA 6.0. Uzyskano sekwencje identyczne dla wszystkich klonowanych fragmentów. Kolejnym etapem było odszukanie sekwencji homologicznych do uzyskanej sekwencji fragmentu X3 RAPD w bazie danych GenBank NCBI (z wykorzystaniem narzędzia BLAST (Basic Local Alignment Search Tool)). Niestety niezależnie od zastosowanych parametrów przyporządkowywania sekwencji nie udało się znaleźć sekwencji podobnych. Do uzyskanych sekwencji zaprojektowano startery z wykorzystaniem oprogramowania Primer3.

Wykorzystując jako matrycę DNA formy karłowej zawierającej Dw7 (np. North Carolina) oraz formy wysokiej (np. odmiana 'Bingo') przeprowadzono reakcje PCR w odpowiednio zoptymalizowanych warunkach. Rozdział elektroforetyczny wykazał, że żadna z zaprojektowanych par starterów nie umożliwia identyfikacji genu *Dw7*.

W celu identyfikacji potencjalnych markerów dla genu karłowatości Dw7 obecnego w linii NC-2469-3 przeprowadzono analizę SRAP na wytypowanych homozygotycznych pod względem tego genu roślinach F₂ populacji E337. Reakcję przeprowadzono na próbach zbiorczych niskich i wysokich roślin populacji F₂, 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 F₃. Próbę zbiorczą utworzyło DNA 10 osobników F₂ o określonym genotypie.

Spośród 500 testowanych par starterów na podstawie zdjęć rozdziałów elektroforetycznych (Fot.2) wyselekcjonowano 11 par, z udziałem których reakcję powtórzono na losowo wybranym zestawie DNA 4 homozygot niskich i 4 homozygot wysokich pokolenia F₂ populacji E337. Po zweryfikowaniu powtarzalności pojawiających się wzorów prążkowych wybrano 3 pary starterów dających powtarzalny produkt

Wnioski

1. Wykorzystana do analiz metoda SRAP okazała się skuteczna w poszukiwaniu potencjalnego markera molekularnego dla allele recesywnego genu *Dw7*.
2. Zidentyfikowane markery X3⁴⁸⁰ i V2¹³⁵⁰ sprzężone z karłowatością warunkowaną genem *Dw7* poddano klonowaniu i konwersji do warunków specyficznego PCR, ale nie uzyskano produktów specyficznych, których segregacja byłaby zgodna z fenotypem roślin.
3. Zidentyfikowany markery w odległości 2,48cM i 5,33cM od genu *dw7*.
4. Nie powiodła się próba konwersji markerów X3⁴⁸⁰ oraz V2¹³⁵⁰ do warunków specyficznego PCR.