

BIULETYN
INSTYTUTU HODOWLI
I AKLIMATYZACJI ROŚLIN
Nr 285/2019



NAUKA DLA HODOWLI I NASIENICTWA ROŚLIN
UPRAWNYCH

INSTYTUT HODOWLI I AKLIMATYZACJI ROŚLIN
PAŃSTWOWY INSTYTUT BADAWCZY
RADZIKÓW, 05-870 BŁONIE

3

KONFERENCJA NAUKOWA

XIV OGÓLNOPOLSKA KONFERENCJA NAUKOWA

NAUKA DLA HODOWLI I NASIENICTWA ROŚLIN UPRAWNYCH

ZAKOPANE, 5.02 — 8.02.2019 r.

POD HONOROWYM PATRONATEM

MINISTRA ROLNICTWA I ROZWOJU WSI



MARSZAŁKA WOJEWÓDZTWA MAŁOPOLSKIEGO


MAŁOPOLSKA

ORGANIZATOR

INSTYTUT HODOWLI I AKLIMATYZACJI ROŚLIN
PAŃSTWOWY INSTYTUT BADAWCZY



ALINA LIERSCH¹
JAN BOCIANOWSKI²
WIESŁAWA POPLAWSKA¹
KRZYSZTOF MICHAŁSKI¹
KRYSTYNA KRÓTKA¹
KATARZYNA MIKOŁAJCZYK¹
JOANNA NOWAKOWSKA¹
MARCIN MATUSZCZAK¹
JOANNA WOLKO¹
IWONA BARTKOWIAK-BRODA¹

¹ Instytut Hodowli i Aklimatyzacji Roślin — Państwowy Instytut Badawczy, Radzików, Oddział w Poznaniu

² Uniwersytet Przyrodniczy w Poznaniu, Katedra Metod Matematycznych i Statystycznych

e-mail: alal@nico.ihar.poznan.pl

Analiza asocjacji markerów mikrosatelitarnych i AFLP z elementami struktury plonu i plonem kolekcji genotypów rzepaku ozimego (*Brassica napus* L.)*

Markery molekularne stosowane w programach hodowli roślin (marker-assisted selection, MAS) stanowią dogodne narzędzie zwiększające efektywność procesu selekcyjnego, jak również podnoszące skuteczność selekcji fenotypowej, zwłaszcza dla cech dziedziczonych poligenicznie lub o niskim poziomie odziedziczalności.

Celem pracy było określenie asocjacji pomiędzy cechami fenotypowymi związanymi z plonem a genotypem linii i odmian rzepaku ozimego z kolekcji IHAR — PIB, Oddział w Poznaniu. Badana kolekcja obejmowała: polskie i zagraniczne odmiany rzepaku ozimego podwójnie ulepszanego; mieszańce F₁ CMS *ogura* i ich komponenty rodzicielskie — linie męsko-sterylne i linie restorera (*Rfo*); linie o zmienionych proporcjach kwasów tłuszczowych C:18, jedno- i wielonienasyconych, uzyskane na drodze mutagenyzy chemicznej i ich rekombinanty; linia o jasnej barwie okrywy nasiennej i obniżonej zawartości włókna oraz linia rzepaku otrzymana na drodze resyntezy *de novo* z gatunków podstawowych *B. rapa* i *B. oleracea*.

* Badania zostały wykonane w ramach zadania nr 48 w programie Postęp Biologiczny w Produkcji Roślinnej 2014–2020 finansowanym przez MRiRW.

Doświadczenia polowe kolekcji 25 genotypów przeprowadzono w układzie bloków kompletnych losowanych, w czterech powtórzeniach, dwóch miejscowościach i trzech kolejnych sezonach wegetacyjnych. Plon nasion oceniono na podstawie zbioru z całych poletek, a po zbiorze określono masę 1000 nasion (średnia z czterech prób dla każdego badanego obiektu). Pomiary biometryczne struktury plonu wykonano na 100 łuszczykach z każdego genotypu, pobranych 2 tygodnie przed zbiorem ze środkowej części pędu głównego pięciu roślin.

Genotypy charakteryzowano z zastosowaniem 84 *loci* mikrosatelitarnych oraz 10 kombinacji starterów AFLP, jak również przy użyciu allelo-specyficznych markerów CAPS i SNP oraz markerów SCAR dla męsko-sterylnej cytoplazmy typu ogura i genu restorera Rfo. Łącznie analizowano 779 polimorficznych produktów amplifikacji DNA. Analizy asocjacyjne wykonano niezależnie dla wyników doświadczeń w sześciu środowiskach z zastosowaniem pakietu GenStat 18. Markery DNA określające takie cechy fenotypowe jak plon nasion i strukturę plonu na poziomie istotności $p=0,05$ scharakteryzowano pięcioma parametrami, którymi są: wartość estymatora, błąd standardowy tej oceny, wartość statystyki testowej t , wartość popelnienia błędu pierwszego rodzaju oraz zakres zmienności badanej cechy fenotypowej określanej przez dany marker; estymacji dokonano z użyciem analizy regresji.

Zakres zmienności fenotypowej wyjaśnianej przez poszczególne markery wyniósł, odpowiednio: dla plonu nasion 12,1%–45,7%, liczby łuszczyk na roślinie 12,3%–35,6%, długości łuszczyk 12,1%–38,5%, liczby nasion w łuszczyku 12,1%–61,3%, oraz MTN 12,0%–55,1%. Na podstawie uzyskanych wyników wyselekcjonowano markery DNA zasocjowane z plonem, a także najważniejszymi cechami struktury plonu.



ANALIZA ASOCJACJI MARKERÓW MIKROSATELITARNYCH I AFLP Z ELEMENTAMI STRUKTURY PŁONU I PŁONEM KOLEKCIJ GENOTYPÓW RZEPAKU OZIMEGO (*Brassica napus* L.)

Alina Liersch¹, Katarzyna Mikołajczyk¹, Jan Bocianowski², Wiesława Popławska¹, Krzysztof Michalski¹, Krystyna Krótka¹, Joanna Nowakowska¹, Marcin Matuszczyk¹, Joanna Wolko¹, Iwona Bartkowiak-Broda¹

¹Instytut Hodowli i Aklimatyzacji Roślin – Państwowy Instytut Badawczy, Oddział w Poznaniu

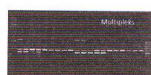
²Uniwersytet Przyrodniczy w Poznaniu, Katedra Metod Matematycznych i Statystycznych

Markery molekularne stosowane w programach hodowli roślin (ang. *marker-assisted selection*, MAS) stanowią dogodne narzędzie zwiększające efektywność procesu selekcyjnego, jak również podnoszące skuteczność selekcji fenotypowej, zwłaszcza dla cech dziedziczonych poligenicznie lub o niskim poziomie odziedziczalności.

Celem pracy było określenie asocjacji pomiędzy cechami fenotypowymi związanymi z płonem a genotypem linii i odmian rzepaku ozimego z kolekcji IHAR-PIB Oddział w Poznaniu. Badana kolekcja obejmowała polskie i zagraniczne odmiany rzepaku ozimego oraz materiał wytworzony w IHAR-PIB Oddział w Poznaniu w wyniku wieloletnich prac badawczych i hodowlanych: mieszańce F1 i komponenty rodzicielskie, linie podwojonych haploidów i rekombinanty o zmienionym składzie chemicznym nasion, linia o jasnej barwie okrywy nasiennej oraz linia rzepaku otrzymana na drodze resyntezy *de novo* z gatunków ancestralnych.

1. Genotypowanie Charakterystyka molekularna kolekcji genotypów rzepaku PB14-17

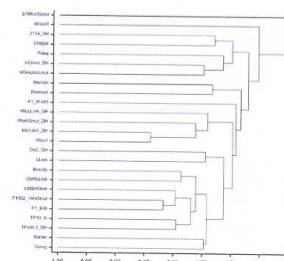
W badanej kolekcji, obecność męsko-sterylnej cytoplazmy typu *ogura* (CMS *ogura*), genu restorera *Rfo* oraz form allelicznych genów desaturazy *FAD3* i *FAD2* monitorowano, odpowiednio: markerami typu SCAR w systemie multiplex, metodą SNaPshot (Mikołajczyk i in., 2011), oraz markerami typu CAPS (Falenin i in., 2007) (Rys. 1.; Tabela 1). Do analiz podobieństw genetycznych w obrębie badanej kolekcji wykorzystano 10 kombinacji starterów AFLP i 85 markerów loci mikrosatelitarnych. Wyniki przedstawiono w formie dendrogramu (Rys. 2.); wykonano 102 różne analizy molekularne, uzyskując 779 polimorficznych produktów amplifikacji DNA.



Rysunek 1.. Przykładowe wyniki analiz kolekcji PB14-17 z zastosowaniem markerów: multiplex SCAR, SNaPshot oraz CAPS

Tabela 1. Zestawienie wyników analiz kolekcji PB14-17 z zastosowaniem analizy SNaPshot, markerów SCAR oraz CAPS

	FAD3A	FAD3C	Rfo	CMS	Rfo	FAD2/FAD3	FAD2/FAD3
PB14_01_Monodis	AA	CC	brak	brak	act	wt/wt	wt/wt
PB14_02_Eurody	AA	CC	brak	brak	act	wt/wt	wt/wt
PB14_03_Eurody	AA	CC	brak	brak	act	wt/wt	wt/wt
PB14_04_Monodis	AA	CC	brak	brak	act	wt/wt	wt/wt
PB14_05_Dist.Dist	AA	CC	brak	brak	act	wt/wt	wt/wt
PB14_06_Pol.Dist	AA	CC	brak	brak	act	wt/wt	wt/wt
PB14_07_Dist.Dist	AA	CC	Rfo	CMS	act	wt/wt	wt/wt
PB14_08_Dist.Dist	AA	CC	Rfo	CMS	act	wt/wt	wt/wt
PB14_09_Dist.Dist	AA	CC	Rfo	CMS	act	wt/wt	wt/wt
PB14_10_CMS	AA	CC	brak	CMS	act	wt/wt	wt/wt
PB14_11_CMS	AA	CC	brak	CMS	act	wt/wt	wt/wt
PB14_12_CMS	AA	CC	brak	CMS	act	wt/wt	wt/wt
PB14_13_Dist.Dist	AA	CC	brak	brak	act	wt/wt	wt/wt
PB14_14_Dist.Dist	AA	CC	brak	brak	act	wt/wt	wt/wt
PB14_15_Dist.Dist	AA	CC	brak	brak	act	wt/wt	wt/wt
PB14_16_Dist.Dist	AA	CC	brak	brak	act	wt/wt	wt/wt
PB14_17_Dist.Dist	AA	CC	Rfo	CMS	act	wt/wt	wt/wt
PB14_18_Dist.Dist	AA	CC	Rfo	CMS	act	wt/wt	wt/wt
PB14_19_Dist.Dist	AA	CC	Rfo	CMS	act	wt/wt	wt/wt
PB14_20_Dist.Dist	AA	CC	Rfo	CMS	act	wt/wt	wt/wt
PB14_21_Dist.Dist	AA	CC	Rfo	CMS	act	wt/wt	wt/wt
PB14_22_Dist.Dist	AA	CC	brak	brak	act	wt/wt	wt/wt
PB14_23_Dist.Dist	AA	CC	brak	brak	act	wt/wt	wt/wt
PB14_24_Dist.Dist	AA	CC	brak	brak	act	wt/wt	wt/wt
PB14_25_Dist.Dist	AA	CC	Rfo	CMS	act	wt/wt	wt/wt



Rys. 2. Dendrogram podobieństw genetycznych w obrębie kolekcji PB14-17

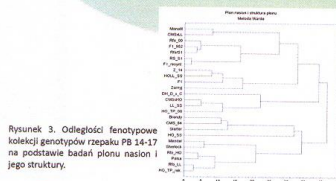
2. Fenotypowanie Charakterystyka fenotypowa kolekcji genotypów rzepaku PB 14-17

25 genotypów kolekcji PB14-17 badano w dwóch środowiskach - Borowo i Łagiewniki, w trzech kolejnych sezonach wegetacyjnych: 2014/2015, 2015/2016, 2016/2017. Płon nasion oceniono na podstawie zbioru z całych poletek, a po zbiorze oceniono masę 1000 nasion.



Borowo kwiecień 2016

Pomiary elementów struktury płonu: liczby rozgałęzień na roślinie i liczby łuszczyń na roślinie wykonano na 10 roślinach pobranych z poletka na 2 tygodnie przed zbiorem nasion, a długości łuszczyń, liczby nasion w łuszczyńce wykonano na 100 łuszczyń pobranych ze środkowej części pędu głównego każdego genotypu (Rys.3, Tab. 2). Badane genotypy różniły się istotnie pod względem badanych cech, co pozwoliło do wykorzystania tych materiałów do wykonania analiz asocjacyjnych z markerami molekularnymi.



Rysunek 3. Odległości fenotypowe kolekcji genotypów rzepaku PB 14-17 na podstawie badań płonu i jego struktury.



Łagiewniki kwiecień 2016

Tabela 2. Płon i cechy struktury płonu w cyklu trzyletnich doświadczeń polowych w Borowie i Łagiewnikach - 2015 - 2017

Obiekt	Płon nasion [dwt/h]	MTN [dwt]	Liczba rozgałęzień na roślinie	Liczba łuszczyń na roślinie	Długość łuszczyń [cm]	Liczba nasion w łuszczyńce
Sr. ogólna	30,32	4,99	8,29	295,68	61,66	18,14
Maksimum	42,15	5,70	10,29	357,49	71,08	23,19
Minimum	10,52	4,07	6,08	176,89	51,63	13,61
t obł.	14,96**	15,63**	6,67**	3,80**	9,93**	6,57**
NIR 0.05	5,80	0,16	0,86	53,29	3,76	0,86

3. Asocjacje Analizy asocjacyjne pomiędzy genotypami i płonem oraz cechami struktury płonu

Analizy asocjacyjne wykonano niezależnie dla wyników doświadczeń w sześciu środowiskach z zastosowaniem pakietu GenStat 18. Markery DNA określające płon nasion i jego strukturę na poziomie istotności $p=0,05$ scharakteryzowano parametrami: wartość estymatora, błąd standardowy tej oceny, wartość statystyki testowej t , oraz zakres zmienności badanej cechy fenotypowej określonej przez dany marker.

Dla sześciu środowisk obserwowano asocjacje 19 markerów DNA z płonem i trzema cechami struktury płonu (Tab. 3):

- płon nasion - 8 SSR, 3 AFLP
- liczba rozgałęzień - 1 SSR
- dl. łuszczyń - 1 marker SSR, 2 AFLP
- MTN - 1 SSR, 3 AFLP

Tabela 3. Związek markerów molekularnych z płonem i wybranymi cechami struktury płonu.

Symbol markera	% zmienności badanej cechy	Wartość estymatora	Błąd standardowy	Wartość statystyki testowej t
Środowisko Borowo				
SiG0806-318	33,38	11,23	3,073	3,59
Kia3_Bot134-172	20,3	-8,37	3,183	-2,647
Środowisko Łagiewniki				
G024-243	26,5	1,848	0,587	3,195
Środowisko Łagiewniki				
SiG0806-318	24,08	6,877	2,378	2,922
E.AAC.med.M.CAC-145	22,58	6,678	2,4	2,81
E.AAC.jm.M.CAC-217	19,85	6,448	2,482	2,618
Środowisko Łagiewniki				
SiG0806-318	19,07	-0,447	0,177	-2,563
E.AAC.med.M.CAC-215	19,97	-0,427	0,162	-2,627
E.AAC.jm.M.CAC-215	36,78	0,977	0,252	3,862
E.AAC.jm.M.CAC-193	19,17	0,411	0,159	2,567

PODSUMOWANIE:

- ✓ Scharakteryzowano kolekcję rzepaku ozimego PB14-17 z zastosowaniem markerów DNA typu SCAR, SNP oraz CAPS, a także 10 kombinacjami starterów AFLP i 85 loci SSR
- ✓ Przeprowadzono precyzyjną analizę fenotypową kolekcji PB14-17 badanej w dwóch miejscowościach i w trzech środowiskach dla płonu i cech struktury płonu
- ✓ Określono asocjacje genotyp/środowisko dla kolekcji PB14-17, w sześciu środowiskach, zidentyfikowano grupy markerów zaszosowanych z ważnymi gospodarczo cechami takimi jak płon nasion i cechy struktury płonu
- ✓ Planowana jest analiza genotypowa kolekcji z zastosowaniem technik nowej generacji, NG, w celu zwiększenia specyficzności analiz asocjacyjnych i identyfikacji markerów DNA mogących znaleźć praktyczne zastosowanie do selekcji genotypów rzepaku o wysokiej wartości agronomicznej

Literatura:

- Falenin C., Brégeon M., Luca M. O., Renard M. (2007). Genetic markers for high oleic content in plants. Inter. Patent Publication WO 2007/138444.
- Mikołajczyk K., Bartkowiak-Broda I., Popławska W., Szpakowski S., Dobrzycka A., Dobrzański M. (2011). A multiplex fluorescent PCR assay for molecular breeding of oilseed rape. W: Plant Breeding, wyd. przez InTech Open Access Publisher (red. Abdurakmonov I.), rozdz. 8, str. 185-200 (dostęp 30.01.2016).

Badania zostały wykonane w ramach zadania nr 48 w programie Postępowania Biologicznego w Produkcji Roślinnej 2014-2020 finansowanym przez MRRiR