

XXXIV Konferencja Naukowa
34nd Scientific Conference

ROŚLINY OLEISTE
– POSTĘPY W GENETYCE, HODOWLI,
TECHNOLOGII I ANALITYCE LIPIDÓW

OILSEED CROPS
– ADVANCES IN GENETICS, BREEDING,
TECHNOLOGY AND ANALYTICS OF LIPIDS

Streszczenia — Abstracts

10–11 kwietnia 2018 Poznań

Centrum Kongresowe IOR,
Poznań, ul. Władysława Węgorka 20a

śmierci [7]. Występowanie choroby może doprowadzić do utraty nawet 90% plonu [1]. Z tego powodu ochrona rzepaku ozimego przed występowaniem suchej zgnilizny kapustnych w programach hodowlanych rzepaku ozimego w Białorusi jest wyzwaniem.

Celem niniejszej pracy była detekcja występowania genu odporności na suchą zgniliznę kapustnych *Rlm 4* w kolekcji rzepaku ozimego na Białorusi.

W pracy Dusabenyagasani et al. (2008) [10] zidentyfikowano kodominujący marker SCAR BN204 ściśle sprzężony z lokus odporności *Rpg3Dun*. Ponadto jest on zlokalizowany w genie odporności *Rlm 4*, który jest odpowiedzialny za odporność siewek rzepaku na izolaty *L. maculans* z avirulentnym allelem *AvrLm4*. Startery flankujące marker BN204 pozwoliły na amplifikację sekwencji o wielkości 799 par zasad (pz). Obecność tej sekwencji wskazuje na obecność genu odporności *RLM4* w kolekcji rzepaku ozimego. Ponadto marker BN204 jest kodominujący, co pozwala na jego detekcję w układzie homozygotycznym (799 pz), a także heterozygotycznym (799 pz i 555 pz).

W doświadczeniu przeanalizowano kolekcję 138 odmian rzepaku jarego i ozimego zebraną w Department of Oil Crops, Republican and Practical Center for Arable Farming. Gen odporności *Rlm4* wykryto w 121 próbach, z czego 114 było homozygotycznych, a 8 heterozygotycznych dla genu *Rlm4*.

Wyniki przeprowadzonych analiz wskazują, że marker BN204 jest markerem funkcjonalnym, który może być wykorzystany w selekcji wspomaganej markerami molekularnymi.

13. Alina Liersch¹, Katarzyna Mikołajczyk¹, Jan Bocianowski², Wiesława Popławska¹, Joanna Nowakowska¹, Marcin Matuszczak¹, Iwona Bartkowiak-Broda¹, Krzysztof Michalski¹, Krystyna Krótka¹

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

² Uniwersytet Przyrodniczy w Poznaniu, Katedra Metod Matematycznych i Statystycznych

Analizy asocjacyjne markerów mikrosatelitarnych i AFLP z plonem oraz cechami jakościowymi nasion rzepaku ozimego (*Brassica napus* L.)

Association analysis of microsatellite and AFLP markers with yield and seed quality traits of winter oilseed rape (*Brassica napus* L.)

Celem badań była analiza asocjacji pomiędzy fenotypem a genotypem linii i odmian hodowlanych rzepaku z kolekcji IHAR-PIB, Oddział w Poznaniu. Kolekcja ta obejmowała 25 genotypów stanowiących: (1) polskie i zagraniczne odmiany podwójnie ulepszone rzepaku ozimego zróżnicowane pod względem cech fenologicznych, struktury plonu, odporności/tolerancji na stres abiotyczny i biotyczny, a także cech jakościowych nasion, (2) mieszańce F1 (otrzymane z wykorzystaniem systemu męskiej sterility typu *ogura*) i ich linie rodzicielskie – męsko-sterylne z cytoplazmą CMS *ogura* oraz linie restorera z genem *Rfo*, (3) nowo wytworzone linie o zmienionych proporcjach osiemnastowęglowych kwasów tłuszczowych, C18, jedno- i wielonienasyconych, uzyskane na drodze mutagenazy chemicznej i ich rekombinanty, (4) genotypy charakteryzujące się jasną barwą nasion i obniżoną zawartością włókna, a także (5) linię *B. napus* otrzymaną na drodze resyntezy z gatunków rodzicielskich, *B. rapa* i *B. oleracea*.

Doświadczenia polowe dla 25 obiektów badanej kolekcji prowadzono w układzie bloków kompletnych losowanych, w czterech powtórzeniach i w sześciu środowiskach. Plon nasion oceniono na podstawie zbioru z całych poletek. Badano zawartość białka

i tłuszczu w nasionach, skład kwasów tłuszczowych w oleju, a także zawartość glukozynolanów oraz frakcji włókna ADF i NDF.

Genotypy charakteryzowano z zastosowaniem markerów 80 loci mikrosatelitarnych, oraz 10 kombinacji starterów AFLP, a także przy użyciu allelo-specyficznych markerów CAPS i SNP dla niezmutowanych i zmutowanych genów desaturaz, odpowiednio, FAD2 i FAD3, jak również markerów SCAR dla męsko-sterylnej cytoplazmy typu *ogura* oraz genu restorera *Rfo*. Łącznie analizowano 685 polimorficznych markerów DNA.

Analizy asocjacyjne wykonano niezależnie dla wyników doświadczeń w sześciu środowiskach oraz dla średniej wyznaczonej dla sześciu środowisk z zastosowaniem pakietu GenStat 17. Markery DNA określające poszczególne cechy fenotypowe na poziomie istotności $p=0,05$ scharakteryzowano pięcioma parametrami: wartością estymatora, błędem standardowym tej oceny, wartością statystyki testowej t , wartością popelnienia błędu pierwszego rodzaju oraz zakresem 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 22,4–36,1%, zawartości tłuszczu w nasionach 20,9–42,9%, sumy glukozynolanów 23,5–36,7%, białka 20,1–35,3% oraz dla włókna, frakcji ADF 29,8–73,2% i NDF 25,5–71,2%. Na podstawie uzyskanych wyników wyselekcjonowano markery DNA zasocjowane z plonem oraz ważnymi gospodarczo cechami jakościowymi nasion.

Badania zostały wykonane w ramach zadania nr 48 na rzecz Postępu Biologicznego w Produkcji Roślinnej finansowanego przez MRiRW.

Autorzy wyrażają serdeczne podziękowania Pani Profesor dr hab. T. Cegielskiej-Taras, dr Laurencji Szała oraz dr Katarzynie Sosnowskiej za udostępnienie do badań linii podwojonych haploidów oraz linii resyntetyzowanej *B. napus* otrzymanych w Pracowni Kultur Tkankowych, a także dr hab. Stanisławowi Spasibionkowi za udostępnienie genotypów rzepaku ozimego o zmienionych proporcjach kwasów tłuszczowych w oleju nasion.

The aim of this work was the analysis of association between phenotype and genotype among breeding lines and cultivars of rapeseed collected at the PBAI-NRI, Research Division in Poznan, Poland. The collected 25 genotypes included: (1) selected Polish and foreign canola-type winter rapeseed cultivars characterized by distinct phenological traits, in addition to yield structure, resistance/ tolerance to abiotic and biotic stress, as well as quality traits of seeds, (2) F1 hybrids (developed with the use of the *ogura*-type male sterility system) and their parental lines – the male sterile *ogura* CMS and the *Rfo* restorer lines, (3) newly developed breeding lines characterized by the changed proportion of the C18, mono- and polyunsaturated fatty acids in seed oil obtained as a result of the chemical mutagenesis in addition to their recombinant inbred lines, (4) genotypes characterized by bright seed cover and lowered fiber content, and also (5) *de novo* developed *B. napus* resynthesized line using *B. rapa* and *B. campestris* parental species.

Field trials including the analyzed 25 objects were performed in randomized complete block design, in four repetitions and in six environments. Seed yield was estimated for harvest from total plot. Seed protein and oil content, fatty acid composition in seed oil as well as glucosinolates content and the ADF and NDF fiber fractions were analyzed.

Genotyping was done using 80 microsatellite loci and 10 AFLP primer combinations, as well as allele-specific CAPS and SNP markers for non-mutated and mutant FAD2 and

FAD3 desaturase genes, respectively, and also SCAR markers for the *ogura* male-sterile cytoplasm and the *Rfo* restorer gene. In total, 685 polymorphic DNA markers were analyzed.

Association analyses were performed both, for each of the six environment separately, and for the calculated mean value of the six environments using the Genstat 17 statistical software. DNA markers determining particular phenotype traits with statistical significance level of $p=0.05$ were estimated using five parameters: estimate of regression coefficients, standard error of estimation, t-test value, P-value, and the range of phenotypic variation accounted by particular marker; estimation was done using the regression analysis.

The range of phenotypic variation accounted by particular marker equaled, respectively: for seed yield, 22.4–36.1%, for oil content 20.9–42.9%, total glucosinolates 23.5–36.7%, protein content 20.1–35.3%, and for fiber, ADF 29.8–73.2%, NDF 25.5–71.2%. As a result, DNA markers associated with seed yield and agronomically important grain quality traits were selected.

This work was sponsored by the Polish Ministry of Agriculture and Rural Development in the project Biological Progress in Plant Production, task No 48.

The Authors would like to thank Professor Teresa Cegielska-Taras, Dr Laurencja Szała and Dr Katarzyna Sosnowska for kindly providing doubled haploid lines as well as a resynthetic *B. napus* line used in this work, and also Dr hab. Stanisław Spasibonek for kindly providing rapeseed genotypes with the changed proportion of seed oil fatty acid.

14. Katarzyna Gacek¹, Iwona Bartkowiak-Broda¹, Laurencja Szała¹, Teresa Cegielska-Taras¹, Philipp E. Bayer², David Edwards², Jacqueline Batley², Steven Penfield³

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

² School of Plant Biology, University of Western Australia, Perth, Crawley, Australia

³ John Innes Centre, Norwich, UK

Identyfikacja genetycznych podstaw procesu kiełkowania w nasionach rzepaku (*Brassica napus* L.) z wykorzystaniem mapowania asocjacyjnego

Identification of genetic mechanism regulating seed germination in oilseed rape (*Brassica napus* L.) using association mapping

Nasiona roślin uprawnych pełnią kluczową rolę w plonowaniu, a więc zapewnieniu bezpieczeństwa żywnościowego człowieka. O jakości i wielkości plonu w dużej mierze decyduje wigor nasion, który warunkuje szybkie kiełkowanie oraz wyrównany rozwój siewek w odpowiednich warunkach środowiskowych. Ulepszenie wigoru nasion rzepaku ma istotne znaczenie w hodowli plennych odmian tego gatunku i aby go uzyskać, należy poznać genetyczne podstawy m.in. kiełkowania. W tym celu wykorzystano populację mapującą złożoną z 78 linii podwojonych haploidów (DH) uzyskanych z mieszańców pochodzących ze skrzyżowania linii różniących się siłą kiełkowania: czarnonasiennej (M305) oraz żółtonasiennej (Z114). Analizę kiełkowania populacji mapującej Z114×M305 przeprowadzono wykorzystując wysokoprzepustową, zautomatyzowaną metodę analizy zdolności i energii kiełkowania przez 14 dni (Joosen, Kodde et al. 2010). Analiza ta wykazała, że badane linie DH posiadają zróżnicowaną zdolność kiełkowania (T_{50}) względem linii rodzicielskich, co wraz z zaobserwowanym zróżnicowaniem zabarwieniem nasion tych linii wskazuje na transgresję alleli w tej populacji. Kolejnym etapem badań będzie sekwen-



ANALIZY ASOCJACYJNE MARKERÓW MIKROSATELITARNYCH I AFLP Z PLONEM I CECAMI JAKOŚCIOWYMI NASION RZEPAKU OZIMEGO (*Brassica napus* L.)

Alina Liersch¹, Katarzyna Mikołajczyk¹, Jan Bocianowski², Wiesława Popławska¹, Joanna Nowakowska¹, Marcin Matuszczak¹,
Iwona Bartkowiak-Broda¹, Krzysztof Michalski¹, Krystyna Krótka¹

¹Instytut Hodowli i Aklimatyzacji Roślin - Państwowy Instytut Badawczy, Oddział w Poznaniu
²Uniwersytet Przyrodniczy w Poznaniu, Katedra Metod Matematycznych i Statystycznych

Analiza genotypów rzepaku przy użyciu różnych typów markerów molekularnych pozwala na określenie rejonów genomu związanych z ważnymi gospodarczo cechami. Celem badań była analiza asocjacji pomiędzy fenotypem i genotypem linii i odmian hodowlanych rzepaku z kolekcji IHAR-PIB, Oddział w Poznaniu.

MATERIAL I METODY

Materiałem do badań była kolekcja 25 genotypów rzepaku ozimego, w skład której wchodziły: odmiany podwójnie ulepszone rzepaku ozimego różnicowane pod względem cech jakościowych, mieszańce F₂, CMS *ogura* i ich linie rodzicielskie, linie o zmienionych proporcjach kwasów tłuszczowych, C18, jedno- i wielonienasycone, linia DH o jasnej barwie nasion, a także linia resyntetyczna rzepaku otrzymana na drodze resyntezy z gatunków podstawowych *B. rapa* i *B. oleracea*. Fenotypowanie wykonano w cztero-powtórzeniowych doświadczeniach polowych, w układzie bloków kompletnych zrandomizowanych w dwóch miejscowościach – Borowo i Łagiewniki i trzech kolejnych sezonach wegetacyjnych. Oceniono plon nasion (z całych poletek), a po zbiorze wykonano analizę chemiczną nasion i określono zawartość tłuszczu, białka, frakcji ADF i NDF włókna, glukozyzolanów i kwasów tłuszczowych w oleju nasion. Genotypy charakteryzowano z zastosowaniem markerów 80 loci mikrosatelitarnych, oraz 10 kombinacji starterów AFLP, przy użyciu allelo-specyficznych markerów CAPS i SNP dla zmutowanych i niezmutowanych genów desaturaz - FAD2 i FAD3, a także markerów SCAR CMS i SCAR C02. Łącznie analizowano 685 polimorficznych markerów DNA. Analizy asocjacyjne wykonano niezależnie dla wyników doświadczeń w sześciu środowiskach (2 miejscowości x 3 lata) oraz dla średniej wyznaczonej dla sześciu środowisk z zastosowaniem pakietu GenStat 17.

WYNIKI

Wszystkie badane w sześciu środowiskach genotypy kolekcji różniły się istotnie poziomem plonowania oraz składem chemicznym nasion (Rysunek 1A-C). W sumie zaobserwowano 3132 asocjacje. Wyniki analiz asocjacyjnych dla poszczególnych cech przedstawiono w tabeli 1. Markery DNA określające poszczególne cechy fenotypowe na poziomie istotności p=0,05 scharakteryzowano czterema parametrami: procentem zmienności badanej cechy wyjaśnianej przez dany marker, wartością estymatora, błędem standardowym tej oceny i wartością prawdopodobieństwa popełnienia błędu pierwszego rodzaju (wartość F); estymacji dokonano z użyciem analizy regresji.

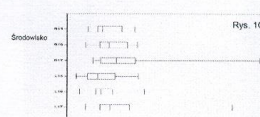
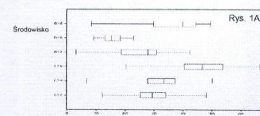
Tabela 1. Związek wybranych markerów molekularnych z cechami fenotypowymi

Symbol markera	% zmienności wyjaśnianej cechy	Wartość estymatora	Błąd standardowy	Wartość F pr.	Symbol markera	% zmienności wyjaśnianej cechy	Wartość estymatora	Błąd standardowy	Wartość F pr.
Plon nasion									
E-AAC ned M-CAC-169	27,9	11,83	3,69	0,004	E-AGG joe M-CTC-392	25,3	9,27	3,07	0,006
ACC ned M-CAC-97,8	26,9	-8,72	2,78	0,005	E-AGG joe M-CAC-121	27,6	10,11	3,17	0,004
ACC ned M-CAC-215	24,7	-8,41	2,82	0,007	SSRlocE04-236	27,6	-10,11	3,17	0,004
ACC ned M-CAC-91,1	24,8	-12,7	4,25	0,007	SSRlocE04-242	32,1	11,54	3,28	0,002
E-ACC ned M-CTC-139	36,1	10,83	2,84	<0,001	SSRlocG08-318	35,3	10,72	2,85	0,001
Tłuszcz									
E-AAC ned M-CAC-70	42,9	-1,385	0,313	<0,001	SSRlocE01-398	24,0	0,991	0,338	0,008
E-AGG joe M-CAG-270	22,2	0,852	0,305	0,01	SSRlocG31-242	24,4	0,858	0,29	0,007
Zawartość kwasu oleinowego C18:1									
E-AACned M-CAC-146,165	24,9	5,87	1,9	0,007	E-AAC ned M-CAC-146	29,6	-4,86	1,46	0,003
E-AAC ned M-CAC-241	30,5	6,07	1,79	0,002	E-AAC ned M-CAC-165	31,7	-4,94	1,42	0,002
E-AGG joe M-CTA-228,330	24,4	5,55	1,88	0,007	E-ACC ned M-CAG-287	39,6	-5,42	1,32	<0,001
SSRlocG02-219	30,5	-6,76	1,99	0,002	E-AGG joe M-CTA-228	31,7	-4,94	1,42	0,002
SSRlocG53-160	30,2	7,06	2,1	0,003	E-AGG joe M-CTC-338	29,4	-5,47	1,69	0,004
FAD2 H4-mutant	22,0	6,6	2,37	0,01	SSRlocG53-160	27,5	-5,39	1,7	0,004
Zawartość kwasu linolenowego C18:2									
E-AAC ned M-CAC-438	35,7	3,96	1,05	<0,001	SSRlocG83-159	30,2	-1,964	0,593	0,003
E-ACC ned M-CAC-429	31,7	2,008	0,576	0,002	FAD2 H3-wild	30,6	2,231	0,655	0,002
E-ACC ned M-CAG-91,1	30,6	-2,231	0,655	0,002	FAD2 H3-mutant	32,8	-1,868	0,524	0,002
E-AGG joe M-CAG-157	35,7	-3,96	1,05	<0,001	FAD2 H4-wild	35,7	3,96	1,05	<0,001
SSRlocG02-219	49,0	1,879	0,43	<0,001	FAD2 H4-mutant	35,7	-3,96	1,05	<0,001
SSRlocG57-352	31,4	-2,701	0,761	0,002	FAD3 A-wild	35,7	3,96	1,05	<0,001
SSRlocG05-356	30,3	1,445	0,427	0,003	FAD3 A-mutant	35,7	-3,96	1,05	<0,001
Suma glukozyzolanów									
E-ACC ned M-CAG-77	35,5	10,25	2,72	0,001	E-AAC ned M-CAC-67,8	31,9	0,758	0,217	0,002
E-AGG joe M-CTA-152	35,5	6,2	1,64	<0,001	E-ACC ned M-CAC-306	35,3	0,971	0,259	0,001
E-AGG joe M-CAG-140	36,9	6,63	1,71	<0,001	SSRlocG09-210	33,7	0,892	0,245	0,001
SSRlocG52-202	31,9	-8,17	2,33	0,002	SSRlocG19-225	30,4	-0,992	0,293	0,003
Włókno ADF									
E-AAC ned M-CAC-74	37,0	2,568	0,661	<0,001	E-AAC ned M-CAC-206	45,3	2,536	0,556	<0,001
E-ACC ned M-CAC-206	39,0	2,627	0,65	<0,001	E-ACC ned M-CAC-263	52,1	3,051	0,586	<0,001
E-ACC ned M-CAC-263	47,1	3,229	0,693	<0,001	E-ACC ned M-CAC-223	71,2	5,855	0,754	<0,001
E-ACC ned M-CAC-223	73,2	6,576	0,807	<0,001	E-ACC ned M-CAG-68	51,9	3,048	0,567	<0,001
E-ACC ned M-CAG-68	55,9	3,498	0,624	<0,001	E-AGG joe M-CAC-121	36,5	1,977	0,513	<0,001
E-AGG joe M-CTA-163	73,2	6,576	0,807	<0,001	E-AGG joe M-CAT-163	71,2	5,855	0,754	<0,001
E-AGG joe M-CAG-336	43,1	-3,718	0,848	<0,001	E-AGG ned M-CAG-336	38,9	-3,201	0,793	<0,001
SSRlocG31-396	66,2	4,531	0,654	<0,001	SSRlocG15-386	65,9	4,077	0,593	<0,001
SSRlocE04-242	40,3	2,455	0,589	<0,001	SSRlocE04-242	46,0	2,341	0,506	<0,001
SSRlocG18-217	73,2	6,576	0,807	<0,001	SSRlocG88-217	71,2	5,855	0,754	<0,001
SSRlocG97-219	35,8	-2,853	0,753	<0,001	SSRlocG97-219	37,3	-2,621	0,671	<0,001
SSRlocG93-154	73,2	6,576	0,807	<0,001	SSRlocG05-138	71,2	5,855	0,754	<0,001
SSRlocG41-224	43,1	3,718	0,848	<0,001	SSRlocG41-224	38,9	3,201	0,793	<0,001

WNIOSKI

- Badane w sześciu środowiskach genotypy rzepaku wchodzące w skład kolekcji wykazywały istotne różnicowanie pod względem ocenianych cech fenotypowych.
- Na podstawie otrzymanych wyników wyselekcjonowano markery DNA zasocjowane z plonem oraz ważnymi gospodarczo cechami jakościowymi nasion.

W tabeli 1 przedstawiono wybrane markery istotnie statystycznie związane z poszczególnymi cechami. Dla każdej z badanych z cech przedstawiono wyniki, w których % zmienności badanej cechy wyjaśnianej przez dany marker wynosił nie mniej niż 20% i występował przynajmniej w trzech badanych środowiskach (w tabeli 1 umieszczono wartości dla średniej ze środowisk). Zakres zmienności fenotypowej dla wszystkich analizowanych cech wynosił 22,0 – 73,2 %, a dla poszczególnych cech odpowiednio: dla plonu nasion 24,7 – 36,1%, zawartości tłuszczu w nasionach 22,2 - 42,9%, zawartości kwasu oleinowego (C18:1) 22,0 – 30,5%, kwasu linolenowego (C18:2) 27,5 -39,6% i linolenowego (C18:3) w oleju nasion 30,2 -43,0%.



Rysunek 1. Wykres pudełkowy (boxplot) wartości wybranych cech (A- plon nasion, B- kwas oleinowy C18:1, C- suma glukozyzolanów) w sześciu badanych środowiskach

Dla sumy glukozyzolanów zakres zmienności wyjaśnianej przez poszczególne markery wynosił 31,9 - 36,9%, białka 30,4 - 35,3%, a dla włókna ADF 35,8 - 73,2% oraz frakcji NDF 36,5 - 71,2%.



Badania zostały wykonane w ramach zadania nr 46 na rzecz Programu Postępu Biologicznego w Produkcji Roślinnej na lata 2014-2020 finansowanego przez MBRiW.