

Edyta Małgorzata PACZOS-GRZĘDA, Piotr Tomasz BEDNAREK<sup>1</sup>, Aneta KOROLUK

## ZASTOSOWANIE MARKERÓW *silicoDArT* DO OCENY POLIMORFIZMU MIĘDZYODMIANOWEGO *AVENA SATIVA* L.

### *AVENA SATIVA* L. INTERCULTIVAR POLYMORPHISM ASSESSMENT USING *silicoDArT* MARKERS

Instytut Genetyki, Hodowli i Biotechnologii Roślin, Uniwersytet Przyrodniczy w Lublinie

<sup>1</sup>Instytut Hodowli i Aklimatyzacji Roślin, Radzików

**Abstract.** *Avena sativa* is an important breeding species in Poland which is due to the presence of proteins, soluble fibers, fat, minerals and vitamins. Nevertheless, the development of breeding programs of *Avena* is limited to low within species genetic variability. Thus, marker technologies capable of identification of many polymorphic markers is required to ensure further breeding progress. The current study was devoted to the exploitation of the *silicoDArT* markers, based on new generation sequencing approach, for the differentiation of a number of *Avena sativa* lines from Polish breeding companies. More than 8000 polymorphic markers were identified that differentiated the analyzed materials according to their origin. Cluster analysis and PCoA demonstrated distinctiveness of the materials from breeding companies, especially from Plant Breeding Strzelce. It is being suggested that crossing cultivars originated from different breeding programs should support progress in this species.

**Słowa kluczowe:** *Avena sativa*, owies, *silicoDArT*, zmienność genetyczna.

**Key words:** *Avena sativa*, genetic variation, oat, *silicoDArT*.

## WSTĘP

Owies zwyczajny (*Avena sativa* L.) należy do rodzaju *Avena* L., rodziny *Poaceae* Barnh (Frey i Rutkowski 2002). Hodowlę owsa w Polsce rozpoczęto pod koniec XIX w. Znaczenie gospodarcze tego gatunku w uprawie, związane z dużym pogłowiem koni, było wówczas bardzo istotne (Budzyński i Szempliński 2003, Spiss 2003). Na przestrzeni ostatnich kilkudziesięciu lat obserwowano stopniowy spadek produkcji owsa w Polsce, co było wynikiem oddziaływania wielu czynników agrotechnicznych i ekonomicznych. Od kilku lat powierzchnia uprawy i produkcji tego zboża stabilizuje się; w 2000 r. wynosiła 566 tys. ha, w 2005 r. – 539 tys. ha, w 2010 r. – 577 tys. ha a w 2011 r. – 546 tys. ha. Polska zajmuje czwarte miejsce na świecie pod względem powierzchni zasiewów owsa, za Rosją, Kanadą i USA (FAOSTAT... 2013). Z uwagi na właściwości odżywcze znaczenie owsa w żywieniu człowieka stale rośnie. Dobrej jakości białko, wysoka zawartość rozpuszczalnego błonnika,

tłuszczu, soli mineralnych i witamin powoduje wszechstronne wykorzystanie tego zboża (Gąsiorowski 1995). Ważne jest więc, aby uwzględnić możliwości biologii molekularnej we wspomaganiu programów hodowlanych dotyczących tego gatunku.

Techniki molekularnej analizy DNA umożliwiają identyfikację i lokalizację polimorfizmów różnicujących poszczególne osobniki. Mutacje punktowe, insercje lub delecje powodują zmiany sekwencji DNA i w efekcie mogą powodować powstawanie nowych wariantów allelicznych genów. Za pomocą markerów molekularnych można oceniać zróżnicowanie genetyczne, a także identyfikować odmiany i materiały hodowlane. Niewielkie zróżnicowanie genetyczne owsa zwyczajnego (Paczos-Grzęda 2004) wymusza stosowanie w przypadku tego gatunku systemów markerowych identyfikujących wysoki poziom polimorfizmu na jak największym obszarze genomu. Technologia o wysokiej rozdzielczości, umożliwiającą prowadzenie całogenomowych analiz, jest DArT (Diversity Arrays Technology) – Jaccoud i in. (2001). Technologia DArT, w zależności od analizowanego materiału, prowadzi do uzyskania jednorazowo od kilkuset do kilku tysięcy markerów molekularnych o charakterze dominującym. Detekcja polimorfizmów opiera się na procesie hybrydyzacji tzw. reprezentacji genomowej z sondami nadrukowanymi na płytce mikromacierzowej. Procedura DArT oraz odczyt i interpretacja wyników są bardzo zautomatyzowane. Markery DArT zaliczane są do grupy markerów losowych, ponieważ ich identyfikacja nie wymaga znajomości sekwencji nukleotydowej DNA.

Obecnie coraz powszechniejsze są technologie nowej generacji, które pozwalają na znacznie szybsze przeprowadzenie procesu genotypowania z wykorzystaniem sekwencjonowania. Modyfikacją metody DArT jest DArTseq. Polega ona na zastąpieniu etapu hybrydyzacji na mikromacierzach sekwencjonowaniem następnej generacji w systemie Illuminy (Kilian i Graner 2012). W efekcie analiz uzyskuje się kilkakrotnie więcej markerów polimorficznych – zarówno dominujących – silicoDArT, jak i kodominujących – SNP.

Celem pracy było określenie możliwości wykorzystania markerów silicoDArT do oceny polimorfizmu międzyodmianowego *Avena sativa* L.

## MATERIAŁ I METODY

Przedmiotem badań było 16 polskich odmian i jedna linia hodowlana owsa zwyczajnego (*Avena sativa* L.), które pochodziły ze spółek hodowlanych: DANKO Hodowla Roślin Sp. z o.o. z/s w Choryni, Hodowla Roślin Strzelce Sp. z o.o., Małopolska Hodowla Roślin HBP Sp. z o.o. w Polanowicach oraz ze stacji hodowlanej SH Rogaczewo, która obecnie podlega spółce DANKO. Spośród badanych odmian tylko 7 znajdowało się w Krajowym rejestrze odmian z 2013 r. (tab. 1). Ziarniaki odmian sprowadzono ze spółek hodowlanych, w których zostały one wyhodowane. W przypadku odmian 'Sam' i 'Bingo' analizę przeprowadzono dla dwóch sublinii, z których każda została wyprowadzona z pojedynczego ziarniaka i była rozmnażana metodą SSD (ang. *single seed descent*), z zachowaniem izolacji przez 5 lat.

Ekstrakcję całkowitego genomowego DNA z młodych liści analizowanych form przeprowadzono, używając zestawu do izolacji DNA GenElute Plant Mini Kit (Sigma-Aldrich). Czystość i stężenie DNA określono spektrofotometrycznie, a jakość – elektroforetycznie w 1-procentowym żelu agarozowym.

Tabela 1. Pochodzenie badanych odmian *Avena sativa* L.  
Table 1. Origin of analysed *Avena sativa* L. cultivars

| Odmiana – Linia<br>Cultivar – Line | Pochodzenie<br>Pedigree                                  | Hodowca<br>Breeder                     | Rok wpisania do<br>Krajowego rejestru<br>odmian<br>Entry date | Rok wygaśnięcia<br>wpisu<br>Expiration date |
|------------------------------------|--|--|---|---|
| 'Arab'                             | 'Borys' x 'Jawor'  | DANKO                                  | 2004  | 2014  |
| 'Bachmat'                          | 'Dula' x 'Komes'   | DANKO                                  | 2001  | 2007  |
| 'Bohun'                            | LP 8675 x STH 110/86                                     | DANKO                                  | 2002  | 2012  |
| 'Budrys'                           | 'Adamo' x CHD 792  | DANKO                                  | 2001  | 2005  |
| 'Cwal'                             | 'Borys' x 'Jawor'  | DANKO                                  | 2001  | 2011  |
| 'Deresz'                           | 'Maro' / MGH 978.2                                       | DANKO                                  | 2000  | 2020  |
| 'Furman'                           | 'Kwant' x 'Jawor'  | DANKO                                  | 2006  | 2016  |
| 'Hetman'                           | 'Jawor' x 'Semundo 212.1'                                | DANKO                                  | 1999  | 2007  |
| 'Jawor'                            | MGH 0894.4 x ('Mana' x 'Leanda')                         | DANKO                                  | 1994  | 2007  |
| 'Komes'                            | MGH 61649 x 'Jaycce'                                     | DANKO                                  | 1985  | 1999  |
| 'Zuch'                             | 'Vusch' x 'Szakal'                                       | DANKO                                  | 2008  | 2018  |
| 'Bingo'                            | STH 214 x STH 13827                                      | HR Strzelce                            | 2009  | 2019  |
| 'Sam'                              | 'Flamingsnova' x 'Swan mut.'<br>STH 110/86 x 'Swan mut.' | HR Strzelce                            | 1999  | 2010  |
| STH 9787                           | STH 4541 x STH 593                                       | HR Strzelce                            | –   | –   |
| 'Celer'                            | 'Góral' x KR-KOR   | Małopolska<br>Hodowla<br>Roślin        | 2000  | 2020  |
| 'Kasztan'                          | 'Dawid' x CHD 1685/84lub83                               | Małopolska<br>Hodowla<br>Roślin<br>SHR | 1999  | 2020  |
| 'Dragon'                           | MGH 6374 x 'Diadem'                                      | Rogaczewo<br>(obecnie<br>DANKO)        | 1982  | 2004  |

Następnie ujednociono stężenie wszystkich próbek DNA do  $100 \text{ ng} \cdot \mu\text{l}^{-1}$ . Wyizolowany DNA poddano genotypowaniu metodą DARTseq (Kilian i Graner 2012). Analizy zostały zrealizowane w Diversity Arrays Technology Ltd. (Canberra, Australia). Markery *silicoDArT* są markerami o charakterze dominującym, gdyż zmienność jest określona za pomocą pojedynczej mutacji punktowej, bez wariantu z drugiego chromosomu homologicznego. Obecność lub brak mutacji (markera *silicoDArT*) traktowano jako pojedynczą cechę, której przypisywano odpowiednio wartość 1 lub 0. Matryca, uzyskana na podstawie analizy polimorfizmu markerów, posłużyła do oceny podobieństwa genetycznego (SI – ang. *similarity index*) pomiędzy parami wszystkich badanych odmian, zgodnie z formułą Dice'a, cyt. za: Nei i Li (1979). Konstrukcję dendrogramu, metodą średnich połączeń UPGMA (Unweighted Pair Group Method with Arithmetic Average), wykonano w programie PAST (Hammer i in. 2001). Wiarygodność grupowania odmian w skupieniach określano metodą bootstrap dla 1000 permutacji. Analizę składowych głównych (PCoA – Principal Coordinate Analysis) wykonano w programie PAST.

## WYNIKI

Uzyskanych fragmentów DNA było razem 8617, w tym 8505 (98,7%) polimorficznych. Średnio dla każdego genotypu uzyskano 4600 sekwencji. Liczba polimorficznych sekwencji silicoDArT, identyfikowanych dla jednej formy, wahała się od 3820 w przypadku odmiany 'Jawor' do 6131 w przypadku linii STH 9787 (tab. 2).

Tabela 2. Charakterystyka polimorfizmu markerów silicoDArT  
Table 2. Polymorphism of silicoDArT markers

| Odmiana<br>Cultivar | Liczba markerów<br>silicoDArT<br>Number<br>of silicoDArT<br>markers | Liczba<br>polimorficznych<br>markerów silicoDArT<br>Number<br>of polymorphic<br>silicoDArT markers | Liczba<br>specyficznych<br>genotypowo<br>markerów silicoDArT<br>Number of specific<br>silicoDArT markers | Liczba brakujących<br>danych<br>Number of missing<br>data |
|---------------------|---|--|--|---|
| 'Arab'              | 4654  | 4542   | 1  | 322   |
| 'Bachmat'           | 4148  | 4039   | 0  | 1368  |
| 'Bohun'             | 4509  | 4402   | 0  | 788   |
| 'Budrys'            | 4457  | 4346   | 0  | 713   |
| 'Celer'             | 3943  | 3840   | 2  | 647   |
| 'Cwał'              | 4375  | 4264   | 0  | 902   |
| 'Deresz'            | 4080  | 3969   | 0  | 929   |
| 'Dragon'            | 4300  | 4189   | 0  | 691   |
| 'Furman'            | 4204  | 4093   | 2  | 749   |
| 'Hetman'            | 4261  | 4150   | 1  | 580   |
| 'Jawor'             | 3930  | 3820   | 3  | 721   |
| 'Kasztan'           | 4348  | 4238   | 6  | 648   |
| 'Komes'             | 4666  | 4555   | 0  | 1078  |
| STH 9787            | 6241  | 6131   | 392  | 61  |
| 'Bingo'             | 6145  | 6035   | 22   | 160   |
| 'Bingo_2'           | 5704  | 5598   | 1  | 557   |
| 'Sam'               | 4426  | 4318   | 0  | 873   |
| 'Sam_2'             | 4480  | 4374   | 0  | 837   |
| 'Zuch'              | 4523  | 4417   | 1  | 1940  |
| Średnia<br>Mean     | 4600  | 4490   | 22.7   | 766   |
| Suma<br>Total       |   |  | 431  |   |

Średnio na formę przypadło 4490 polimorficznych fragmentów. Analizując dane, poszukiwano sekwencji charakterystycznych dla pojedynczych genotypów umożliwiających odróżnienie poszczególnych obiektów od siebie. Dla 9 odmian nie zidentyfikowano fragmentów specyficznych. U odmian 'Bingo', 'Zuch' i 'Hetman' występowały pojedyncze fragmenty tego typu. Największą liczbę fragmentów specyficznych stwierdzono w przypadku linii STH 9787. W sumie takich fragmentów odnotowano 431.

Tabela 3. Matryca indeksów podobieństwa genetycznego Dice'a (SI) badanych odmian *Avena sativa* L., określonych na podstawie polimorfizmu markerów silicoDArT

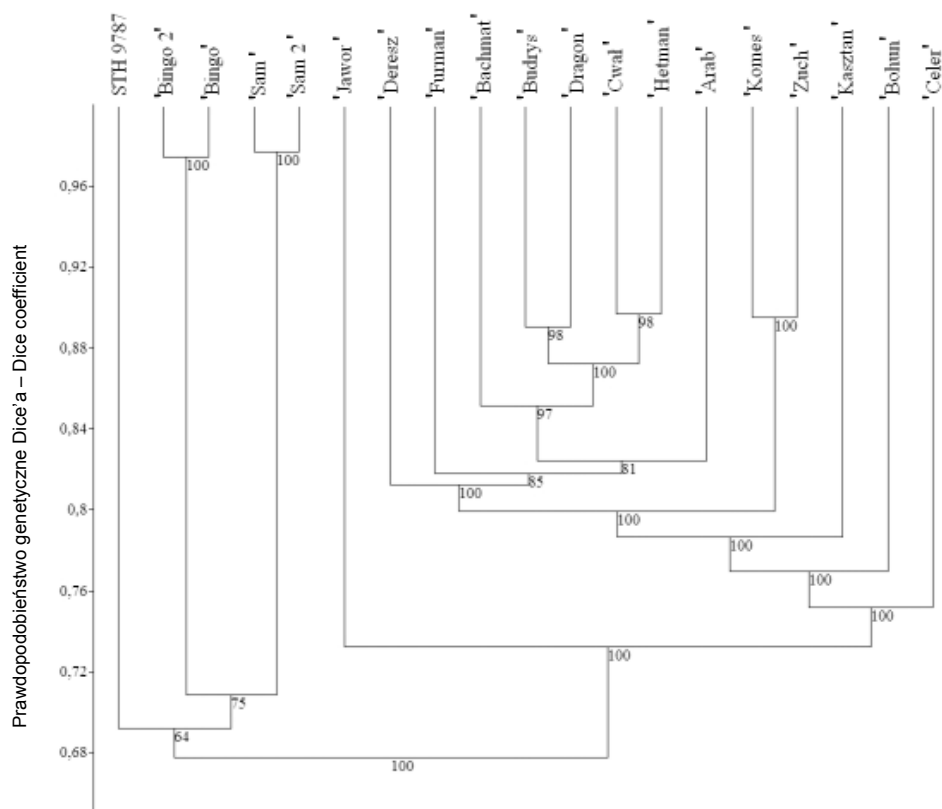
Table 3. Dice coefficient similarity matrix *Avena sativa* L. cultivars based on the polymorphism of silicoDArT markers

| Odmiana<br>Cultivar | 'Arab' | 'Bachmat' | 'Bohun' | 'Budrys' | 'Celer' | 'Cwał' | 'Deresz' | 'Dragon' | 'Furman' | 'Hetman' | 'Jawor' | 'Kasztan' | 'Komes' | STH 9787 | 'Bingo' | 'Sam' | 'Sam_2' | 'Zuch' | Średnie podobieństwo<br>do pozostałych odmian<br>Mean similarity to other<br>cultivars |
|---------------------|--------|-----------|---------|----------|---------|--------|----------|----------|----------|----------|---------|-----------|---------|----------|---------|-------|---------|--------|--|
| 'Arab'              |        |           |         |          |         |        |          |          |          |          |         |           |         |          |         |       |         |        | 0,756  |
| 'Bachmat'           | 0,845  |           |         |          |         |        |          |          |          |          |         |           |         |          |         |       |         |        | 0,786  |
| 'Bohun'             | 0,794  | 0,786     |         |          |         |        |          |          |          |          |         |           |         |          |         |       |         |        | 0,749  |
| 'Budrys'            | 0,838  | 0,862     | 0,778   |          |         |        |          |          |          |          |         |           |         |          |         |       |         |        | 0,780  |
| 'Celer'             | 0,751  | 0,762     | 0,746   | 0,759    |         |        |          |          |          |          |         |           |         |          |         |       |         |        | 0,718  |
| 'Cwał'              | 0,817  | 0,861     | 0,775   | 0,865    | 0,771   |        |          |          |          |          |         |           |         |          |         |       |         |        | 0,784  |
| 'Deresz'            | 0,793  | 0,827     | 0,753   | 0,819    | 0,763   | 0,827  |          |          |          |          |         |           |         |          |         |       |         |        | 0,758  |
| 'Dragon'            | 0,824  | 0,860     | 0,764   | 0,891    | 0,752   | 0,891  | 0,823    |          |          |          |         |           |         |          |         |       |         |        | 0,775  |
| 'Furman'            | 0,802  | 0,818     | 0,776   | 0,830    | 0,745   | 0,828  | 0,805    | 0,823    |          |          |         |           |         |          |         |       |         |        | 0,761  |
| 'Hetman'            | 0,802  | 0,826     | 0,754   | 0,858    | 0,755   | 0,897  | 0,798    | 0,877    | 0,811    |          |         |           |         |          |         |       |         |        | 0,760  |
| 'Jawor'             | 0,710  | 0,766     | 0,719   | 0,732    | 0,698   | 0,753  | 0,752    | 0,717    | 0,762    | 0,733    |         |           |         |          |         |       |         |        | 0,704  |
| 'Kasztan'           | 0,761  | 0,803     | 0,745   | 0,794    | 0,750   | 0,791  | 0,790    | 0,800    | 0,789    | 0,770    | 0,724   |           |         |          |         |       |         |        | 0,748  |
| 'Komes'             | 0,774  | 0,816     | 0,759   | 0,799    | 0,731   | 0,807  | 0,789    | 0,796    | 0,774    | 0,766    | 0,714   | 0,767     |         |          |         |       |         |        | 0,769  |
| STH 9787            | 0,617  | 0,662     | 0,653   | 0,626    | 0,582   | 0,640  | 0,613    | 0,607    | 0,612    | 0,602    | 0,603   | 0,621     | 0,700   |          |         |       |         |        | 0,647  |
| 'Bingo'             | 0,658  | 0,685     | 0,706   | 0,685    | 0,615   | 0,673  | 0,653    | 0,668    | 0,661    | 0,638    | 0,605   | 0,669     | 0,724   | 0,691    |         |       |         |        | 0,693  |
| 'Sam'               | 0,682  | 0,721     | 0,735   | 0,698    | 0,685   | 0,703  | 0,688    | 0,686    | 0,692    | 0,678    | 0,662   | 0,702     | 0,755   | 0,693    | 0,706   |       |         |        | 0,719  |
| 'Sam_2'             | 0,682  | 0,724     | 0,736   | 0,699    | 0,688   | 0,705  | 0,689    | 0,687    | 0,692    | 0,678    | 0,665   | 0,703     | 0,757   | 0,697    | 0,708   | 0,978 |         |        | 0,720  |
| 'Zuch'              | 0,790  | 0,839     | 0,791   | 0,813    | 0,745   | 0,823  | 0,805    | 0,806    | 0,815    | 0,785    | 0,749   | 0,809     | 0,896   | 0,736    | 0,749   | 0,766 | 0,767   |        | 0,791  |
| 'Bingo_2'           | 0,666  | 0,693     | 0,715   | 0,694    | 0,622   | 0,683  | 0,656    | 0,679    | 0,669    | 0,648    | 0,603   | 0,678     | 0,728   | 0,689    | 0,975   | 0,710 | 0,712   | 0,753  | 0,699  |

Średnio na jeden genotyp przypadło 22,3 specyficznej sekwencji silicoDArT. Sekwencje specyficzne można wykorzystać do konwersji na markery typu STS i bezpośredniej identyfikacji genotypów. Pozostałe genotypy można identyfikować na podstawie obecności lub braku kilku wybranych sekwencji. Stwierdzono również brak wielu danych. Średnia liczba brakujących sekwencji na formę wyniosła w eksperymencie 766. Najwięcej brakujących danych zaobserwowano u odmiany 'Zuch' (1940), najmniej – w przypadku linii STH 9787 (61).

Średnie podobieństwo genetyczne analizowanych form, obliczone zgodnie z formułą Dice'a na podstawie polimorfizmu markerów silicoDArT, wyniosło 0,743. Najmniejszym podobieństwem (0,582) charakteryzowała się odmiana 'Celer' vs. STH 9787 (tab. 3). Największe podobieństwo stwierdzono pomiędzy subliniami odmian 'Bingo' i 'Sam' – odpowiednio 0,975 i 0,977. Najmniejsze podobieństwo do wszystkich pozostałych obiektów wykazała linia STH 9787 (0,647), największe – odmiana 'Zuch' (0,791).

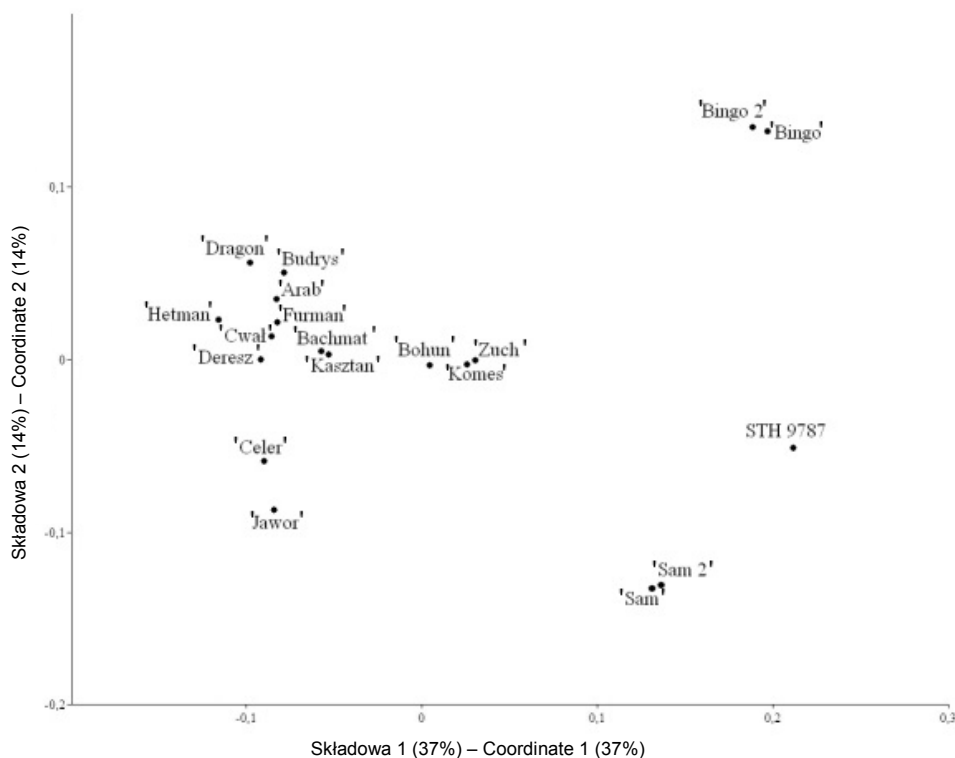
Na dendrogramie UPGMA uformowały się 2 skupienia (rys. 1). Pierwsze z nich obejmowało odmiany 'Bingo' i 'Sam' oraz linię 9787 z HR Strzelce. Drugi klastery to pozostałe odmiany, spośród których 'Jawor', 'Celer', 'Bohun' i 'Kasztan' wykazały niewielkie podobieństwo do pozostałych obiektów w skupieniu. Subklastry w obrębie tego skupienia tworzyły natomiast odmiany 'Budrys' i 'Dragon', 'Hetman' i 'Cwał' oraz 'Komes' i 'Zuch'. Analiza bootstrap potwierdziła wiarygodność uzyskanych wyników. Wartości bootstrap zawierały się w przedziale 64–100.



Rys. 1. Dendrogram UPGMA badanych odmian *A. sativa* L. uzyskany na podstawie polimorfizmu markerów silicoDArT

Fig. 1. UPGMA dendrogram of *Avena sativa* L. cultivars based on the polymorphism of silicoDArT markers

Analiza składowych głównych (PCoA) była zgodna z wynikami UPGMA (rys. 2). Trzy pierwsze składowe tłumaczą ponad 61% zmienności (36,5, 14,4, 10,4). Na wykresie widoczne są separacja odmian i linii pochodzących z HR Strzelce oraz niepełna odrębność odmian z Polanowic i ich podobieństwo do odmian z HR DANKO. Silne grupowanie dotyczy odmian pochodzących z HR DANKO.



Rys. 2. Analiza PCoA badanych odmian *Avena sativa* L. na podstawie polimorfizmu markerów *silicoDArT*

Fig. 2. PCoA of *Avena sativa* L. cultivars based on the polymorphism of *silicoDArT* markers

## DYSKUSJA

Owies zwyczajny charakteryzuje się bardzo małym wewnątrzgatunkowym zróżnicowaniem genetycznym (Frey 1986). Dowodem na to może być nieznaczne zwiększenie plonu odmian wyprowadzanych w początkowych latach hodowli, gdy opierała się ona wyłącznie na selekcji i krzyżowaniach w obrębie *A. sativa* oraz pomiędzy *A. sativa* i *A. byzantina* (Langer i in. 1978). Istotny postęp nastąpił dopiero w latach 1976–1980, w których plony odmian owsa były o 30–34% większe niż odmian z początku stulecia (Rodgers i in. 1983). Prawdopodobnie wynikało to z włączenia do programów hodowlanych mieszańców z dzikimi gatunkami z rodzaju *Avena* (Frey 1986). Niemniej jednak wykorzystanie gatunków nieuprawnych jako źródeł zróżnicowania genetycznego nastręcza wiele trudności – zarówno z uwagi na istnienie międzygatunkowych barier genetycznych, jak i ze względu na konieczność prowadzenia krzyżowań wypierających i wielu lat selekcji. W związku z powyższym

preferowanym przez hodowców materiałem wyjściowym są już istniejące odmiany, zaawansowane linie hodowlane i odmiany miejscowe (Harlan 1976, Stalker 1980). W celu wsparcia programów hodowlanych należy wybierać wydajny system markerowy, generujący dużą liczbę markerów DNA, na potrzeby identyfikacji form odmiennych genetycznie w obrębie gatunku *A. sativa*, które mogłyby stać się materiałem wyjściowym w hodowli.

Dynamiczny rozwój biologii molekularnej doprowadził do opracowania nowych technik analizy polimorfizmu DNA, pozwalających na charakteryzowanie zmienności genetycznej materiałów hodowlanych i ocenę bliżej lub dalej spokrewnionych jednostek systematycznych, z pominięciem złożonych zależności pomiędzy genotypem, fenotypem a środowiskiem (Wolko i Kruszka 1997). W przedstawionej pracy do oceny zróżnicowania genetycznego 16 odmian i jednej linii *Avena sativa* L. wykorzystano markery silicoDArT.

Polimorfizm markerów molekularnych po zastosowaniu odpowiednich algorytmów można wyrazić wartością dystansu lub podobieństwa genetycznego. Dystans obliczany jest dla każdej pary obiektów, co umożliwia określenie podobieństwa pomiędzy nimi. Możliwe jest identyfikowanie form stanowiących źródło unikatowych alleli oraz genotypów o bardzo dużym podobieństwie. Ponadto otrzymana macierz indeksów podobieństwa genetycznego wykorzystywana jest do konstruowania dendrogramów lub analizy składowych głównych. Wyniki analizy mogą stanowić podstawę doboru form rodzicielskich do krzyżowań.

Odmiany *Avena sativa* L. były kilkakrotnie przedmiotem badań polimorfizmu DNA za pomocą różnych systemów markerów molekularnych. Paczos-Grzęda (2007) określiła podobieństwo międzyodmianowe 12 polskich odmian owsa zwyczajnego, wykorzystując markery ISSR, RAPD oraz analizę danych rodowodowych; uzyskała odpowiednio 39% i 42% polimorficznych produktów RAPD oraz ISSR. Analizując podobieństwo genetyczne 19 odmian owsa metodami RAPD i AFLP, Paczos-Grzęda (2004) zidentyfikowała odpowiednio 30% i 37% polimorficznych amplikonów. Tinker i in. (2009) po raz pierwszy zastosowali klasyczną metodę DArT, opartą na mikromacierzach, do analizy 182 odmian *Avena sativa* L. Autorzy ci wykorzystali do kolejnych analiz 1295 sond wyselekcjonowanych wcześniej jako polimorficzne dla odmian. Newell i in. (2011) badali obszerną kolekcję odmian i linii owsa pochodzących z 53 krajów. W analizowanym materiale obserwowali segregację 402 sond DArT. He i in. (2012) przeanalizowali zróżnicowanie genetyczne 94 muzealnych odmian owsa, pochodzących z 24 muzeów i 70 banków genów, głównie z Niemiec i krajów skandynawskich. W celu porównania zmienności genetycznej badanej puli genowej wykorzystali 1056 markerów DArT, 61 SSR i 201 AFLP. Analizę polimorfizmu markerów silicoDArT w owsie, przedstawioną w niniejszej pracy, przeprowadzono po raz pierwszy. Zidentyfikowano aż 8505 polimorficznych markerów DNA, które stanowiły 98,7 wszystkich fragmentów.

Wyniki analiz molekularnych przedstawionych w niniejszej pracy stanowiły podstawę oceny podobieństwa genetycznego badanych odmian i linii owsa *A. sativa* według Dice'a. Wartości indeksów podobieństwa zawierały się w przedziale od 0,582 pomiędzy cv. 'Celer' a linią STH 9787 do 0,975 i 0,977 pomiędzy próbkami reprezentującymi odpowiednio sublinie odmian 'Bingo' i 'Sam'. Wartości indeksów podobieństwa genetycznego Dice'a, stosując metodę ISSR, uzyskała Paczos-Grzęda (2007) dla polskich odmian owsa zwyczajnego;



zawierały się one w przedziale od 0,891 do 0,989. Średnie podobieństwo genetyczne odmian owsa w badaniach własnych wyniosło 0,743 i było niższe aniżeli określone przez Paczos-Grzędę (2007), wynoszące 0,933. Średnia wartość podobieństwa, oszacowana przez Chrząstek i in. (2006) na podstawie analiz polskich odmian *Avena sativa* L., przeprowadzonych uproszczoną metodą AFLP, była mniejsza – wyniosła 0,692.

W badaniach własnych, opierając się na matrycy indeksów podobieństwa genetycznego Dice'a, uzyskanej na podstawie polimorfizmu identyfikowanego metodą DArT, przeprowadzono analizę skupień metodą UPGMA oraz analizę PCoA. Topologia dendrogramu była zgodna z rozmieszczeniem obiektów na wykresie PCoA. Wartości bootstrap, obliczone dla poszczególnych rozgałęzień dendrogramu, równe były 100, co oznacza wysoką wiarygodność skupień.

Na podstawie przeprowadzonej analizy można stwierdzić, że grupowanie odmian za pomocą markerów *silicoDArT* jest zgodne z miejscem ich wyhodowania. Tinker i in. (2009) również wykazali, że odrębnemu grupowaniu podlegają formy pochodzące z różnych programów hodowlanych. Z kolei Newell i in. (2011) oraz He i in. (2012) stwierdzili, że klasteryzacja poszczególnych linii była zgodna z ich pochodzeniem.

## PODSUMOWANIE

Wysoki polimorfizm markerów *silicoDArT*, identyfikowany metodą DArTseq, wskazuje, że jest to odpowiednia metoda oceny zróżnicowania w obrębie gatunku, umożliwiająca identyfikację wielu polimorficznych dominujących markerów o wysokiej wiarygodności, co potwierdził test bootstrap.

Uzyskane wyniki wykazują ponadto odrębność programów hodowlanych realizowanych w spółkach zajmujących się hodowlą owsa, szczególnie w HR Strzelce, oraz fakt bazowania na odmiennej puli genetycznej. Niemniej jednak, z uwagi na ograniczoną liczbę analizowanych obiektów, wnioski te mają charakter wstępny i wymagają weryfikacji na większej puli odmian i linii pochodzących z poszczególnych spółek hodowlanych.

## PIŚMIENNICTWO

- Budzyński W., Szempliński W.** 2003. Owies [w: Szczegółowa uprawa roślin]. T. 1. Red. Z. Jasińska, A. Kotecki. Wrocław, Wydaw. AR we Wrocławiu, 239–258.
- Chrząstek M., Paczos-Grzęda E., Kruk K.** 2006. Ocena zróżnicowania genetycznego polskich odmian owsa (*Avena sativa* L.). Acta Agrophys. 8(2), 319–325.
- FAOSTAT. Production. Crops**, <http://www.faostat.fao.org/site/567/default.aspx#ancor>, access: 15.01.2013.
- Frey K.J.** 1986. Frey K. J. 1986. Genetic resources and their use in oat breeding [in: Proc. of the 2nd Int. Oat Con.], Aberystwyth, July 15–18, 1985. Red. D.A. Lawes, H. Thomas. [b.m.], Springer Netherlands, 7–15.
- Frey L., Rutkowski L.** 2002. Wykaz gatunków (suplement 3) [w: Polska księga traw]. Red. L. Frey. Kraków, Instyt. Bot. im. W. Szafera, 87–95.
- Gąsiorowski H.** 1995. Pochodzenie, rozpowszechnienie i systematyka owsa [w: Owies: chemia i technologia]. Red. H. Gąsiorowski. Poznań, PWRiL, 20–24.
- Hammer Ø., Harper D.A.T., Ryan P.D.** 2001. Past: Paleontological statistics Software Package for education and data analysis. Palaeontol. Electron. 4(1) 4, 1–9.

- Harlan J.R.** 1976. The origins of cereal agriculture in the Old World [in: Origins of agriculture]. Red. C.A. Reed. Hague, Netherlands, Moulton Publ., 357–383.
- He X., Bjørnstad A.** 2012. Diversity of North European oat analyzed by SSR, AFLP and DArT markers. *Theor. Appl. Genet.* 125, 57–70.
- Jaccoud D., Peng K., Feinstein D., Kilian A.** 2001. Diversity arrays: a solid state technology for sequence information independent genotyping. *Nucleic Acids Res.* 29, E25.
- Kilian A., Graner A.** 2012. NGS technologies for analyzing germplasm diversity in genebanks. *Brief. Funct. Genom.* 11(1), 38–50.
- Langer I., Frey K.J., Bailey T.B.** 1978. Production response and stability characteristics of oat cultivars developed in different eras. *Crop Sci.* 18, 938–942.
- Nei M., Li W.H.** 1979. Mathematical model for studying genetic variation in terms of restriction endonucleases. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 76, 5269–5273.
- Newell M.A., Cook D., Tinker N.A., Jannink J.L.** 2011. Population structure and linkage disequilibrium in oat (*Avena sativa* L.): implications for genome-wide association studies. *Theor. Appl. Genet.* 122, 623–632.
- Paczos-Grzęda E.** 2007. Wykorzystanie metod ISSR i RAPD oraz analizy rodowodów do oceny podobieństwa międzyodmianowego *Avena sativa* L. *Zesz. Probl. Post. Nauk Rol.* 517, 547–558.
- Paczos-Grzęda E.** 2004. Pedigree, RAPD and simplified AFLP-based assessment of genetic relationships among *Avena sativa* L. cultivars. *Euphytica* 138, 13–22.
- Rodgers D.M., Murphy J.P., Frey K.J.** 1983. Impact of plant breeding on the grain yield and genetic diversity of spring oats. *Crop Sci.* 23, 737–740.
- Spiss L.** 2003. Historia hodowli owsa w Polsce. *Biul. IHAR* 229, 7–11.
- Stalker H.T.** 1980. Utilization of wild species for crop improvement. *Adv. Agron.* 33, 111–147.
- Tinker N.A., Kilian A., Wight C.P., Heller-Uszynska K., Wenzl P., Rines H.W., Bjornstad A., Howarth C.J., Jannink J.L., Anderson J.M., Rossnagel B.G., Stuthman D.D., Sorrells M.E., Jackson E.W., Tuvešson S., Kolb F.L., Olsson O., Federizzi C.E., Carson M.L., Ohm H.W., Molnar S.J., Scoles G.J., Eckstein P., Bonnan J. M., Ceplitis A., Langdon T.** 2009. New DArT markers for oat provide enhanced map coverage and global germplasm characterization. *BMC Genom.* 10, 1–21.
- Wolko B., Kruszką K.** 1997. Markery molekularne w badaniach zmienności genetycznej roślin. *Post. Nauk Rol.* 3, 3–19.